

CARMELITA ZACCHI SCOLFORO

**MODELAGEM PREDITIVA DO CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes*
E *Salmonella enterica* EM CO-CULTURA COM *Enterococcus faecalis***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S422m
2018

Scolforo, Carmelita Zacchi, 1989-

Modelagem preditiva do crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* em co-cultura com *Enterococcus faecalis* / Carmelita Zacchi Scolforo. – Viçosa, MG, 2018.
vi, 68f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Salmonella enterica*. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. *Enterococcus faecalis*. 4. Alimentos - Microbiologia. 5. Modelos matemáticos. 6. Segurança alimentar. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

CARMELITA ZACCHI SCOLFORO

**MODELAGEM PREDITIVA DO CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes*
E *Salmonella enterica* EM CO-CULTURA COM *Enterococcus faecalis***

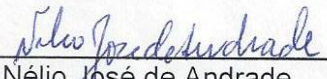
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

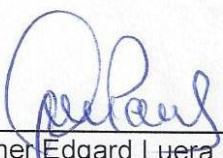
Aprovada: 16 de julho de 2018.


Anderson de Souza Sant'Ana


Luís César da Silva


Maria Cristina Dantas Vanetti
(Coorientadora)


Nélcio José de Andrade
(Coorientador)


Wilmer Edgard Luera Peña
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, força e amparo em toda caminhada até aqui.

Aos meus pais e minha irmã, os quais são os pilares que me sustentam. Sem vocês eu nada seria.

Ao meu amigo e namorado, lury, que sempre com palavras de apoio e incentivo, esteve presente em toda essa jornada.

As minhas amigas: Roberta, Jacque e Daienne por toda ajuda no árduo trabalho experimental e incentivo.

Ao meu orientador Wilmer Edgard Luera Peña por todo ensinamento, compreensão e ótima convivência.

À professora coorientadora, Maria Cristina Dantas Vanetti, pela generosa disponibilidade e ensinamentos.

Ao professor Nélio José de Andrade, pelos ensinamentos e coorientação.

Ao professor Luís César, por auxiliar nas análises dos dados e disponibilidade.

Aos professores Anderson Sant' Ana, Regina Célia e Monique, pelas contribuições no projeto, qualificação e defesa da tese.

A Aline, técnica de laboratório, por toda a paciência e disponibilidade em ajudar no experimento.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Departamento de Microbiologia, pela oportunidade.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

As amigas: Ale, Dandara, Thais, Nayara, Carol, Luana, que deixaram Viçosa mais agradável.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

SCOLFORO, Carmelita Zacchi, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Modelagem preditiva do crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* em co-cultura com *Enterococcus faecalis*.** Orientador: Wilmer Edgard Luera Peña. Coorientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Nélío José de Andrade.

A microbiologia preditiva é uma ferramenta que pode ser utilizada para garantir a segurança alimentar, cujo principal objetivo é o desenvolvimento de modelos matemáticos que possam prever a multiplicação ou inibição de micro-organismos em condições específicas. Alterações de pH, atividade de água, temperatura, presença de agente inibidor, dentre outras, devem ser consideradas na construção de modelos de predição. A modelagem do comportamento bacteriano em co-cultura descreve, além das condições intrínsecas e extrínsecas as que os micro-organismos são submetidos, as interações entre populações microbianas. Esta abordagem não é encontrada com frequência na literatura, por isto, o objetivo geral desta pesquisa foi desenvolver modelos de predição do comportamento de *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* em co-cultura com *Enterococcus faecalis*. Também foram ajustados modelos de crescimento de *S. enterica*, *L. monocytogenes* e *E. faecalis* em monocultura. A influência de *E. faecalis* no crescimento de *L. monocytogenes* também foi estabelecida pela simulação de Monte Carlo. De acordo com os resultados, houve aumento da fase lag, redução da taxa de crescimento e redução da população máxima atingida em ambos os patógenos estudados. Verificou-se que *E. faecalis* exerce ação antagonista em relação aos patógenos estudados, sendo o efeito bioconservante mais expressivo em *L. monocytogenes*. A simulação de Monte Carlo indicou probabilidades de ocorrência de taxas de crescimento diferentes, numa mesma condição experimental do crescimento de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis*. Esta informação adicional deve ser mais utilizada na área de microbiologia preditiva. *E. faecalis* como inibidor de *S. enterica* e *L. monocytogenes* pode ser uma alternativa dentre os métodos de conservação já existentes e a modelagem dessa inibição deve ser utilizada para nortear novas pesquisas na área.

ABSTRACT

SCOLFORO, Carmelita Zacchi, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Predictive modeling of growth *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in co-culture with *Enterococcus faecalis*.** Adviser: Wilmer Edgard Luera Peña. Co-advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti and Nélío José de Andrade.

Predictive microbiology is a tool that can be used to guarantee food safety, whose main objective is the development of mathematical models that can predict the multiplication or inhibition of microorganisms under specific conditions. Alterations of pH, water activity, temperature, presence of inhibitory agent, among others, should be considered in the construction of prediction models. The modeling of bacterial behavior in co-culture describes, in addition to the intrinsic and extrinsic conditions that the microorganisms are subjected to, the interactions between microbial populations. This approach is not often found in the literature, therefore, the general objective of this research was to develop models to predict the behavior of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Enterococcus faecalis*. Growth patterns of *S. enterica*, *L. monocytogenes* and *E. faecalis* in monoculture were also adjusted. The influence of *E. faecalis* on the growth of *L. monocytogenes* was also established by the Monte Carlo simulation. According to the results, there was an increase in the lag phase, reduction of the growth rate and reduction of the maximum population reached in both pathogens studied. It was verified that *E. faecalis* exerts an antagonistic action in relation to the studied pathogens, being the most expressive bioconservant effect in *L. monocytogenes*. The Monte Carlo simulation indicated the probability of occurrence of different growth rates, in the same experimental condition of growth of *L. monocytogenes* in co-culture with *E. faecalis*. This additional information should be more used in the area of predictive microbiology. *E. faecalis* as an inhibitor of *S. enterica* and *L. monocytogenes* may be an alternative among existing conservation methods and the modeling of this inhibition should be used to guide new research in the area.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Co-cultura e bioconservação.....	3
2.1.1 Enterococcus spp. como bioconservante	5
2.2 Microbiologia preditiva	8
2.3 Validação de modelos preditivos.....	12
2.4 Utilização da microbiologia preditiva para modelagem de co-cultura.....	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
Modeling monoculture and co-culture biopreservative effects of <i>Enterococcus faecalis</i> on <i>Salmonella enterica</i>	21
Abstract	22
Introduction	23
Materials and methods.....	24
Results	28
Discussion.....	34
Acknowledgements	39
References.....	39
Modelagem do crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em monocultura e em co-cultura com <i>Enterococcus faecalis</i>	43
RESUMO	43
INTRODUÇÃO	44

MATERIAIS E MÉTODOS	46
Micro-organismos e meios de cultura	46
Preparo das suspensões microbianas	46
Delineamento experimental	47
Análise dos dados experimentais	49
Modelo polinomial de superfície de resposta	49
Validação dos modelos	50
Simulação de Monte Carlo	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
Modelagem do crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em monocultura	51
Modelagem do crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em co-cultura com <i>E. faecalis</i>	54
Modelagem secundária	57
Validação dos modelos quadráticos dos valores de taxa de crescimento	59
Simulação de Monte Carlo	60
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

1 INTRODUÇÃO

Dentre os novos processos disponíveis para o aumento da segurança microbiológica de alimentos, o uso de bioconservantes tem se destacado por minimizar a perda das propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos. Esta estratégia consiste no uso de micro-organismos e, ou de seus metabólitos, para aumento da vida de prateleira ou da qualidade microbiológica do produto. São encontrados na literatura estudos que indicam o controle de diferentes patógenos, incluindo bactérias do gênero *Listeria* e *Salmonella*, quando em co-cultura com bactérias láticas, que agem como bioconservantes.

As bactérias láticas, em geral, são consideradas GRAS (Geralmente Reconhecidas como Seguras) e, portanto, seguras para a saúde humana. A ação conservante deste grupo é atribuída à produção de metabólitos tais como ácido acético, ácido láctico, peróxido de hidrogênio, além da produção de bacteriocinas. Os gêneros mais estudados como antagonistas de patógenos são *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*.

O conhecimento da resposta do micro-organismo frente às variações de diversos parâmetros é importante para o seu controle. Neste contexto, a microbiologia preditiva é uma ferramenta que pode ser utilizada para garantir a segurança alimentar. O principal objetivo desta ferramenta é desenvolver modelos matemáticos que possam prever a multiplicação ou inibição de algum micro-organismo em determinadas condições específicas, como alterações de pH, atividade de água, temperatura, presença de agente inibidor e outras alterações relevantes para o crescimento ou inibição de micro-organismos.

São encontrados na literatura diversos trabalhos de modelagem com culturas puras sem que as interações entre culturas sejam levadas em consideração. No entanto, discrepâncias de resultados em meio de cultura e na matriz alimentar podem ocorrer, uma vez que os alimentos e bebidas possuem microbiota natural diversa, assim, sinergismo e antagonismo são passíveis de ocorrer. A modelagem de co-cultura descreve, além das condições intrínsecas e

extrínsecas a que os micro-organismos são submetidos, as interações entre populações microbianas.

Por isto, o objetivo geral deste trabalho foi ajustar modelos de predição do comportamento de *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* em monocultura e em co-cultura com *Enterococcus faecalis* em diferentes condições de temperatura e pH. Para isso, alguns objetivos específicos foram estabelecidos: i) ajustar modelo de crescimento de *S. enterica*, *L. monocytogenes* e *E. faecalis* em monocultura com variação de temperatura de 8,2 °C a 41,8 °C e pH de 5,3 a 8,7; ii) ajustar modelo de taxa de crescimento de *S. enterica* em co-cultura com *E. faecalis*; iii) ajustar modelo de taxa de crescimento e aplicar a Simulação de Monte Carlo para *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis*; iv) validar modelos de crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura e em co-cultura com *E. faecalis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Co-cultura e bioconservação

Existem diferentes formas de conservar alimentos: uso de baixas temperaturas, tratamento térmico, irradiação, alta pressão hidrostática, campos elétricos pulsados, adição de conservantes químicos, dentre outros. No entanto, quanto mais natural for o alimento mais atraente se torna para o consumidor moderno, o qual, assim como o governo, se preocupa com a segurança do produto, mas valoriza outros aspectos relacionados à qualidade (SETTANNI; CORSETTI, 2008). A fim de conservar os alimentos de forma mais natural, muitos trabalhos são desenvolvidos na área da bioconservação, que tem como princípio, o uso de micro-organismos e, ou, seus metabólitos para aumentar a vida de prateleira de um produto, sem alterar as características sensoriais e nutricionais dos alimentos (ROSS; MORGAN; HILL, 2002).

Os micro-organismos, em seu habitat, estão em constante interação e estas interações podem gerar sinergismo ou antagonismo, dependendo das condições ambientais, da disponibilidade de nutrientes e dos tipos de micro-organismos envolvidos. Na área de conservação de alimentos, o antagonismo entre os micro-organismos gera interesse para as pesquisas, pois considera-se que patógenos ou deterioradores possam ser inibidos pela presença de outros micro-organismos e, ou seus produtos.

As bactérias lácticas são as mais estudadas como micro-organismos com potencial bioconservante de alimentos. Este grupo é composto por bactérias ubíquas, gram-positivas, anaeróbias facultativas e não formadoras de esporos (AGRESTI *et al.*, 2012; STILES; HOLZAPFEL, 1997). Este grupo de bactérias contribui para as características sensoriais dos alimentos, além de aumentar a vida de prateleira e garantir qualidade microbiológica (LEROY; DE VUYST, 2004; SALVUCCI; LEBLANC; PÉREZ, 2016).

Em geral, as bactérias lácticas são consideradas GRAS (Geralmente Reconhecidas como Seguras) e, portanto, seguras para a saúde humana. A ação conservante deste grupo é atribuída a produção de metabólitos tais como ácido

acético, ácido láctico, peróxido de hidrogênio e outros ácidos orgânicos que reduzem o pH do meio inibindo competidores, além da produção de bacteriocinas (SALVUCCI; LEBLANC; PÉREZ, 2016).

Segundo Diepers e colaboradores (2017), os mecanismos de inibição das bactérias lácticas são variáveis, no entanto, muitas espécies do gênero produzem ácidos orgânicos como principal mecanismo de ação antimicrobiana. Os ácidos orgânicos fracos inibem o crescimento de algumas bactérias, pois afetam a capacidade destas em manter a homeostase do pH intracelular, além de interromperem o transporte de nutrientes e algumas vias metabólicas. O pH do meio em que o ácido é produzido ou adicionado pode aumentar ou diminuir o efeito do mesmo, uma vez que influencia na dissociação dos mesmos e interferem com a entrada deste no interior da célula bacteriana (BEALES, 2004). Os ácidos fortes são menos permeáveis à membrana celular bacteriana, uma vez que se encontram dissociados, no entanto, sua presença diminui o pH do meio extracelular. Condições em que o pH do meio é baixo demandam maiores gastos de energia pelas bactérias, de modo a manter o pH intracelular próximo ao neutro e assim sintetizar componentes celulares essenciais para a divisão e crescimento celular (BOOTH e KROLL, 1989). O efeito antimicrobiano, do pH intracelular baixo, é causado pela desnaturação de proteínas da membrana celular e, dessa forma, abaixar o pH citoplasmático, culminando na redução da taxa de crescimento (CHEROUTRE-VIALETTE *et al.*, 1998).

A ação do peróxido de hidrogênio, produzido por algumas bactérias lácticas, é outro fator limitante para o crescimento de alguns patógenos. Diepers e colaboradores (2017) verificaram que, com a adição de catalase, isolados de bactérias lácticas perderam a capacidade de inibir o crescimento dos patógenos estudados. Assim, estes autores comprovaram a participação deste metabólito na inibição de outras bactérias. A presença de peróxido de hidrogênio pode provocar estresse oxidativo na célula bacteriana. Geralmente esta molécula é excretada por micro-organismos e causam inibição de um competidor (PERICONE *et al.*, 2000). O peróxido de hidrogênio é um oxidante que reage com macromoléculas, como DNA, proteínas, lipídeos e outros compostos bioativos presentes no interior celular

(WALLING, 1975). A oxidação destas moléculas pode ocasionar inativação de enzimas, mutação e peroxidação de lipídeos (IMLAY, 2003).

Além desses mecanismos de inibição, Ananou e colaboradores (2005) afirmaram que bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* são bioconservantes em diferentes alimentos. O efeito das bacteriocinas produzidas por estas bactérias têm sido estudadas há décadas (GIRAFFA; NEVIANI; TARELLI, 1994; MAISNIER-PATIN; FORNI; RICHARD, 1996; CHAKCHOUK-MTIBAA *et al.*, 2014; FAVARO *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2016). Estes compostos agem na membrana celular e formam poros, os quais afetam a atividade celular do micro-organismo (CLEVELAND *et al.*, 2001), inclusive por permitir o extravasamento extracelular de ATP (SETTANNI e CORSETTI, 2008).

A competição por nutrientes também pode gerar inibição de um micro-organismo quando na presença de outro. Ao cultivar bactérias em co-cultura, acredita-se que uma espécie será dominante em relação à outra, sendo este efeito conhecido como “Efeito de Jameson” (JAMESON, 1962).

2.1.1 *Enterococcus* spp. como bioconservante

Dentre as bactérias lácticas, *Enterococcus* spp. é um dos gêneros mais estudados com potencial para o controle biológico de patógenos de origem alimentar. De acordo com dados encontrados na literatura, acredita-se que os estudos inibição se iniciaram com a descoberta das bacteriocina produzidas por *Enterococcus* spp. e sua ação no controle biológico de micro-organismos. Atualmente, os estudos de isolamento e purificação de bacteriocinas são muitos, mas há crescente atenção ao uso de *Enterococcus* no controle de crescimento de patógenos como *L. monocytogenes* e *Salmonella*.

De acordo com estudo de H-Kittikun e colaboradores (2015), a bacteriocina produzida por *E. faecalis* inibe o crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Montevideo, além de inibir patógenos gram-positivos, como *L. monocytogenes*. Kumar e Srivastava (2010) e Kang e Lee (2005) também observaram a atividade antimicrobiana de bacteriocina de *Enterococcus faecium* em patógenos gram-positivos e gram-negativos.

Martínez e colaboradores (2008) constataram que variações de temperaturas associadas à presença de enterocina AS-48, principal bacteriocina produzida por *E. faecalis*, possuem efeito antimicrobiano em *Salmonella enterica* Enteritidis. Estudo semelhante foi realizado por Molinos e colaboradores (2008), os quais associaram pH, temperatura e presença de bacteriocina AS-48, quando também foi observada a inibição de *S. enterica* e outros patógenos gram-negativos.

Pingitore e colaboradores (2012) afirmaram que *Enterococcus mundtii* CRL35 apresenta potencial de bioconservação de produtos fermentados como queijo Minas. Estes autores testaram o controle do crescimento de *L. monocytogenes* por *E. mundtii* em queijos Minas e verificaram que a população do patógeno não aumentou sob refrigeração quando o bioconservante estava presente. Em amostras de queijos inoculadas apenas com o patógeno (10^3 UFC.g⁻¹), ao final do mesmo tempo, sob refrigeração, a população atingiu 10^8 UFC.g⁻¹.

Em outro estudo, *E. mundtii*, isolado de solo, na concentração de 10^5 UFC.mL⁻¹ e 10^6 UFC.mL⁻¹ foi responsável por manter e reduzir, respectivamente, a população de *L. monocytogenes* em meio de cultura e em salmão defumado mantido sob refrigeração. Por isso, os autores também consideraram que *E. mundtii* pode ser uma alternativa para o controle do crescimento de *L. monocytogenes* em alimentos refrigerados (BIGWOOD *et al.*, 2012). Segundo Ahmadova e colaboradores (2013), *E. faecium* AQ71, isolado de queijo, pode ser usado como cultura conservadora na indústria de alimentos, pois esta bactéria apresentou atividade anti-listeria e propriedades probióticas.

Duas estirpes de *E. faecalis* foram responsáveis por reduzir, aproximadamente, quatro ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* em queijo mantidos sob refrigeração, enquanto que no controle positivo (*L. monocytogenes* cultivada na ausência de *E. faecalis*) houve um aumento de quatro ciclos logarítmicos do patógeno (COELHO *et al.*, 2014). Os autores verificaram que todos os queijos produzidos com culturas de *E. faecalis* apresentaram sabor e aceitabilidade geral semelhantes ao queijo controle (sem adição da cultura

protetora), concluindo, portanto, que a presença do bioconservante não alterou as características sensoriais dos queijos (COELHO *et al.*, 2014).

A microbiota natural de um alimento pode conter micro-organismos que impedem o crescimento de patógenos, como *L. monocytogenes*. Por isso, Dailey e colaboradores (2014) selecionaram oito espécies de bactérias isoladas de alimentos, que demonstraram a capacidade de inibir *Listeria*. Dentre as bactérias inibidoras, três isolados pertencem o grupo das bactérias láticas: *Carnobacterium maltaromaticum*, *E. faecalis* e *E. faecium*. Os autores verificaram que as bactérias láticas, quando cultivadas em co-cultura com *L. monocytogenes*, cresciam de forma semelhante do que quando cultivadas na ausência de *L. monocytogenes*. Já *L. monocytogenes*, após 48 horas, em co-cultura com as bactérias láticas atingiu população significativamente menor do que quando cultivada em monocultura. *C. maltaromaticum* reduziu 0,9 a 1,6 ciclos logarítmicos na população final de *L. monocytogenes*, enquanto *E. faecalis* foi responsável pela diminuição de 2,3 a 3,7 ciclos logarítmicos e *E. faecium* resultou em uma diminuição de 1,3 a 2,2 ciclos logarítmicos na população de *L. monocytogenes* (DAILEY *et al.*, 2014). Corroborando estes resultados, Barbosa, Borges e Teixeira (2014) também verificaram a inibição de *L. monocytogenes* por *E. faecium* isolado de chouriço.

Duas estirpes de *E. faecium* foram testadas quanto a ação de inibição de *L. monocytogenes* em meio de cultura (HUANG *et al.*, 2016). As estirpes de *E. faecium* foram isoladas de carnes e não apresentavam genes relacionados a virulência e eram produtoras de bacteriocina, ou seja, bactérias com potenciais ação bioconservantes. As bactérias foram cultivadas em co-cultura com *L. monocytogenes*, em concentrações variadas (10^3 UFC.mL⁻¹ e 10^6 UFC.mL⁻¹). As estirpes de *E. faecium* inibiram o crescimento do patógeno e esta inibição foi atribuída à presença de bacteriocina e pela redução do pH quando as bactérias eram cultivadas em co-cultura (HUANG *et al.*, 2016).

Vimont e colaboradores (2017) isolaram micro-organismos presentes em leite cru de camelo e verificaram efeito inibitório destes em algumas bactérias patogênicas, inclusive *L. monocytogenes*. De acordo com o resultado, as contagens de *L. monocytogenes* foram reduzidas em dois ciclos logarítmicos após

24 h em co-cultura com *E. faecium* LCW 44, em comparação com o aumento de quatro ciclos logarítmicos quando cultivado em monocultura. A estirpe estudada foi testada em relação a virulência e a resistência a antibióticos e após as análises, os autores sugeriram que *E. faecium* LCW 44 é um potencial probiótico para uso humano. O trabalho de Lianou e colaboradores (2017) reafirma as bases teóricas encontradas na literatura, que indicam que bactérias lácticas, como *Lactococcus* e *Enterococcus* podem exercer atividade antilisteria, tanto pela produção e ação de bacteriocina quanto pela competição de nutrientes. *Enterococcus* inibe bactérias gram-negativas. Karimaei e colaboradores (2016) afirmaram que isolados de *Enterococcus* obtidos da microbiota humana normal têm potencial efeito antibacteriano contra *Salmonella enterica* sorovar Typhi, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli*, o que indica que estes micro-organismos também exercem inibição de bactérias gram negativas.

De acordo com Malakar e colaboradores (2003), as interações microbianas são ignoradas na microbiologia preditiva e, a maioria dos estudos, busca descrever os mecanismos de inibição. No entanto, a microbiologia preditiva é uma ferramenta cada vez mais utilizada para a predição do comportamento de um micro-organismo e pode ser utilizada para avaliar estas interações.

2.2 Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva consiste em modelar e, ou simular o crescimento ou inativação de micro-organismos. Deste modo, a microbiologia preditiva pode ser aplicada em: (i) análises de riscos do desenvolvimento de micro-organismos patogênicos em alimentos; (ii) tomadas de decisão em processos de controle de qualidade, no que se refere, por exemplo, Plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC); (iii) processos de desenvolvimento de novos produtos, predizendo a sobrecarga de um micro-organismo em relação a alterações de fatores intrínsecos e extrínsecos; (iv) treinamento de equipe para avaliação do comportamento de micro-organismos (WHITING, 1995).

Para determinar o crescimento de micro-organismos, as variáveis avaliadas são: tempo de adaptação (λ), velocidade específica de crescimento (μ), população máxima (R_g) e tempo de geração (G) (BATY; DELIGNETTE-MULLER, 2004).

O tempo de adaptação, também denominado de fase lag, é caracterizado como resposta do micro-organismo à mudança de ambiente, ocorre tanto no crescimento quanto na inativação populações microbianas (SWINNEN *et al.*, 2004). Há vários modelos para a predição da duração da fase lag, que abrangem diferentes variáveis e estratégias de modelagens, de acordo com o objetivo do estudo (BARANYI; ROBERTS, 1994; SWINNEN *et al.*, 2004; YATES; SMOTZER, 2007).

A taxa/velocidade de crescimento avalia o quanto o micro-organismo cresce em determinado tempo, assim pode ser comparada a taxa de crescimento em condições ótimas e condições adversas, sendo possível identificar se há dificuldade ou não do micro-organismo crescer em diferentes condições (PERNI; ANDREW; SHAMA, 2005). Existem diferentes modelos que descrevem a taxa de crescimento, a exemplo: modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI; ROBERTS, 1994), modelo de Gompertz, Gompertz modificado, modelo de Buchanan, entre outros claramente descritos por Li, Xie e Edmondson (2007).

O tempo de geração é definido como tempo em que a população microbiana leva para se duplicar. A população máxima é o valor que a população do micro-organismo alcança ao atingir a fase estacionária ou em um tempo pré-estabelecido. Em trabalhos de cultura mista, estimar a população máxima permite verificar a influência da presença de competidores, uma vez que a presença destes pode reduzir a população máxima alcançada como os trabalhos supracitados no item 2.1.1 (BIGWOOD *et al.*, 2012; VERA PINGITORE *et al.*, 2012; COELHO *et al.*, 2014; VIMONT *et al.*, 2017).

Os modelos matemáticos utilizados na modelagem preditiva são classificados quanto a forma e estruturação em modelos mecanísticos e modelos empíricos (MCMEEKIN e ROSS, 2002). Os modelos mecanísticos descrevem a resposta microbiana, mas com difícil ajuste, pois não considera a complexidade da fisiologia dos micro-organismos, tal como se observa quando é feita a análise de

regressão, por exemplo. Já os modelos empíricos descrevem um conjunto de dados que considera em parte a fisiologia microbiana (KRIST, 1998; MCMEEKIN e ROSS, 2002). Estes ainda são divididos em cinéticos e probabilísticos. Os cinéticos estão relacionados com o comportamento da população microbiana, como seu crescimento, velocidade de crescimento ou inibição de micro-organismos, em função do tempo. Os modelos probabilísticos estão baseados na predição da probabilidade de ocorrência de um determinado evento, em um determinado período de tempo (NAKASHIMA, ANDRÉ, FRANCO, 2000).

Segundo Whiting e Buchanan (1993), existem três níveis de modelo preditivo em relação a forma de ajuste: modelo primário, modelo secundário e modelo terciário. O modelo de primeiro nível ou primário descreve parâmetros cinéticos do desenvolvimento de uma população de micro-organismos em função do tempo. No modelo de segundo nível ou secundário é descrito como estes parâmetros são influenciados em função de condições ambientais (exemplo: em função da temperatura). O modelo de terceiro nível ou terciários são programas computacionais que abrangem o uso de modelos primários e secundários. Estes programas facilitam a modelagem das curvas de crescimento microbiano sob diferentes condições (WHITING, 1995; MCDONALD; SUN, 1999; MCMEEKIN; ROSS, 2002).

O modelo primário mais utilizado é o descrito por Baranyi e Roberts (1994) (Equação 1). Este modelo inclui uma fase linear no crescimento exponencial e uma fase lag determinada por uma função de ajuste, assim surge o parâmetro “estado fisiológico”, o qual representa vantagens em relação aos outros modelos como de Gompertz e Gompertz modificado, ocasionando em melhores ajustes computacionais.

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max} A(t) - \ln \left[1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{(N_{\max} - N_0)}} \right] \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

$\ln(N(t))$ = ln da concentração celular no tempo t;

$\ln(N_0)$ = ln da concentração celular inicial (UFC.g-1);

$\mu_{\max}$ = taxa de crescimento exponencial (1.h-1);

$\ln(N_{\max})$ = ln da concentração celular máxima.

A função $A(t)$, representada pela Equação 2, é a integral da função de ajuste, representado pela Equação 3, a qual associa o estado fisiológico do micro-organismo (q_0) com a fase lag (λ).

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(\frac{e^{(-\mu_{\max} t)} + q_0}{1 + q_0} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

$$\lambda = \frac{\ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right)}{\mu_{\max}} \quad (\text{Equação 3})$$

Para a modelagem secundária podem ser utilizados diversos modelos como: superfície de resposta, raiz quadrada, Arrhenius modificado, modelos de probabilidade de regressão logística e outros. A metodologia de superfície de respostas apresenta vantagens por descrever o efeito de duas ou mais variáveis sobre uma variável resposta, além de avaliar a combinação dos efeitos das variáveis e como estes afetam a resposta. Outra vantagem se dá pela simplicidade de análise dos dados, uma vez que são obtidos polinômios de primeiro ou segundo grau, os quais são fáceis de analisar.

Em relação aos modelos terciários, estes podem ser classificados quanto aos resultados obtidos em modelos determinísticos e estocásticos. Os modelos preditivos são, em geral, determinísticos, ou seja, predizem um único valor em uma dada situação ou condição pré-estabelecida. A simulação de Monte Carlo é um método estocástico, a qual é uma alternativa para análise de dados de micro-organismos cultivados em co-cultura. Este método é caracterizado pela geração de valores aleatórios ou pseudo-aleatórios, os quais permitem estabelecer a probabilidade de ocorrência de determinadas situações, tais como o crescimento ou inibição de um micro-organismo em diferentes condições (POSCHET, 2003;

POSCHET *et al.*, 2005). Ao realizar as simulações é possível comparar cenários, ou seja, avaliar a probabilidade de uma taxa de crescimento em uma condição pré-determinada de pH e temperatura com a probabilidade desta mesma taxa quando testada em condições diferentes de pH e temperatura. Este tipo de análise é fundamental para a gestão de risco em indústrias de alimentos que queiram verificar a probabilidade de seu produto atingir determinada população microbiana, caso algum desvio aconteça no processamento.

Muñoz e colaboradores (2010) evidenciaram o impacto da abordagem estocástica, utilizando a simulação de Monte Carlo, para a combinação de diferentes fatores de controle aplicados pela indústria de alimentos para a segurança alimentar relacionada a *L. monocytogenes*. Estes autores afirmam que a abordagem estocástica pode gerar modelos de predição seguros mesmos com baixos níveis iniciais de contaminação.

2.3 Validação de modelos preditivos

A validação de modelos preditivos permite expressar o grau de confiabilidade do mesmo, ao empregar índices estatísticos, como fator BIAS, fator exatidão e coeficiente de determinação (R^2) (WHITING; BUCHANAN, 1993; ROSS, 1996). Os índices fator BIAS e exatidão relacionam os valores preditos pelo modelo e os valores observados em condições experimentais (Equação 4 e 5), por isso, o valor esperado para estes são próximos de 1.

$$\text{Fator BIAS} = 10^{\sum \text{Log}(\frac{P}{O})/n} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{Fator exatidão} = 10^{\sum |\text{Log}(\frac{P}{O})|/n} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que P é o valor predito; O é o valor observado; n é o número de observações.

Segundo Ross (1996), valores do fator BIAS maiores do que 1 indicam que o modelo superestima os dados, ou seja, o modelo fornece dados seguros, uma vez que os valores preditos são maiores do que o observado. O oposto acontece

quando o fator BIAS apresenta valores menores do que 1, e que indica que o modelo subestima os dados, não sendo considerados seguros.

Já para o fator exatidão, o modelo ideal é aquele com fator igual a 1, quanto mais distante deste valor, maior será a variação do modelo. De acordo com Ross (1996), é considerado bom ajuste variações de 25% ou 0,25, ou seja, 0,75 a 1,25.

O coeficiente de determinação (R^2), muito utilizado como indicador de ajustes em modelos matemáticos, representa a proporção de explicação do modelo e seus valores variam de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1 maior é a segurança e ajuste do modelo.

Segundo Jeyamkondan e colaboradores (2001), outros índices de validação podem ser utilizados, como resíduo relativo absoluto médio, resíduo quadrado médio da raiz, resíduo de porcentagem relativa média. Por isso, com intuito de garantir maior confiabilidade e segurança do modelo é preciso realizar a validação dos modelos ajustados e, para isto, utilizar mais de um índice de validação. A escolha dos índices a serem utilizados dependerá dos objetivos do estudo, dos modelos testados e da familiaridade dos pesquisadores com os índices de validação.

2.4 Utilização da microbiologia preditiva para modelagem de co-cultura

Na literatura existem muitos trabalhos que avaliam o efeito bioconservador de um micro-organismo, no entanto, os estudos de modelagem desta inibição são mais escassos. Como pode ser observado na Tabela 1, são poucos os trabalhos, que utilizam a modelagem matemática do crescimento e, ou inibição de micro-organismo em co-cultura, ao comparar com os trabalhos que explicam os mecanismos de inibição. No entanto, o ajuste de modelos de predição de co-cultura permite quantificar a influencia do bioconservante em relação às variáveis respostas, como por exemplo, taxa de crescimento e fase de adaptação. Outra vantagem do uso destes modelos de predição é o fato de permitirem a inserção de diferentes variáveis independentes que também podem ser ajustadas para inibir um micro-organismo, como temperatura, pH, atividade de água e outros, além de testar as interações entre as variáveis do modelo. Os modelos gerados podem ser

utilizados por pesquisadores e indústrias de alimentos na tomada de decisão, avaliação de riscos, cálculos de vida de prateleira, na análise de perigos e pontos críticos de controle, no desenvolvimento de novos produtos, dentre outros.

Tabela 1 – Artigos que modelaram o crescimento de micro-organismos em co-cultura.

Autores e ano	Micro-organismos	Modelos ajustados
Poschet e colaboradores (2003)	<i>Listeria</i> e <i>E. coli</i>	Baranyi e Roberts (1994) Simulação de Monte Carlo
Giménez e Dalgaard (2004)	<i>L. monocytogenes</i> , Enterobacteriaceae, <i>Photobacterium phosphoreum</i> and Enterococci	Baranyi e Roberts (1994) Modelo de regressão logística
Antwi e colaboradores (2007)	<i>L. monocytogenes</i> e <i>Lactococcus lactis</i>	Van Imper (2005) Baranyi e Roberts (1994) Modelo proposto pelo artigo
Møller e colaboradores (2013)	Sorotipos variados de <i>Salmonella</i>	Modelo de Jameson e Lotka e Volterra Raiz quadrada
Aghababaie e colaboradores (2015)	<i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Modelo Malthusiano, Monod, equação de Luedeking–Piret, Modelo de simulação e outros.
Blanco-Lizarazo e colaboradores (2016)	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>	Baranyi e Roberts Modelo Jameson
Sreemahadevan e colaboradores (2018)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Scheffersomyces stipites</i>	Modelo proposto pelo artigo
Valik e colaboradores (2018)	<i>Staphylococcus aureus</i> e bactérias lácticas	Baranyi e Roberts (1994) Giménez e Dalgaard (2004) Modelo logístico

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHABABAIE, M.; KHANAHMADI, M.; BEHESHTI, M. Developing a kinetic model for co-culture of yogurt starter bacteria growth in pH controlled batch fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 72–79, dez. 2015.

AHMADOVA, A.; TODOROV, S. D.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; MIRHADI ZADI, T.; KULIYEV, A.; FRANCO, B. D. G. de M.; CHOBERT, J.-M.; HAERTLÉ, T. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 631–641, abr. 2013.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; BERNARDO, A.; LÓPEZ, M. Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella Typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 278–282, 2010.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ, M.; BERNARDO, A. Relationship between membrane fatty acid composition and heat resistance of acid and cold stressed *Salmonella senftenberg* CECT 4384. **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 347–353, 2009.

ANTWI, M.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J. F.; GEERAERD, A. H. Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and coculture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 71–84, 2007.

ASPRI, M.; O'CONNOR, P. M.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; ROSS, P.; HILL, C.; PAPADEMAS, P. Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. **International Dairy Journal**, v. 73, p. 1–9, out. 2017.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3–4, p. 277–294, 1994.

BARBOSA, J.; BORGES, S.; TEIXEIRA, P. Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 144–148, 2014.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 1–20, 2004.

BIGWOOD, T.; HUDSON, J. A.; COONEY, J.; MCINTYRE, L.; BILLINGTON, C.; HEINEMANN, J. A.; WALL, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus mundtii* isolated from soil. **Food Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 354–360, dez. 2012.

BLANCO-LIZARAZO, C. M.; SOTELO-DÍAZ, I.; LLORENTE-BOUSQUETS, A. *In vitro* modelling of simultaneous interactions of *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, and *Staphylococcus carnosus*. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 341–348, 29 fev. 2016.

BOCKELMANN, W.; KOSLOWSKY, M.; GOERGES, S.; SCHERER, S.; FRANZ, C. M. A. P.; HELLER, K. J. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Staphylococcus equorum* SE3 in cheese models. **Food Control**, v. 71, p. 50–56, 2017.

BOOTH IR, K. R. The preservation of foods by low pH. In: Gould GW, editor. Mechanisms of action of food preservation procedures. **Elsevier Applied Science**, p. 119–160, 1989.

CHEROUTRE-VIALETTE, M.; LEBERT, I.; HEBRAUD, M.; LABADIE, J.; LEBERT, A. Effects of pH or aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 71–77, 1998.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1–20, dez. 2001.

COBO MOLINOS, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. Ben; GÁLVEZ, A. Combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 for inactivation of Gram-negative bacteria in soybean sprouts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2912–2921, 2008.

COELHO, M. C.; SILVA, C. C. G.; RIBEIRO, S. C.; DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; ROSA, H. J. D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53–59, nov. 2014.

DAILEY, R. C.; MARTIN, K. G.; SMILEY, R. D. The effects of competition from non-pathogenic foodborne bacteria during the selective enrichment of *Listeria monocytogenes* using buffered *Listeria* enrichment broth. **Food Microbiology**, v. 44, p. 173–179, 2014.

DIEPERS, A.-C.; KRÖMKER, V.; ZINKE, C.; WENTE, N.; PAN, L.; PAULSEN, K.; PADUCH, J.-H. *In vitro* ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 5, p. 84–92, 2017.

FERNÁNDEZ, A.; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; LÓPEZ, M.; BERNARDO, A. Effects of organic acids on thermal inactivation of acid and cold stressed *Enterococcus faecium*. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 497–503, 2009.

FOSTER, J. W. When protons attack: Microbial strategies of acid adaptation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 170–174, abr. 1999.

GIMÉNEZ, B.; DALGAARD, P. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 96–109, 2004.

GRANDE BURGOS, M. J.; LUCAS LÓPEZ, R.; LÓPEZ AGUAYO, M. del C.; PÉREZ PULIDO, R.; GÁLVEZ, A. Inhibition of planktonic and sessile *Salmonella enterica* cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 214–221, 2013.

H-KITTIKUN, A.; BISCOLA, V.; EL-GHAISH, S.; JAFFRÈS, E.; DOUSSET, X.; PILLOT, G.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J.-M.; HWANHLEM, N. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation. **Food Control**, v. 54, p. 126–134, ago. 2015.

HUANG, Y.; YE, K.; YU, K.; WANG, K.; ZHOU, G. The potential influence of two *Enterococcus faecium* on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 67, p. 18–24, 2016.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. **Annual Review of Microbiology** v. 57, p. 395–418, 2003.

JAMESON, J. E. A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. **Journal of Hygiene**, v. 60, p. 193–207, 1962.

JANSSEN, M.; GEERAERD, A. H.; LOGIST, F.; DE VISSCHER, Y.; VEREECKEN, K. M.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHIERE, F.; VAN IMPE, J. F. Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 59–72, 2006.

JENA, P. K.; TRIVEDI, D.; CHAUDHARY, H.; SAHOO, T. K.; SESHADRI, S. Bacteriocin PJ4 active against enteric pathogen produced by *Lactobacillus helveticus* PJ4 isolated from gut microflora of wistar rat (*Rattus norvegicus*): Partial purification and characterization of bacteriocin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 7, p. 2088–2100, 2013.

JEYAMKONDAN, S.; JAYAS, D. .; HOLLEY, R. . Microbial growth modelling with artificial neural networks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 343–354, 2001.

KANG, J. H.; LEE, M. S. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 1169–1176, 2005.

KARIMAEI, S.; SADEGHI, J.; ASADIAN, M.; ESGHAEI, M.; POURSHAFIE, M. R.; TALEBI, M. Antibacterial potential and genetic profile of *Enterococcus faecium* strains isolated from human normal flora. **Microbial Pathogenesis**, v. 96, p. 67–

71, 1 jul. 2016.

KIEBOOM, J.; ABEE, T. Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 15, p. 5650–5653, 2006.

KRIST, K. Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 195–203, 8 set. 1998.

KUMAR, M.; SRIVASTAVA, S. Antilisterial activity of a broad-spectrum bacteriocin, Enterocin LR/6 from *Enterococcus faecium* LR/6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 3, 2010.

LI, H.; XIE, G.; EDMONDSON, A. Evolution and limitations of primary mathematical models in predictive microbiology. **British Food Journal**, v. 8, p. 608–626, 2007.

LIANOU, A.; KAKOURI, A.; PAPPA, E. C.; SAMELIS, J. Growth interactions and antilisterial effects of the bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. cremoris M104 and *Enterococcus faecium* KE82 strains in thermized milk in the presence or absence of a commercial starter culture. **Food Microbiology**, v. 64, p. 145–154, 2017.

LUBOMÍR VALÍK; PAVEL ACAI; MEDVE, A. Application of competitive models in predicting the simultaneous growth of *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria in milk. **Food Control**, v. 87, p. 145–152, 2018.

MALAKAR, P. K.; BARKER, G. C.; ZWIETERING, M. H.; RIET, K. Van. Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 263–272, 2003.

MALHEIROS, P. S. .; BRANDELLI, A. .; NOREÑA, C. Z. .; TONDO, E. C. Acid and thermal resistance of a *Salmonella enteritidis* strain involved in several foodborne outbreaks. **Journal of Food Safety**, v. 29, n. 2009, p. 302–317, 2009.

MARTIN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; AYMERICH, T. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 98, p. 1177–1190, 2005.

MARTÍNEZ VIEDMA, P.; SOBRINO LÓPEZ, A.; BEN OMAR, N.; ABRIQUEL, H.; LUCAS LÓPEZ, R.; VALDIVIA, E.; MARTÍN BELLOSO, O.; GÁLVEZ, A. Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 244–249, 2008.

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

MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: Providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 133–153, 2002.

MOLLER, C.O.A.; IIG, Y.; AABO, S.; CHRISTENSEN, B.B.; DALGAARD, P.; HANSEN, T.B. Effect of natural microbiota on growth *Salmonella* spp. in fresh pork - A predictive microbiology approach. **Food Microbiology**, v. 34, p.284 -295, 2013.

MUÑOZ, M.; GUEVARA, L.; PALOP, A.; FERNÁNDEZ, P. S. Prediction of time to growth of *Listeria monocytogenes* using Monte Carlo simulation or regression analysis, influenced by sublethal heat and recovery conditions. **Food Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 468–475, jun. 2010.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos básicos da microbiologia preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 41–51, 2000.

PEREZ, K. J.; CECCON, R. V.; DA SILVA MALHEIROS, P.; JONG, E. V.; CESAR TONDO, E. Influence of acid adaptation on the survival of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in simulated gastric fluid and in *Rattus norvegicus* intestine infection. **Journal of Food Safety**, v. 30, n. 2, p. 398–414, 2010.

PERICONE, C. D.; OVERWEG, K.; HERMANS, P. W. M.; WEISER, J. N. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 3990-3997, 2000.

PERNI, S.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: Definition is everything. **Food Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 491–495, 2005.

POSCHET, F. Monte Carlo analysis as a tool to incorporate variation on experimental data in predictive microbiology. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 285–295, jun. 2003.

POSCHET, F.; VEREECKEN, K. M.; GEERAERD, A. H.; NICOLAÏ, B. M.; VAN IMPE, J. F. Analysis of a novel class of predictive microbial growth models and application to coculture growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1–3, p. 107–124, 2005.

ROSS, P. R.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1–2, p. 3–16, nov. 2002.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive food models in food microbiology, v. 81, n.5, p.501-508. **Journal of Applied Microbiology**, 1996.

SALVUCCI, E.; LEBLANC, J. G.; PÉREZ, G. Technological properties of lactic acid

bacteria isolated from raw cereal material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 185–191, jul. 2016.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 123–38, 31 jan. 2008.

SREEMAHADEVAN, S.; SINGH, V.; ROYCHOUDHURY, P. K.; AHAMMAD, S. Z. Biomass and Bioenergy Mathematical modeling , simulation and validation for co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 110, n. October 2017, p. 17–24, 2018.

SWINNEN, I. A. M.; BERNAERTS, K.; DENS, E. J. J.; GEERAERD, A. H.; VAN IMPE, J. F. Predictive modelling of the microbial lag phase: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137–159, 2004.

VAN IMPE, J. F.; POSCHET, F.; GEERAERD, A. H.; VEREECKEN, K. M. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1–3, p. 97–105, 2005.

VERA PINGITORE, E.; TODOROV, S. D.; SESMA, F.; GOMBOSSY DE MELO FRANCO, B. D. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 38–47, out. 2012.

VIMONT, A.; FERNANDEZ, B.; HAMMAMI, R.; ABABSA, A.; DABA, H.; FLISS, I. Bacteriocin-Producing *Enterococcus faecium* LCW 44: A high potential probiotic candidate from raw camel milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. May, p. 1–12, 2017.

WALLING, C. Fenton's reagent revisited. **Accounts of Chemical Research**, v. 8, n. 4, p. 125–131, abr. 1975.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology**, v. 10, p. 175–177, 1993.

WHITING, R. C. Microbial modeling in foods. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 35, p. 464–494, 1995.

YATES, G. T.; SMOTZER, T. On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. **Journal of Theoretical Biology**, v. 244, n. 3, p. 511–517, 2007.

**Modeling monoculture and co-culture biopreservative effects of
Enterococcus faecalis on *Salmonella enterica***

Carmelita Z. Scolforo^a, Roberta B. T. Alves^a, Maria Cristina D. Vanetti^b, Anderson S.

Sant'Ana^d, Nélío José de Andrade^a, Luís Cesar da Silva^c, Wilmer E. L. Peña^{a*}

^a Department of Food Technology, Federal University of Viçosa, Viçosa, State of Minas Gerais - Brazil.

^bDepartment of Microbiology, Federal University of Viçosa, Viçosa, State of Minas Gerais - Brazil.

^cDepartment of Agricultural Engineering, Federal University of Viçosa, Viçosa, State of Minas Gerais - Brazil.

^dDepartment of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, State of São Paulo – Brazil.

*Corresponding author: Prof. W. E.L.Peña: wilmer.pena@ufv.br. Avenida PH Rolfs, s/nº. Campus Universitário. CEP: 36570-000. Viçosa, MG, Brazil. Phone: +55(31) 3899-1851.

Abstract

Aims: This work described the behavior of *S. enterica* and *E. faecalis* in monoculture and co-culture exposed at different combinations of temperature, pH and inoculum concentrations using predictive modeling.

Methods and Results: The growth of *S. enterica* and *E. faecalis* were analyzed in monoculture and in co-culture. In order to evaluate the growth of monoculture microorganisms, temperature and pH variations were used. The experimental design was a rotational central composite with the independent variables were temperature (8.2 ° C to 41.8 ° C), pH (5.3 to 8.7) and *E. faecalis* concentration (10^2 CFU.mL⁻¹ to 10^7 CFU.mL⁻¹). Baranyi and Roberts models were adjusted for primary modeling to determine lag phase, growth rate and maximum population; and polynomial models for secondary modeling for determine growth rate in function of time.

Conclusions: Growth rate models were adjusted for monoculture and co-culture microorganisms and the presence of *E. faecalis* leads to inhibition of *S. enterica* in co-culture.

Significance and Impact of Study According: Biopreservation using *E. faecalis* is a strategy that can be used to inhibit the growth of *S. enterica*, and, this approach is relevant and innovative.

Keywords: Interaction; biocontrol; lactic acid bacteria; food preservation; predictive microbiology.

Introduction

There is growing interest in inhibiting *Salmonella*, because it can cause serious illness in individuals who ingest food contaminated by some serotypes of this genus of bacteria. The World Health Organization (WHO) estimates that *Salmonella* is responsible for 180 million of the diarrheal illnesses, each year, that occur globally and 41% of all diarrheal disease-associated deaths (WHO, 2016). *Salmonella* can be isolated from different types of foods, such as meats, eggs, spices, vegetables and fruits (Food and Drug Administration, 2012). In Brazil, between 2000 and 2014, *Salmonella* was the was the main isolated pathogen of 9,719 outbreaks, corresponding to 38.2% of the agents involved in foodborne disease outbreaks (Faúla, Soares and Dias, 2015).

Many different methods of food preservation can be used to inhibit or inactivate *Salmonella* and biopreservation is one alternative. This preservation is distinguished by the use of microorganisms and/or their metabolites to increase the shelf life of a food product without altering its sensorial and nutritional characteristics (Ross *et al.*, 2002). Bioconservation is an attractive alternative for the consumer who prefers more natural foods without the addition of chemical additives. In addition, some microorganisms used as bioprotective may impart characteristic flavors and aromas, for example lactic bacteria which are proteolytic.

In general, lactic bacteria are considered GRAS (Generally Recognized as Safe) and therefore safe for human health when used as bioprotective. The preservative effects of lactic acid bacteria is due to the production of organic acids such as acetic acid and lactic acid, that lower the pH of the medium, inhibiting competitors, besides, hydrogen peroxide and production bacteriocins (Salvucci,

LeBlanc and Pérez, 2016). *Enterococcus faecalis* is associated with human infection, but some strains have been used for decades as probiotics. In addition, this bacterium may inhibit the growth of various pathogens, such as *Salmonella* (H-Kittikun *et al.*, 2015; Kang & Lee, 2005; Kumar & Srivastava, 2010; Martínez Viedma *et al.*, 2008). Martínez *et al.* (2008) stated that temperature variations associated with the presence of enterocin AS-48, the main bacteriocin produced by *E. faecalis*, have an antimicrobial effect on *S. enterica* Enteritidis. A similar study was carried out by Molinos *et al.* (2008), which associated pH, temperature and presence of bacteriocin AS-48, for inhibition of *S. enterica* and other gram-negative pathogens. Even though some *E. faecalis* strains have potential for biopreservation, quantifying their interaction with foodborne pathogens such as *Salmonella* through the use predictive models is lacking.

Predicting the behavior of one or more microorganisms through mathematical modeling allows greater advancement of knowledge in microbiology, since modeling can minimize exhaustive laboratory work and focus efforts on obtaining new data. Studies of modeling the adjustment of co-cultures are increasing, allowing for more realistic models of the diverse natural microbiota in foods and beverages (Janssen *et al.*, 2006). Therefore, the objective of this study was to determine the growth of *S. enterica* and *E. faecalis* in monoculture and co-culture in different combinations of temperature, pH and inoculum concentration.

Materials and methods

Microorganisms

S. enterica (isolated from lettuce) (Silva, 2013) and *E. faecalis* isolated from

raw goat's milk, (Perin and Nero, 2014) were used in this study. The *E. faecalis* strain studied does not have the *cylA* and *hyl* genes, which are associated with pathogenicity (Perin and Nero, 2014). In addition, this strain has potential for biopreservation as it presents genes that encode for the production of bacteriocins and genes related to the production of adhesion proteins (Perin and Nero, 2014).

Preparation of the microbial suspensions

The strains of *S. enterica* and *E. faecalis* were kept in BHI (Brain Heart Infusion broth - Himedia, São Paulo, Brazil) at -80 °C. Before each experiment, the cells were activated by two consecutive transfer cycles in BHI broth, incubated at 35 °C for 24 hours. The cells suspensions were standardized to an absorbance of 0.1 in a spectrophotometer (Kazuaki IL-227, Japan) at 625 nm and this is equivalent to, approximately, 1×10^8 CFU.mL⁻¹. Subsequent serial dilutions were performed to bring the inoculum to the concentrations of 10^8 CFU.mL⁻¹ to 10^2 CFU.mL⁻¹ of *S. enterica* and different concentrations of *E. faecalis*, according to experimental design (Table 1). In 50 mL Falcon tubes, 30 mL of BHI with pH adjusted, according to experimental design, were inoculated with different concentrations of *E. faecalis* and the incubation occurred at different temperatures (Table 1). At various time intervals, 1 mL of each sample was withdrawn for plating, and a total of 10 to 12 points time were taken per assay.

Experimental design

The growth of *S. enterica* and *E. faecalis* were analyzed in monoculture and in coculture. To analyze the microorganisms in monoculture, the independent

variables studied were only combinations of temperature and pH. The initial concentration of each bacterium used in the experiments was 10^2 CFU.mL⁻¹.

A Central Composite Rotatable Design (CCRD) experimental design was used with three replicates at the central point (Table 1). The independent variables studied were temperature, pH and the concentration of the biopreservative culture. The temperature of 25 °C was used as central point. The pH values of the central point were selected based on the optimum growth condition of the microorganisms studied and was adjusted with 5% HCl and 5% KOH both sterilized by filtration. The concentration of *E. faecalis* varied according to the experimental design (Table 1).

Table 1 Central composite type rotational experimental design.

Test	Temperature (°C)	pH	<i>E. faecalis</i> (10 ⁶) CFU.mL ⁻¹
1	8.2	7	5
2	15	6	4
3	15	6	6
4	15	8	4
5	15	8	6
6	25	5.3	5
7	25	7	3
8	25	7	5
9	25	7	5
10	25	7	5
11	25	7	7
12	25	8.7	5
13	35	6	4
14	35	6	6
15	35	8	4
16	35	8	6
17	41.8	7	5

The number of viable cells in the culture was obtained by plating using Spiral

Plater equipment (InterScience, Saint Nom, France) in selective medium, Hektoen Agar (Kasvi, Italy) for *S. enterica* colonies count and modified MRS (Kasvi, Italy) for *E. faecalis* colonies count. The plates were incubated at 35 °C for 24 hours and further counted aiming to determine the concentration (CFU.mL⁻¹).

Analysis of growth data

The Baranyi model (Equations 1-3) (Baranyi and Roberts, 1994) was adjusted to the microbial growth data using DMFit software (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit). This, the kinetic parameters of the bacterial growth were estimated: lag time (h), growth rate (1.h⁻¹) and maximum population (log CFU.mL⁻¹).

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max} A(t) - \ln \left[1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{(N_{\max} - N_0)}} \right] \quad (\text{Equation 1})$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(\frac{e^{(-\mu_{\max} t)} + q_0}{1 + q_0} \right) \quad (\text{Equation 2})$$

$$\lambda = \frac{\ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right)}{\mu_{\max}} \quad (\text{Equation 3})$$

where $\ln(N(t))$ =ln of the cell concentration at time t; $\ln(N_0)$ = ln of the initial cell concentration (CFU.g⁻¹); $\mu_{\max}$ = exponential growth rate (1.h⁻¹); $\ln(N_{\max})$ = ln of the maximum cell concentration; q_0 = parameter that expresses the physiological state of the cell when $t = t_0$; λ = lag time (h).

Response Surface Model

The quadratic polynomial model (Equation 4) was used to describe the effects of pH, temperature and the inoculum concentration of *E. faecalis* on *S. enterica* growth rate.

$$Y = \beta_0 + pH + pH^2 + T + T^2 + In + In^2 + pH * T + pH * In + T * In$$

(Equation 4)

where β_0 is coefficients of the model; T is the temperature (°C); In is the inoculum and Y is the growth rate.

Data analysis was performed in Statistica 7.0 version program and the adjustment of the models found was assessed by significance of the coefficients of the models and the coefficient of determination (R^2).

Validation with ComBase

Some experimental data were used as input variables in the ComBase program. The results were then assessed using Pearson's correlation. For the comparison, the water activity value was set at 0.99, once the experiment was performed in liquid medium (BHI broth). In addition, tests 3, 6, 8 and 9 were excluded from the comparison, since they use pH and temperature values not available in ComBase.

Results

Modeling the growth in monocultures

The model of Barany and Roberts (1994) adjusted well the growth data of both bacteria grown in monoculture ($R^2 > 0.90$). Table 2 shows the values of the lag

time, growth rate, and the maximum population for both *S. enterica* and *E. faecalis* when in monoculture at different temperature and pH conditions.

Table 2 Lag, growth rate and maximum population values of *Salmonella* and *E. faecalis* in monoculture

Test	Variables		Lag (h)		Growth Rate (Log UFC/mL/h)		Maximum Population (10 ⁶ CFU/mL)	
	Temperature (°C)	pH	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>E</i>
1	8.2	7	1.436	39.73	0.099	0.018	8.77	6.43
2	15	6	4.491	5.17.10 ⁻⁸	0.167	0.119	8.54	8.13
3	15	8	10.151	3.55.10 ⁻⁸	0.185	0.086	8.71	8.21
4	25	5.3	3.05	6.25	0.285	0.454	8.58	7.59
5	25	7	1.78	0.55	0.379	0.251	8.55	8.45
6	25	8.7	4.73	3.87	0.396	0.355	8.67	8.43
7	35	6	0.71	1.62	0.551	0.624	8.26	8.32
8	35	8	1.16	0.41	0.626	0.870	8.49	7.45
9	41.8	7	0.58	1.76	0.710	0.765	8.60	7.85

S: *Salmonella*; *E*: *E. faecalis*

Although the lag time presented by *S. enterica* and *E. faecalis* was quite different, the growth rate and maximum population, in general, were similar. At 15 °C the lag time of *E. faecalis* is much shorter than that of *S. enterica* and the opposite occurs at a temperature of 8.2 ° C, in which *S. enterica* adapt more quickly than *E. faecalis*.

At 25 °C, the growth rate of *E. faecalis* was twice the growth rate of *S. enterica* in test 4 (pH 5.3). However, with increasing pH (trials 5 and 6) the growth rates of both bacteria became similar. In assays 7 (temperature 35 °C and pH 6) and 8 (temperature 35 °C and pH 8), both bacteria behaved in a similar manner.

However, with increasing temperature (assay 9), *E. faecalis* exhibited a larger lag time than *S. enterica*.

The growth rates obtained by using the Baranyi and Roberts model for both microorganisms were adjusted to the quadratic polynomial model as a function of pH and temperature. Equations 5 and 6 show the growth rate of *E. faecalis* and *S. enterica*, respectively. All the coefficients of the model were significant ($p < 0.05$), and the R^2 values were calculated as 0.94 for equation 5 and 0.99 for equation 6 (Table 4).

$$\mu_{E.faecalis} = 3.7988 - 0.04758 T + 0.00005 T^2 - 0.95243 \text{ pH} + 0.05693 \text{ pH}^2 + 0.0696 T * \text{pH} \quad (\text{Equation 5})$$

$$\mu_{S.enterica} = -0.70847 + 0.00582 T + 0.00008 T^2 + 0.19455 \text{ pH} - 0.01446 \text{ pH}^2 + 0.000141 T * \text{pH} \quad (\text{Equation 6})$$

where T is temperature.

Modeling of co-cultures

All *S. enterica* growth data in co-culture were well adjusted by the model of Baranyi and Roberts (1994) ($R^2 > 0.90$). When comparing values of lag time, growth rate and final population between *S. enterica* in monoculture (Table 2) and co-culture (Table 3), it was observed that in some trials, the lag phase is longer (in bold in table 3). In addition, the findings indicated that the final population is lower when the pathogen is grown in co-culture with *E. faecalis*. These data indicate

interference of *E. faecalis* in *S. enterica* highlighting its potential for biopreservation.

Table 3 Lag time, growth rate and maximum population of *Salmonella* in co-culture with *E. faecalis*.

Test	Temperature (°C)	pH	<i>E. faecalis</i> (10 ^e)	Lag (h)	Growth Rate (Log CFU/mL/h)	Maximum Population (10 ^e CFU.mL ⁻¹)
1	8.2	7	5	2.2	0.082	8.9
2	15	6	4	6.6	0.177	8.1
3	15	6	6	4.2	0.136	6.0
4	15	8	4	15.6	0.212	7.9
5	15	8	6	4.0	0.170	8.3
6	25	5.3	5	2.7	0.304	6.2
7	25	7	3	1.2	0.356	9.2
8	25	7	5	2.1	0.373	8.5
9	25	7	5	1.8	0.412	7.9
10	25	7	5	0.8	0.342	8.6
11	25	7	7	0.6	0.347	8.3
12	25	8.7	5	6.9	1.298	8.7
13	35	6	4	2.0	0.759	7.5
14	35	6	6	1.8	0.646	7.8
15	35	8	4	1.5	0.646	8.2
16	35	8	6	1.8	0.576	8.5
17	41.8	7	5	0.8	0.800	8.5

A polynomial model was obtained for the growth rate (Equation 7). According to the adjusted model for *S. enterica* growth rate in co-culture, the variables was significant with p<0.08 However, since it is not recommended to add a quadratic variable in the default of linear, this variable was incorporated into the model (Rodrigues and lemma, 2009).

$$\mu_{Salmonella} = 0.3778 + 0.2299 T + 0.1139pH + 0.1241 pH^2 - 0.0206 E - 0.0351 E^2 \quad (\text{Equation 7})$$

where T is temperature and E is concentration of *E. faecalis*.

When comparing the coefficients of the adjusted model, it can be observed that the presence of *E. faecalis* has a lower influence than temperature and pH upon *S. enterica* growth. However, the initial number of *E. faecalis* has a negative influence on the growth rate of *S. enterica*. This can be observed in the equation 7, where the coefficient E (*E. faecalis*) is negative, therefore, the greater its presence, the lower the growth rate.

Models were adjusted for growth rate and the results of the test of significance for the regression coefficients of the polynomial models are shown in Table 4.

Table 4 Regression coefficients of the polynomial models for *Salmonella* in monoculture and in co-culture with *E. faecalis*.

Parameters	Estimated Coefficient	Standard error	+95% CI	-95% CI	t-value	P-value
<u>Equation 5</u>						
Constant	3.794884	0.122456	4.09452	3.4953	30.9898	0.000000
Temperature	-0.047576	0.002125	-0.04238	-0.0528	-22.3833	0.000001
Temperature ²	0.000540	0.000023	0.00059	0.0005	23.5267	0.000000
pH	-0.952427	0.032108	-0.87386	-1.0309	-29.6635	0.000000
pH ²	0.056934	0.002244	0.06243	0.0514	25.3739	0.000000
Temperature*pH	0.006956	0.000254	0.00758	0.0063	27.3732	0.000000
<u>Equation 6</u>						
Constant	-0.708465	0.185049	-0.28174	-1.13519	-3.82852	0.005028
Temperature	0.005820	0.003459	0.01379	-0.00216	1.68288	0.130899
Temperature ²	0.000079	0.000034	0.00016	0.00000	2.29245	0.051069
pH	0.194549	0.048443	0.30626	0.08284	4.01601	0.003863
pH ²	-0.014462	0.003368	-0.00669	-0.02223	-4.29450	0.002635
Temperature*pH	0.001408	0.000426	0.00239	0.00043	3.30496	0.010779
<u>Equation 7</u>						
Constant	0.3778	0.015198	0.31238	0.44317	24.8571	0.001615
Temperature	0.2299	0.009507	0.18899	0.27079	24.1823	0.001706
pH	0.1139	0.009507	0.07308	0.15489	11.9902	0.006884
pH ²	0.1241	0.010009	0.08103	0.16716	12.3982	0.006443
<i>Enterococcus</i>	-0.0206	0.009507	-0.06153	0.02028	-2.1692	0.162310
<i>Enterococcus</i> ²	-0.0351	0.010009	-0.07820	0.00793	-3.5105	0.072438

Significant variables with probability level of 0.05; CI, confidence interval at 95% of confidence.

Discussion

The effects of temperature and pH are well studied in predictive modeling, since it is known that both influence the growth of bacteria. In this work, it was a wider temperature and pH ranges than usual for *Salmonella* grow, in order to make the modeling broader. Modeling programs for pathogens such as *Salmonella* are available in literature; however, the values used in this work were broader than are available through those sources. In the PMP (Pathogen Modeling Program), the minimum temperature at which a *Salmonella* growth model can be obtained is 10 °C and the maximum temperature is 30 °C. Using ComBase, it is possible to obtain growth curves with minimum and maximum temperature values of 7 °C and 40 °C and pH values between 3.9 and 7.4, respectively. As shown in Figure 1, a good correlation existed between the data obtained by the model of the present study and the data obtained by ComBase, which affirms the accuracy of the model built in this study.

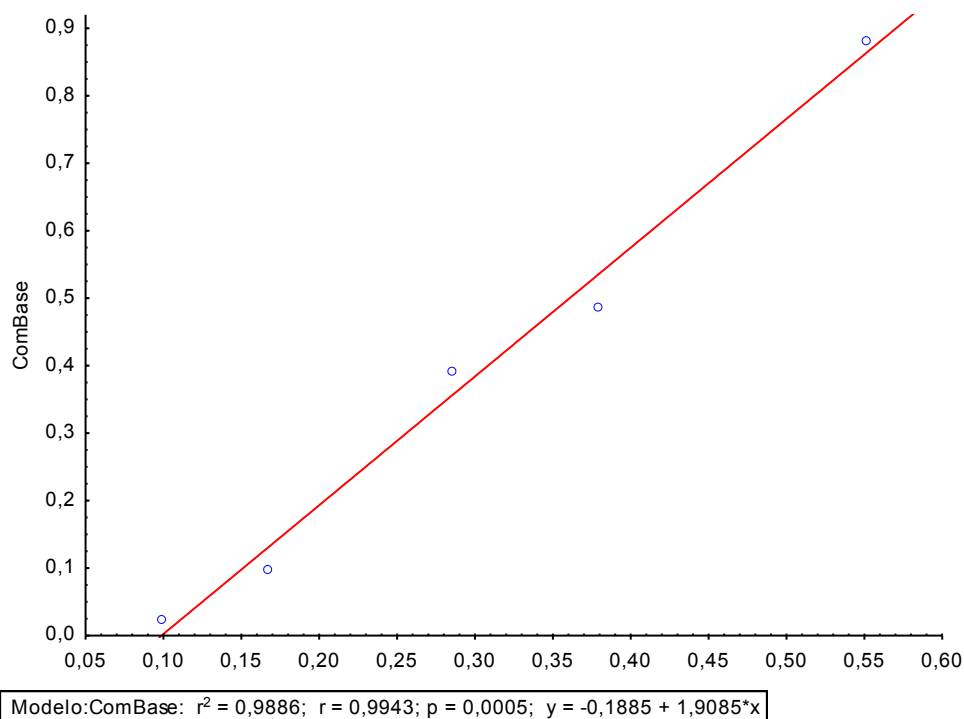


Figure 1: Pearson's correlation between experimental data of *Salmonella* and data obtained by ComBase.

Besides that, in the predictive modeling programs available in the literature, no growth and/or inhibition curves for *E. faecalis* were found. Thus, the current model can be used to predict the behavior of this microorganism's growth at a wide range of temperatures and pH values.

In some combinations of temperature and pH, the two tested bacteria presented very different behavior, as in test 1, in which the pH was optimized for the growth of bacteria (7.0) and low temperature (8.2 °C). In this assay, *S. enterica* had a higher growth rate than *E. faecalis*, in addition to the smaller lag time and a higher final population reached. These data indicate that, possibly this *S. enterica* strain is better adapted to low temperatures than *E. faecalis*. Pintar *et al.* (2007) observed the growth of *S. enterica* Typhimurium at 4 °C. According to a predictive

model adjusted by Scolforo *et al.* (2017), *S. enterica* grows at a minimum temperature calculate of 3.4 °C. Already Huang *et al.* (2017) determined the minimum growth temperature of *S. enterica* Enteritidis of 7.7 °C. Stojanović-Radić *et al.* (2018), reported that the cooling temperature does not inhibit growth *S. enterica* Enteritidis that is able to grow at cooling temperature (4°C). According with Martínez *et al.* (2003) e Huang *et al.* (2016) *Enterococcus* also grows at low temperatures and the authors observed that there microorganisms growth in temperature of 5 °C and 4 ° C, respectively. Bacteria subjected to different types of stresses activate defense mechanisms and adapt. With the reduction of temperature, the composition of membrane fatty acids changes, which allows for the survival and even growth of microorganisms (Fernández *et al.*, 2009).

According to the adjusted polynomial models (Equations 5 and 6), with increasing temperature the growth rates increased for both microorganisms. This variable exerts a greater effect on the growth rate than pH, since its coefficient is higher than the coefficient for pH.

According to Martin *et al.* (2005), *Enterococcus* are generally tolerant to low pH, as is *Salmonella*. Some authors have reported survival or growth *Salmonella* at low pH values, such as 1.5 (Perez *et al.*, 2010), 2.5 (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2010), 3.5, 4.0 and 4.5 (Malheiros *et al.*, 2009). The intracellular pH of Gram-negative bacteria, such as *Salmonella*, is in the range of 7.6-7.8 during growth. This stability is maintained by the sodium and potassium pump, which releases protons to the extracellular medium, and by the decarboxylation of amino acids (Foster, 1999). Another mechanism involved in *Salmonella* adaptation to acid is the synthesis of proteins that protect and/or repair macromolecules, known as acid

shock proteins (ASP). In addition, *Salmonella* can modify its cell membrane in the presence of acids, decreasing the levels of unsaturated fatty acids and thus membrane fluidity making it difficult for acids to enter the intracellular medium (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2009). Mechanisms of adaptation of *E. faecalis* are similar to the mechanisms described for *Salmonella* (Fernández *et al.*, 2009). Possibly these were the mechanisms that allow adaptation of *Salmonella* to the presence of *E. faecalis* in some experimental conditions.

The inhibition of *S. enterica* by the presence of *E. faecalis* is well reported in the literature (Kang and Lee, 2005; Cobo Molinos *et al.*, 2008; Martínez and Civello, 2008; H-Kittikun *et al.*, 2015; Karimaei *et al.*, 2016), but the modeling of this inhibition is less frequent. This study presents the model that reaffirms in the biopreservative effect of *E. faecalis* (Equation 7). The model showed that the influence of *E. faecalis* is about ten times lower than the other variables studied; however, with an increase in the concentration of this microorganism the growth rate of *Salmonella* decreased. According to Barbosa (2014), *Enterococcus* inhibits the growth of some microorganisms by competing for nutrients, producing lactic acid and hydrogen peroxide and/or excreting bacteriocins. Some reports in the literature have found that bacteriocins produced by lactic bacteria inhibit the growth of Gram-negative pathogens such as *Salmonella* or when associated with suboptimal conditions, such as the presence of EDTA or detergents or temperature and pH variations, among others (Jena *et al.*, 2013; Prudêncio *et al.*, 2015; Woraprayote *et al.*, 2015; Prudencio *et al.*, 2016). These conditions may cause a change in the bacterial cell membrane and facilitate the permeability of bacteriocins and, consequently, their action in the cellular interior (Abriouel,

Valdivia, Gálvez, & Maqueda, 1998; Burgos, López, Aguayo, Pulido, & Gálvez, 2013; Prudencio *et al.*, 2016; Prudencio *et al.*, 2015).

According to H-Kittikun *et al.* (2015), bacteriocins produced by *E. faecalis* inhibited the growth of *Salmonella* Montevideo and inhibited Gram-positive pathogens such as *L. monocytogenes*. Kang and Lee (2005) and Kumar and Srivastava (2010) observed the antimicrobial activity of *E. faecium* bacteriocin on Gram-positive and Gram-negative pathogens. Martínez *et al.* (2008) reported that temperature variations associated with the presence of enterocin AS-48, the main bacteriocin produced by *E. faecalis*, have an antimicrobial effect on *S. Enteritidis* caused by membrane disorganization and a combination of treatments. A similar study was carried out by Molinos *et al.* (2008), which associated pH, temperature and the presence of bacteriocin AS-48; and it was also observed the inhibition of *S. enterica* and other Gram-negative pathogens.

Therefore, in this study, as in the literature, we verified that *E. faecalis* has a potential bioconservant action and it was possible to adjust prediction model that evaluates the growth of *S. enterica* in the presence of *E. faecalis*. In addition, mathematical models were obtained to predict the growth of two bacteria, *S. enterica* and *E. faecalis*, in monoculture, in a wide range of temperature (8.2 ° C to 41.8 ° C) and pH (5.3 to 8.7). The models of monoculture and co-culture adjusted in this work can be used by other researchers and by the food industry. However, further studies need to be performed to determine the mechanisms of inhibition.

Acknowledgements

The authors would like to thank “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG” (Grant # APQ-02856-16) and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” CNPq (Grant # 302763/2014-7)

Conflict of interest: All authors contributed in some way to the execution of the work and declare that there is no conflict of interest.

References

- Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A. and Maqueda, M. (1998) Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48, *Appl Environ Microbiol*, **64**, 4623-4626.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A. and López, M. (2010) Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium, *Int Food Microbiol*, **136**, 278–282.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M. and Bernardo, A. (2009) Relationship between membrane fatty acid composition and heat resistance of acid and cold stressed *Salmonella senftenberg* CECT 4384, *Food Microbiol*, **26**, 347–353.
- Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, *Int J Food Microbiol*, **23**(3–4), 277–294.
- Barbosa, J., Borges, S. and Teixeira, P. (2014) Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food, *Int J Food Microbiol*, **191**, 144–148.
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., López, R. L., Valdivia, E., Omar, N. Ben and Gálvez, A. (2008) Combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 for inactivation of Gram-negative bacteria in soybean sprouts, *Food Chem Toxicol*, **46**, 2912–2921.
- Faúla, L. L., Soares, A. C. C. and Dias, R. S. (2015) ‘Panorama dos surtos de doença de transmissão alimentar (DTA) ocorridos em Minas Gerais, Brasil, no período de 2010 a 2014’, *Rev Saúde Públ do SUS/MG*, **3**, 84–94.
- FDA (Food and Drug Administration) (2012) Bad Bug Book: Handbook of

Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins.

Fernández, A., Álvarez-Ordóñez, A., López, M. and Bernardo, A. (2009) Effects of organic acids on thermal inactivation of acid and cold stressed *Enterococcus faecium*, *Food Microbiol*, **26**, 497–503.

Foster, J. W. (1999) When protons attack: Microbial strategies of acid adaptation, *Curr Opin Microbiol*, **2**, 170–174.

Grande Burgos, M. J., Lucas López, R., López Aguayo, M. del C., Pérez Pulido, R. and Gálvez, A. (2013) Inhibition of planktonic and sessile *Salmonella enterica* cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides, *Food Control*, **30**, 214–221.

H-Kittikun, A., Biscola, V., El-Ghaish, S., Jaffrès, E., Dousset, X., Pillot, G., Haertlé, T., Chobert, J.-M. and Hwanhlem, N. (2015) Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation, *Food Control*, **54**, 126–134.

Huang, L. and Hwang, C.-A. (2017) Dynamic analysis of growth of *Salmonella* Enteritidis in liquid egg whites, *Food Control*. Elsevier, **80**, 125–130.

Huang, Y., Ye, K., Yu, K., Wang, K. and Zhou, G. (2016) The potential influence of two *Enterococcus faecium* on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Food Control*. Elsevier Ltd, **67**, 18–24.

Janssen, M., Geeraerd, A. H., Logist, F., De Visscher, Y., Vereecken, K. M., Debevere, J., Devlieghere, F. and Van Impe, J. F. (2006) Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles', *Inter J Food Microbiol*, **111**, 59–72.

Jena, P. K., Trivedi, D., Chaudhary, H., Sahoo, T. K. and Seshadri, S. (2013) Bacteriocin PJ4 active against enteric pathogen produced by *Lactobacillus helveticus* PJ4 isolated from gut microflora of wistar rat (*Rattus norvegicus*): partial purification and characterization of bacteriocin, *Appl Biochem Biotechnol*, **169**, 2088–2100.

Kang, J. H. and Lee, M. S. (2005) Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant, *J Appl Microbiol*, **98**, 1169–1176.

Karimaei, S., Sadeghi, J., Asadian, M., Esghaei, M., Pourshafie, M. R. and Talebi, M. (2016) Antibacterial potential and genetic profile of *Enterococcus faecium* strains isolated from human normal flora, *Microbial Pathogen*, **96**, 67–71.

Kieboom, J. and Abee, T. (2006) Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *J Bacteriol*, **188**, 5650–5653

Kumar, M. and Srivastava, S. (2010) Antilisterial activity of a broad-spectrum bacteriocin, Enterocin LR/6 from *Enterococcus faecium* LR/6, *Appl Biochem Biotechnol*, **162**(3).

Malheiros, P. S. ., Brandelli, A. ., Noreña, C. Z. . And Tondo, E. C. (2009) Enteritidis Strain Involved in Several, *J Food Safety*, **29**, 302–317.

Martin, B., Garriga, M., Hugas, M. and Aymerich, T. (2005) Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages, *J Appl Microbiol*, **98**, 1177–1190.

Martínez Viedma, P., Sobrino López, A., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas López, R., Valdivia, E., Martín Belloso, O. and Gálvez, A. (2008) Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice, *Int J Food Microbiol*, **128**, 244–249.

Martínez, S., López, M. and Bernardo, A. (2003) Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells, *Lett Appl Microbiol*, **37**(6), 475–81.

Paul Ross, R., Morgan, S. and Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future, *Int J Food Microbiol*, **79**, 3–16.

Perez, K. J., Ceccon, R. V., Da Silva Malheiros, P., Jong, E. V. and Cesar Tondo, E. (2010) Influence of acid adaptation on the survival of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in simulated gastric fluid and in *Rattus norvegicus* intestine infection, *J Food Safety*, **30**, 398–414.

Perin, L. M. and Nero, L. A. (2014) Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*, *BMC Microbiology*. **14**, 36.

Pintar, K., Cook, A., Pollari, F., Ravel, A., Lee, S. and Odumeru, J. A. (2007) Quantitative effect of refrigerated storage time on the enumeration of *Campylobacter*, *Listeria*, and *Salmonella* on artificially inoculated raw chicken meat., *J Food Protect*, **70**(3), 739–43.

Prudêncio, C., Cristina, M., Vanetti, D. and Prieto, M. (2015) Tolerance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to nisin combined with EDTA is accompanied by changes in cellular composition, *FRIN*, **69**, 281–288.

Prudencio, C. V., Mantovani, H. C., Cecon, P. R., Prieto, M., Cristina, M. and Vanetti, D. (2016) Temperature and pH influence the susceptibility of *Salmonella Typhimurium* to nisin combined with EDTA, *Food Control*, **61**, 248–253.

Rodrigues, M. I. and Iemma, A. F. (2009) *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 2^aEd. Edited by C. Editora. Campinas.

Salvucci, E., LeBlanc, J. G. and Pérez, G. (2016) Technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw cereal material, *LWT - Food Sci Technol*, **70**, 185–191.

Scolforo, C. Z., Bairros, J. V., Rezende, A. C. B., Silva, B. S., Alves, R. B. T., Costa, D. S., Andrade, N. J., Sant'Ana, A. S. and Pena, W. E. L. (2017) Modeling the fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the pulp and on the outer rind of canary melons (*Cucumis melo* (Indorus Group)), *LWT - Food Scie. Technol.* Elsevier Ltd, **77**, 290–297.

Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Joković, N., Jakanović, M., Ivić, M., Šojić, B., Škaljac, S., Stojanović, P. and Mihajlov-Krstev, T. (2018) Inhibition of *Salmonella* Enteritidis growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination, *Food Control.* Elsevier, **90**, 332–343.

WHO (2016) 'WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015'.

Woraprayote, W., Pumpuang, L., Tosukhowong, A., Roytrakul, S., Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K., Benjakul, S. and Visessanguan, W. (2015) Two putatively novel bacteriocins active against Gram-negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293, *Food Control.* Elsevier Ltd, **55**, 176–184.

Modelagem do crescimento de *Listeria monocytogenes* em monocultura e em co-cultura com *Enterococcus faecalis*

Carmelita Zacchi Scolforo^a, Maria Cristina Dantas Vanetti^b, Nélío José de Andrade^a, Luis Cesar da Silva^c Wilmer Edgard Luera Peña^{a*},

^a Departamento de Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

^b Departamento de Microbiologia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

^c Departamento de Engenharia Agrícola – Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.

* Autor correspondente

Email: carmelitazs@yahoo.com.br, mvanetti@ufv.br, nandrade@ufv.br, silvaluisc@yahoo.com, and@unicamp.br, wilmer.pena@ufv.br

RESUMO

O antagonismo entre micro-organismos é utilizado como método de conservação de alimentos, denominado de bioconservação e este pode ser avaliado por meio de modelagem matemática. Deste modo, foi estabelecido como objetivo desse estudo foi modelar o crescimento de *Listeria monocytogenes* em monocultura e em co-cultura com *Enterococcus faecalis*. Para a obtenção dos dados foi empregado o delineamento experimental do tipo composto central rotacional, tendo como variáveis independentes: temperatura, pH e concentração de *E. faecalis*. Neste estudo foram determinadas a fase lag, as taxas de crescimento e a população máxima de *L. monocytogenes* isoladamente e em co-cultura com diferentes concentrações de *E. faecalis* (10^3 UFC.mL⁻¹ a 10^7 UFC.mL⁻¹). Para a modelagem da fase lag e taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura foram ajustados modelos polinomiais de segunda ordem. Para os experimentos de co-cultura foram utilizados modelo polinomial e a Simulação de Monte Carlo, a qual verifica a probabilidade de ocorrência das taxas de crescimento obtidas experimentalmente. Todos os modelos foram ajustados e validados em meio de cultura. Os modelos de fase lag e taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura abrangem ampla faixa de temperatura (8,2 °C a 41,8 °C) e pH (5,3 a 8,7). Há indícios de que *E. faecalis* tem potencial bioconservante, uma vez que houve redução da população máxima de *L. monocytogenes* quando em co-cultura, além do aumento da fase lag e a redução da taxa de crescimento. A Simulação de Monte Carlo tem como vantagem a obtenção de probabilidades de ocorrência e não apenas valores pontuais como nos modelos polinomiais. Por isso, ambos os métodos de análise são ferramentas que precisam ser mais utilizadas pelos pesquisadores e pelas indústrias de alimentos no gerenciamento de riscos e tomada decisões baseadas em probabilidades e predições.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, microbiologia preditiva, co-cultura.

INTRODUÇÃO

A bioconservação é caracterizada pelo uso de micro-organismos ou de metabólitos produzidos por micro-organismos para aumentar a vida de prateleira de um produto (ROSS, MORGAN e HILL, 2002). As bactérias láticas são as mais estudadas como bioconservantes de alimentos. Este grupo é composto por bactérias ubíquas, gram-positivas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos (STILES e HOLZAPFEL, 1997; MANCHA AGRESTI *et al.*, 2012). Dentre as bactérias láticas, *Enterococcus* spp. é um dos gêneros mais estudados para o controle biológico de bactérias patogênicas como *L. monocytogenes* (BIGWOOD *et al.*, 2012; VERA PINGITORE *et al.*, 2012; AHMADOVA *et al.*, 2013; BARBOSA; BORGES; TEIXEIRA, 2014; COELHO *et al.*, 2014; DAILEY; MARTIN; SMILEY, 2014; HUANG *et al.*, 2016; ASPRI *et al.*, 2017; LIANOU *et al.*, 2017; VIMONT *et al.*, 2017).

Pingitore e colaboradores (2012) verificaram que *Enterococcus mundtii* inibiu o crescimento de *L. monocytogenes*, em queijos Minas. No estudo, foram inoculados 10^3 UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* e, ao final do experimento, esta população aumentou para 10^8 UFC.g⁻¹, no entanto, ao inocular 10^6 UFC.g⁻¹ de *E. mundtii* a população do patógeno permaneceu igual a população inicial, ou seja, 10^3 UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*. Em outro estudo, a população de 10^5 UFC.mL⁻¹ e de 10^6 UFC.mL⁻¹ de *E. mundtii* foi responsável por manter e reduzir, respectivamente, a população de *L. monocytogenes* em meio de cultura e em salmão defumado mantido sob refrigeração (5 ° C e 10 ° C) (BIGWOOD *et al.*, 2012). Duas estirpes de *E. faecalis* foram responsáveis por reduzir, aproximadamente, quatro ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* em queijo mantidos sob refrigeração, enquanto que no controle positivo (*L. monocytogenes* cultivada na ausência de *E. faecalis*) houve um aumento de quatro ciclos logarítmicos do patógenos (COELHO *et al.*, 2014). Dailey e colaboradores (2014) verificaram que *E. faecalis* foi responsável pela diminuição de dois e três ciclos logarítmicos na população final de *L. monocytogenes* e *E. faecium* resultou em uma diminuição de um a dois ciclos logarítmicos deste patógeno, em leite mantido sob refrigeração (4 °C). De acordo com Vimont e colaboradores (2017), a população

de *L. monocytogenes* foi reduzida em dois ciclos logarítmicos após 24 h em co-cultura com *E. faecium* LCW 44, em comparação com o aumento de quatro ciclos logarítmicos quando cultivado em monocultura.

A presença de *Enterococcus* pode inibir o crescimento de *L. monocytogenes* pela competição por nutrientes e, ou produção de bacteriocinas e outros metabólitos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, dentre outros (SALVUCCI; LEBLANC; PÉREZ, 2016). Para inferir sobre esse nível de inibição com segurança, o uso da modelagem matemática e estatística é uma alternativa, pois confere agilidade na avaliação do comportamento de micro-organismo possibilitando o estabelecimento de estratégias para o estabelecimento de segurança alimentar. A microbiologia preditiva é uma ferramenta utilizada para prever o comportamento de um ou mais micro-organismos em diferentes condições (WHITING, 1995). Já a Simulação de Monte Carlo trata de uma experimentação com modelo primário ou secundário em que os fatores extrínsecos são descritos por distribuição de probabilidades. O emprego da Simulação de Monte Carlo, quando aplicados para condição de uso na qual foram devidamente verificados e validados, possibilita a redução do tempo em atividades laboratoriais, o que traz redução de custos. Desse modo, ao utilizar os modelos, deve-se certificar que as condições experimentais, como temperatura, pH e presença de outros micro-organismos, são coincidentes com as condições do processamento de alimentos, para que a predição seja segura.

A maioria dos estudos de modelagem do crescimento microbiano é conduzida em culturas puras desconsiderando as interações com outros micro-organismos que ocorrem naturalmente ou intencionalmente nos alimentos (MCMEEKIN; ROSS; OLLEY, 1992; TAUB *et al.*, 2003; GIMÉNEZ; DALGAARD, 2004; ARYANI *et al.*, 2015; SCOLFORO *et al.*, 2017; DE CESARE *et al.*, 2018). A modelagem de co-cultura representa, de forma mais real, o comportamento de um micro-organismo, pois considera as interações entre populações microbianas. Estas interações podem provocar inibições, por competição de substrato e, ou produção de metabólitos (VAN IMPE *et al.*, 2005); além de favorecer simbiose, ou seja, interações benéficas para ambos os micro-organismos (ZOMORRODI;

SEGRÉ, 2016). Deste modo, foi estabelecido como objetivo deste estudo, o emprego da modelagem preditiva e Simulação de Monte Carlo para avaliar o crescimento de *L. monocytogenes* em ampla variação de temperatura (8,2 °C a 41,8 °C) e pH (5,3 a 8,7), além de avaliar o crescimento de *L. monocytogenes* em co-cultura com diferentes concentrações de *E. faecalis* (10^3 UFC.mL⁻¹ a 10^7 UFC.mL⁻¹).

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismos e meios de cultura

As cepas isoladas e sequenciadas utilizadas neste trabalho foram: *L. monocytogenes*, isolado de melão (SOUZA, 2013) e *E. faecalis*, isolado de leite de cabra cru (PERIN; NERO, 2014), ambas as culturas foram mantidas a – 80 °C, em ultrafreezer até o momento do experimento.

A estirpe de *E. faecalis* estudada tem potencial ação bioconservante pois apresenta genes que são responsáveis por codificar a produção de bacteriocinas e não possui os genes *cylA* e *hyl*, associados a patogenicidade desta espécie (PERIN; NERO, 2014).

Preparo das suspensões microbianas

As bactérias foram repicadas duas vezes consecutivas em BHI (Infusão de Cérebro e Coração, Kasvi, Itália) e incubadas a 37 °C por 24 h. Após o crescimento, foi realizada a padronização, em BHI, a 0,1 de absorbância, em espectrofotômetro (Kazuaki IL-227), em comprimento de onda de 625 nm, o que corresponde a, aproximadamente, 10^8 UFC.mL⁻¹. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas para obtenção dos inóculos nas concentrações a serem estudadas. Cada ensaio foi realizado em um tubo Falcon contendo 30 mL de BHI com pH ajustado. As amostras foram incubadas, em diferentes temperaturas, conforme o delineamento experimental (Tabela 1 e 2).

Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o Composto Central Rotacional (DCCR). Para monocultura foram utilizadas duas variáveis, três repetições no ponto central e dois pontos axiais, totalizando 11 ensaios. Já para ensaio em co-cultura foram utilizadas três variáveis, três pontos centrais e seis pontos axiais, totalizando 17 tratamentos ($2^k+2.k+pc$). Os tratamentos estão descritos na Tabela 1 e 2. As variáveis utilizadas foram: temperatura (°C), pH e concentração do inóculo.

Tabela 1 – Delineamento experimental para determinação do crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura

Ensaio	Temperatura (°C)	pH
1	8,2	7
2	15	6
3	15	8
4	25	5,3
5	25	7
6	25	7
7	25	7
8	25	8,7
9	35	6
10	35	8
11	41,8	7

Tabela 2 – Delineamento experimental para avaliar o crescimento de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis*.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	<i>E. faecalis</i> (Log UFC.mL ⁻¹)
1	8,2	7	5
2	15	6	4
3	15	6	6
4	15	8	4
5	15	8	6
6	25	5,3	5
7	25	7	3
8	25	7	5
9	25	7	5
10	25	7	5
11	25	7	7
12	25	8,7	5
13	35	6	4
14	35	6	6
15	35	8	4
16	35	8	6
17	41,8	7	5

O ponto central da variável temperatura foi de 25 °C, para representar temperatura ambiente, e para o pH o valor 7,0, por ser valor ótimo de crescimento dos micro-organismos estudados. Os ajustes dos valores de pH foram feitos com HCl 5% e KOH 5%. A concentração de *E. faecalis* adotada para o ponto central foi 10⁵ UFC.mL⁻¹ e os demais valores foram estabelecidos conforme o delineamento experimental. A população inicial inoculada de *L. monocytogenes* foi em torno de 10² UFC.mL⁻¹.

O crescimento bacteriano em aerobiose foi monitorado por plaqueamento em *Spiral Plater* (InterScience, Saint Nom, France) em meio seletivo ágar Oxford (Kasvi, Itália) para contagem de colônias de *L. monocytogenes* e em ágar MRS modificado (Kasvi, Itália) para determinação de *E. faecalis*. O número de unidades formadoras de colônias foi determinado em intervalos de tempo, com total de 10 a 12 pontos por tratamento, sendo que em cada ponto foi retirada uma alíquota de 1 mL. O intervalo de tempo foi estipulado com base no programa PMP (Pathogen

Modeling Program) versão 7.0, que estabelece curvas de crescimento para patógenos em culturas puras. Por isso, para cada ensaio experimental foi estabelecido um tempo diferente, uma vez que, dependendo das condições experimentais (temperatura e pH), o micro-organismo alcança a fase estacionária em diferentes tempo de incubação. Para os ensaios de co-cultura o tempo máximo experimental foi estabelecido como 17 dias.

Análise dos dados experimentais

Modelo de Barany e Roberts

Os dados de multiplicação microbiana foram ajustados ao modelo de Baranyi (Baranyi e Roberts, 1995) (Equações 1-3). Para tanto o *software* DMFit, cedido pelo Dr. Baranyi (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit), foi usado.

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max} A(t) - \ln \left[1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{(N_{\max} - N_0)}} \right] \quad \text{Equação 1;}$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(\frac{e^{(-\mu_{\max} t)} + q_0}{1 + q_0} \right) \quad \text{Equação 2;}$$

$$\lambda = \frac{\ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right)}{\mu_{\max}} \quad \text{Equação 3;}$$

Em que: $\ln(N(t))$ [$\ln(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$] é o logaritmo natural da concentração de células no tempo t [h]; $\ln(N_0)$ é o logaritmo natural da concentração inicial de células; $\mu_{\max}$ [$1 \cdot \text{h}^{-1}$] é a taxa máxima específica de multiplicação; $\ln(N_{\max})$ é o logaritmo natural da concentração máxima de células; q^0 [-] é uma medida do estado fisiológico da célula quando $t=t_0$.

Modelo polinomial de superfície de resposta

Os dados de tempo lag e taxa de crescimento foram ajustados a um

polinômio de segunda ordem (Equação 4) utilizando o programa SAS versão 9.0 licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 T^2 + \beta_3 pH + \beta_4 pH^2 + \beta_5 in + \beta_6 in^2 + \beta_7 T * pH + \beta_8 T * in + \beta_9 pH * in$$

Equação 4

Onde β_0 e β_{1-9} são coeficientes do modelo; T é a temperatura (°C); in é o inóculo de *E. faecalis* e Y é a taxa de crescimento ou tempo de fase lag.

Validação dos modelos

Para validação dos modelos foram conduzidos 12 ensaios empregando combinações aleatórias de temperatura, pH e concentração de *E. faecalis*. Para tanto, uma alíquota de 30 mL de BHI foi transferida para tubo Falcon esterilizado e inoculada, com aproximadamente, 10^2 UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes* e 10^4 UFC.mL⁻¹ de *E. faecalis*. As amostras foram incubadas em temperaturas de 22, 30 e 37 °C. O plaqueamento foi realizado por *Spiral Plater* em intervalos de tempos pré-determinados, sendo que para cada tempo, uma alíquota de 1 mL foi retirada. Também foram calculados os índices estatísticos fator BIAS e fator exatidão.

Simulação de Monte Carlo

Para a Simulação de Monte Carlo foi estruturado um modelo computacional empregando a equação ajustada do modelo secundário que descreve a taxa de crescimento. Para implementação do modelo computacional foi utilizado o programa ExtendTM versão 4.1.3C. Como variáveis de entrada foram consideradas a temperatura, pH concentração de *E. faecalis* e os coeficientes da equação polinomial do modelo secundário que descrevem $\mu_{\text{máx}}$ (taxa máxima de crescimento).

Os valores de temperatura, pH concentração de *E. faecalis* foram tomados como variáveis do tipo determinístico e corresponde ao valores empregados na definição dos tratamentos. Enquanto os valores dos coeficientes

da equação polinomial do modelo secundário foram tratados como variáveis aleatórias descritas por uma distribuição Normal truncada tendo por parâmetros a média, desvio padrão e os valores mínimo e máximo. Os valores desses parâmetros foram definidos por meio do programa SAS versão 9.0, ao se ajustar os modelos secundários.

A Simulação de Monte Carlos se deu por meio de 10.000 replicações do modelo para o cálculo da variável de saída, a taxa de crescimento, segundo cada uma das condições estabelecidas no delineamento do experimento. Para os valores da taxa de crescimento foram calculadas as probabilidades de ocorrência empregando o programa Microsoft Excel[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Modelagem do crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura*

Na tabela 3 são apresentados os valores estimados de duração da fase lag (h), taxa de crescimento (UFC/mL/h), população máxima (UFC.mL⁻¹) e coeficiente de determinação, segundo modelo de Baranyi e Roberts para determinação do crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura em diferentes condições experimentais de temperatura (8,2 °C a 41,8 °C) e pH (5,3 a 8,7). Os valores do coeficiente de determinação (R²) obtidos permitem o ajuste adequado dos dados. Alguns destes dados, como fase lag e taxa de crescimento, podem ser comparados com dados de programas existentes, no entanto, este estudo abrange maiores faixas de temperatura e pH do que já é encontrado na literatura. No *software* Pathogen Modeling Program (PMP), a faixa de temperatura encontrada é de 4 °C a 37 °C e pH de 4,5 a 7,5. Como pode ser observado nos ensaios 3, 8, 10 e 11, *L. monocytogenes* cresce e atinge alta população máxima fora dessa faixa de pH e temperatura (Tabela 3). Além disso, neste estudo, a população inicial de células de *L. monocytogenes* foi em torno de 10² UFC.mL⁻¹, ao passo que no PMP a concentração mínima inicial é de 10³ UFC.mL⁻¹.

Para que os modelos de predição sejam seguros é recomendado utilizá-los para condições experimentais que estejam dentro da faixa estudada, por exemplo,

o modelo deste estudo é seguro para condições em que a temperatura varia de 8,2 °C a 41,8 °C. Fora desta faixa não é recomendado sua utilização. Por isso, é relevante a obtenção de modelos abrangendo maiores faixas de variação das variáveis independentes.

Tabela 3 – Fase lag, taxa de crescimento, população máxima e coeficiente de determinação, obtidos segundo o modelo de Baranyi e Roberts aplicados a curvas de crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura.

Ensaio	Delineamento experimental		Lag (h)	Taxa de Crescimento (Log UFC/mL/h)	População máxima (Log UFC.mL ⁻¹)	R ²
	Temperatura (°C)	pH				
1	8,2	7	148,060	0,0233	5,2	0,980
2	15	6	3,340	0,1247	8,7	0,994
3	15	8	1,730	0,0593	6,1	0,998
4	25	5,3	5,508	0,1299	8,3	0,994
5	25	7	3,258	0,2449	8,7	0,988
6	25	7	5,128	0,2114	8,5	0,993
7	25	7	4,588	0,2274	7,9	0,983
8	25	8,7	2,351	0,1784	9,3	0,999
9	35	6	2,736	0,4534	8,4	0,997
10	35	8	2,196	0,4551	8,2	0,999
11	41,8	7	1,976	0,6285	8,2	0,994

As equações 5 e 6, representam os modelos ajustado para fase lag e taxa de crescimento, respectivamente, de *L. monocytogenes* em monocultura. O coeficiente de determinação, o qual indica ajuste do modelo, foi de 0,68 (Equação 5) e 0,98 (Equação 6). Todos os coeficientes foram significativos (p<0.05) tanto no nível linear como no nível quadrático, ou seja, todas as variáveis independentes do modelo exercem influencia sobre as variáveis dependentes (Tabela 5).

$$Lag_M = 122,8661 - 14,1606 T + 0,2323 T^2 + 24,6710 pH - 1,8171 pH^2$$

(Equação 5)

$$\mu_M = -1,1351 - 0,0005 T + 0,0004 T^2 + 0,3275 pH - 0,0233 pH^2$$

(Equação 6)

O gráfico de Pareto (Figura 1), definido como o efeito padronizado do coeficiente estimado dividido pelo erro padrão, mostrou que qualquer efeito que excedeu a linha vertical ($p=0,05$) foi considerado relevante. Assim, a temperatura exerceu maior influência na fase lag e na taxa de crescimento. Estes resultados reforçam que temperatura é uma das variáveis mais influentes no crescimento deste micro-organismo, no entanto, outras variáveis, como pH, também influenciam no crescimento de *L. monocytogenes* (LEE *et al.*, 2014; SCOLFORO *et al.*, 2017; DE CESARE *et al.*, 2018; NYHAN *et al.*, 2018).

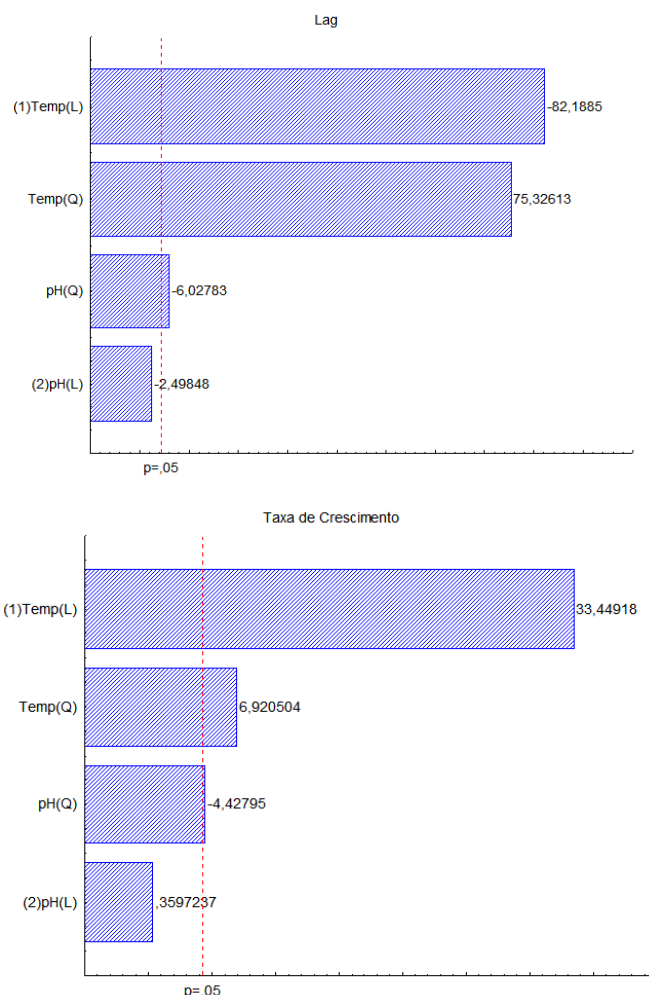


Figura 1 – Gráfico de Pareto da fase lag e taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura, com valores estimados dos coeficientes, sendo (L): linear e (Q): quadrático.

L. monocytogenes cresce em ampla faixa de temperatura, 0,5 °C a 45 °C (LADO; YOUSEF, 2007), no entanto, a fase lag e a taxa de crescimento sofrem influência da temperatura. A maior fase lag, menor taxa de crescimento e a menor população final alcançada por *L. monocytogenes* em monocultura foram observadas no ensaio em que foi utilizada menor temperatura (8,2 °C). Portanto, a baixa temperatura influenciou no tempo de adaptação de *L. monocytogenes*, que foi maior nesta condição. Além disso, houve redução da velocidade de crescimento quando comparadas com as taxas de crescimento obtidas em temperaturas maiores (ensaios 2 – 11). Outro efeito da temperatura foi a obtenção da menor população máxima alcançada comparados as outras condições experimentais. Ao analisar apenas a variável temperatura, é possível observar que a taxa de crescimento aumenta com aumento da temperatura. As temperaturas estudadas (8,2 °C a 41,8 °C) neste trabalho podem contribuir para aplicação do modelo em alimentos armazenados em temperatura ambiente ou alimentos refrigerados submetidos a temperaturas de abuso. Estes modelos podem ser utilizados para a predição do tempo de lag e taxa de crescimento de *L. monocytogenes*, em frutas e hortaliças por exemplo.

Além da temperatura, o pH é uma variável que também afeta o comportamento deste patógeno. Segundo Wemmenhove e colaboradores (2018), ambas são as variáveis mais relevantes para o crescimento de *L. monocytogenes*. Ao observar os ensaios 4 ao 8, todos com a mesma temperatura (25 °C), é possível verificar a influência do pH no comportamento de *L. monocytogenes*, ou seja, observa-se que quanto maior o pH, menor a fase de adaptação do micro-organismo e maior a população máxima alcançada. Estes dados corroboram com dados da literatura, os quais indicam que quanto maior a temperatura e pH, maior a velocidade de crescimento de *L. monocytogenes* (MUÑOZ *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2014; SCOLFORO *et al.*, 2017; DE CESARE *et al.*, 2018; NYHAN *et al.*, 2018; WEMMENHOVE *et al.*, 2018).

Modelagem do crescimento de L. monocytogenes em co-cultura com E. faecalis

Na tabela 4 são apresentados os valores de fase lag, taxa de crescimento,

população inicial e população máxima e coeficiente de determinação de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis*. Os dados experimentais dos ensaios 1 e 11 não foram ajustados segundo modelo de Baranyi e Roberts, uma vez que *L. monocytogenes* não cresceu até 408 horas, tempo de duração máximo do experimento. No entanto, para realizar a modelagem secundária foi atribuída a taxa de crescimento de 0,0010 log UFC/mL/h. Não houve crescimento de *L. monocytogenes* nas condições estabelecidas no ensaio 1, provavelmente pelo efeito combinado de dois estresses: baixa temperatura (8,2 °C) e presença do competidor *E. faecalis* na população de 10^5 UFC.mL⁻¹. No ensaio 11, a população inicial de *E. faecalis* foi de 10^7 UFC.mL⁻¹, ou seja, o ensaio em que utilizou maior concentração do competidor. Malakar e colaboradores (2003) afirmaram que para ocorrer inibição de *L. monocytogenes* é fundamental que se tenha alta densidade populacional da cultura bioconservadora (10^8 UFC.mL⁻¹).

As menores taxas de crescimento obtidas foram observadas nos ensaios 1, 6 e 11, assim como os menores aumentos de população em ciclos logarítmicos, ao comparar população inicial e final. No ensaio 1 observa-se a menor temperatura utilizada, fato que diminuiu a velocidade de crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura, associado a presença de um competidor, co-cultura, não houve crescimento do patógeno. No ensaio 6, condição em que foi utilizado o menor pH experimental, também foi obtida taxa de crescimento baixa. Estes dados corroboram com os dados de crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura, que demonstrou que este valor baixo de pH diminui a velocidade de crescimento (ensaios 4 – 8). Além disso, quando associado a *E. faecalis* a taxa foi menor do que a taxa de *L. monocytogenes* em monocultura. No ensaio 11, em que foi utilizada maior população do competidor, não houve crescimento do patógeno, portanto foi estabelecida taxa de crescimento igual a do ensaio 1, a fim de ajuste de modelo polinomial.

Tabela 4 - Fase lag, taxa de crescimento, população inicial, população máxima e coeficiente de determinação de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis*

Ensaio	Delineamento Experimental			Lag	Taxa de Crescimento	População inicial	População máxima	R ²
	Temperatura	pH	<i>E. faecalis</i>					
1	8,2	7	5	408	0,0010	2,6	2,3	-
2	15	6	4	13,741	0,0546	3,8	5,7	0,990
3	15	6	6	*	0,0384	2,3	6,8	0,993
4	15	8	4	9,007	0,0301	2,1	6,4	0,951
5	15	8	6	*	0,0246	2,2	7,5	0,969
6	25	5,3	5	*	0,0031	2,5	2,9	0,540
7	25	7	3	2,988	0,2140	2,4	5,2	0,939
8	25	7	5	3,961	0,2025	2,1	7,8	0,965
9	25	7	5	3,664	0,2523	2,5	6,3	0,929
10	25	7	5	3,325	0,2323	2,6	7,4	0,997
11	25	7	7	408	0,0010	2,3	2,8	-
12	25	8,7	5	4,138	0,1502	2,6	8,2	0,998
13	35	6	4	*	0,1131	2,6	7,7	0,926
14	35	6	6	*	0,1190	2,5	7,9	0,995
15	35	8	4	1,440	0,3572	2,6	7,5	0,991
16	35	8	6	1,755	0,3724	2,6	7,8	0,980
17	41,8	7	5	1,784	0,7096	2,1	4,9	0,940

OBS: Temperatura (°C); Concentração de *E. faecalis* (log UFC.mL⁻¹); Taxa de crescimento (log UFC/mL/h); Lag (h); População inicial e máxima: (log UFC.mL⁻¹); * Não foi possível ajustar lag para estes ensaios.

A maior taxa de crescimento, de 0,7096, foi encontrada no delineamento com temperatura de 41,8 °C, assim como quando *L. monocytogenes* foi cultivada em monocultura, quando apresentou taxa de crescimento de 0,6285. Mesmo com taxas de crescimento elevadas, quando em temperatura de 41,8 °C, *L. monocytogenes*, em co-cultura, alcançou a população máxima 4,9 log UFC.mL⁻¹ (Tabela 4). Este valor é cerca de três ciclos logarítmicos menor do que o observado quando este patógeno foi cultivado em monocultura, que foi de 8,2 log UFC.mL⁻¹ (Tabela 3). Este resultado demonstra que a presença de *E. faecalis*, embora não altere a taxa de crescimento, limita a população final de *L. monocytogenes*, o que sugere efeito bioconservante de *E. faecalis*.

As taxas de crescimento de *L. monocytogenes* em co-cultura foram menores do que as taxas de crescimento quando em monocultura, com exceção no ensaio 17, maior temperatura. No entanto, ao comparar os dados de população máxima, nas Tabelas 3 e 4, observa-se que em co-cultura, esta é sempre menor

do que a população máxima alcançada quando o patógeno é cultivado isoladamente, nas mesmas condições de temperatura e pH. Exceção foi observada nos ensaios 4 e 5, em que a população final de *L. monocytogenes* foi maior em co-cultura, mas não representa nem um ciclo logarítmico a mais. Portanto, a presença do bioconservante reduz a população máxima do patógeno, o que indica potencial ação bioconservante.

Monnet e colaboradores (2010) verificaram redução de até cinco ciclos logarítmicos de *Listeria* quando cultivada em co-cultura com bactérias lácticas. Duas estirpes de *E. faecalis* foram responsáveis por reduzir, aproximadamente, quatro ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* em queijo mantidos sob refrigeração, enquanto que no controle positivo, ou seja, *L. monocytogenes* cultivada na ausência de *E. faecalis*, houve um aumento de quatro ciclos logarítmicos do patógenos. Os autores verificaram que todos os queijos produzidos com culturas de *E. faecalis* apresentaram sabor e aceitabilidade geral semelhantes ao queijo controle, sem adição da cultura protetora (COELHO *et al.*, 2014). Dailey e colaboradores (2014) também observaram que a presença de *E. faecalis* resultou em diminuição de dois a quatro ciclos logarítmicos na população final de *L. monocytogenes*. Neste estudo houve redução de até cinco ciclos logarítmicos (ensaio 11), quando comparado a população final de *L. monocytogenes* em monocultura e em co-cultura.

Modelagem secundária

A equação 7 foi ajustada para a taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis*, em que todos os coeficientes foram significativos a 5% de probabilidade e R^2 de 0,88, como pode ser observado na Tabela 5.

$$\mu_c = -2,9449 - 0,0493 T + 0,0003 T^2 + 0,7631 pH - 0,0627 pH^2 + 0,3275 E - 0,03542 E^2 + 0,0067 T \times pH \quad (\text{Equação 7})$$

Tabela 5 - Coeficiente de regressão dos modelos polinomiais de *L. monocytogenes* em monocultura e em co-cultura com *E. faecalis*.

Parametros	Coeficiente estimado	Erro padrão	+95% IC	-95% IC	t-valor	P-valor
<u>Equação 5</u>						
Constante	122,8661	15,3994	218,4248	27,3074	7,9786	0,01535
Temperatura	-14,1606	0,1573	-13,1847	-15,1366	-90,039	0,00012
Temperature ²	0,2323	0,0031	0,2514	0,2132	75,3261	0,00018
pH	24,6710	4,2316	50,9292	-1,5873	5,8302	0,02818
pH ²	-1,8171	0,3015	0,0535	-3,6877	-6,0278	0,02644
<u>Equação 6</u>						
Constante	-1,13512	0,26829	0,01924	-2,28947	-4,2309	0,05158
Temperatura	-0,00054	0,00274	0,01125	-0,01233	-0,1965	0,86240
Temperatura ²	0,00037	0,00005	0,00060	0,00014	6,9205	0,02025
pH	0,32750	0,07372	0,64470	0,01030	4,4424	0,04712
pH ²	-0,02326	0,00525	-0,00066	-0,04585	-4,4279	0,04741
<u>Equação 7</u>						
Constante	-2,94490	0,47508	-0,90079	-4,98900	-6,1987	0,02505
Temperatura	-0,04927	0,00732	-0,01779	-0,08075	-6,7336	0,02135
Temperatura ²	0,00034	0,00008	0,00067	0,00001	4,4701	0,04657
pH	0,76306	0,10738	1,22507	0,30106	7,1064	0,01923
pH ²	-0,06279	0,00749	-0,03056	-0,09501	-8,3834	0,01393
<i>Enterococcus</i>	0,32754	0,05609	0,56886	0,08622	5,8400	0,02809
<i>Enterococcus</i> ²	-0,03542	0,00557	-0,01144	-0,05940	-6,3551	0,02388
Temperatura*pH	0,00670	0,00089	0,01051	0,00288	7,5573	0,01706

Variáveis significativas a nível de 5 % de probabilidade; IC é Intervalo de Confiança.

A influência das variáveis sob a taxa de crescimento de co-cultura pode ser observada na Figura 2 sendo que, quanto maior a temperatura, na faixa de pH de 4 a 9, maior é a taxa de crescimento (Figura 2a). A temperatura tem maior influência na taxa de crescimento do que a presença do bioconservante, como pode ser observada na Figura 2b. Ao analisar a concentração de *E. faecalis* e pH pode-se concluir que ambos exercem influência na taxa de crescimento (Figura 2c). Estes dados corroboram com os dados encontrados do crescimento de *L.*

monocytogenes em monocultura, os quais indicam que temperatura é a variável de maior influencia, dentre as variáveis estudadas, para esta bactéria.

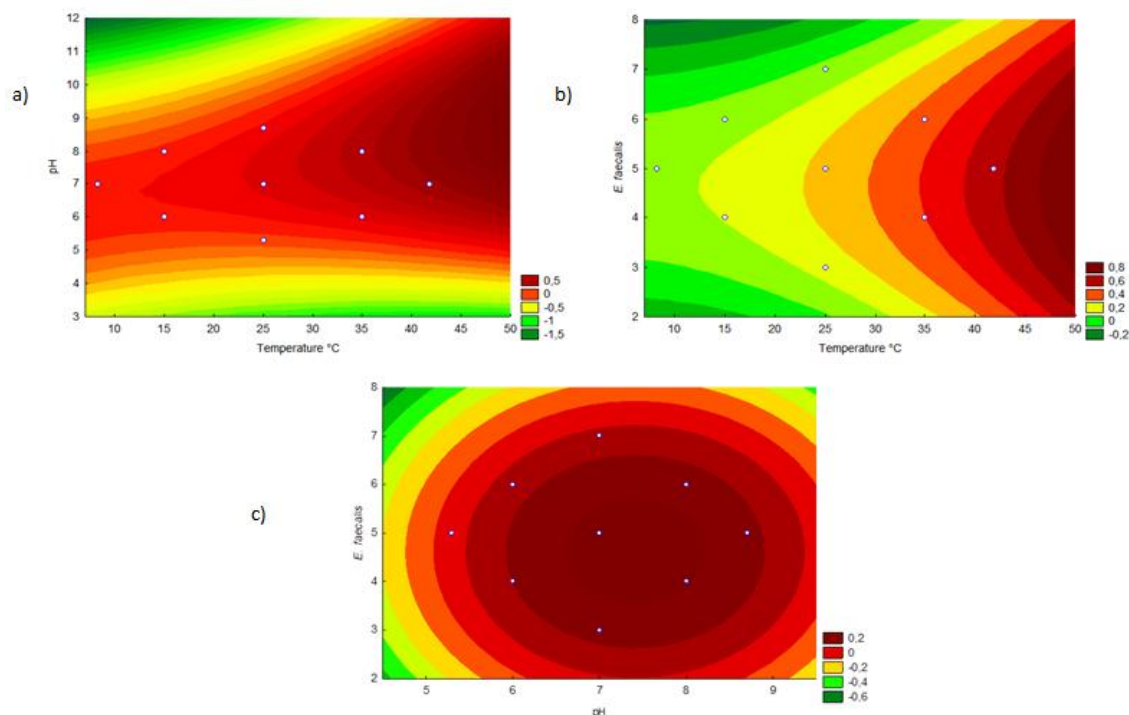


Figura 2 – Taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis*, sendo a) pH versus temperatura (*E. faecalis* igual a 10^5 log UFC.mL⁻¹); b) *E. faecalis* versus temperatura (pH igual a 7,0); c) *E. faecalis* versus pH (temperatura igual a 25 °C).

Validação dos modelos quadráticos dos valores de taxa de crescimento

Os modelos representados pelas Equações 6 e 7 foram verificados por meio da validação em meio de cultura em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de *E. faecalis* (Tabela 6). A validação ocorreu utilizando 12 ensaios experimentais de combinações de pH, temperatura e concentração de *E. faecalis* (Tabela 6). Os valores do fator Bias (1,24 para monocultura e 1,10 para co-cultura) indicaram predições seguras. O fator exatidão de 1,23 para monocultura e 1,24 para co-cultura, significa desvio de até 24 %. Segundo Ross (1996), é considerado ajuste aceitáveis quando as variações não passarem de 25 %, ou seja, 0,75 a 1,25. Portanto, ambos os modelos foram bem ajustados e podem ser utilizados por pesquisadores ou indústrias a fim auxiliar na avaliação de risco de contaminação ou crescimento *L. monocytogenes* em monocultura ou em co-cultura com *E. faecalis*. Estes experimentos indicam que o uso de *E. faecalis*

em diferentes condições de pH (5,3 a 8,7) e temperatura (8,2 °C a 41,8 °C) pode auxiliar no controle do crescimento de *L. monocytogenes*.

Tabela 6 – Dados para validação dos modelos de taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura e em co-cultura com *E. faecalis*.

Temperatura (°C)	pH	<i>E. faecalis</i> (10 ^x UFC.mL ⁻¹)	Monocultura (log UFC/mL/h)		Co-cultura (log UFC/mL/h)	
			Observado*	Modelo**	Observado*	Modelo**
22	6,5	4,2	0,166	0,192	0,085	0,136
22	7,5	4,2	0,171	0,193	0,109	0,168
30	6,5	4,2	0,279	0,354	0,231	0,214
30	7,5	4,2	0,322	0,356	0,317	0,301
37	6,5	4,2	0,340	0,538	0,338	0,315
37	6,5	4,2	0,424	0,538	0,366	0,315

*Observado: valor observado experimentalmente. ** Modelo: valores obtidos pelo modelo ajustado.

Simulação de Monte Carlo

Os coeficientes do modelo de taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis*, assim como os desvios foram utilizados para Simulação de Monte Carlo. Para simulação optou-se por cenários, os ensaios 1 e 11, exemplos de condições em que foram possíveis observar que a presença de *E. faecalis* inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* (Tabela 4). Na Figura 3 estão apresentadas as probabilidades de ocorrência de diferentes taxas de crescimento de *L. monocytogenes* na presença de *E. faecalis*, nas condições do ensaio 1 e a Figura 4 representa as do ensaio 11.

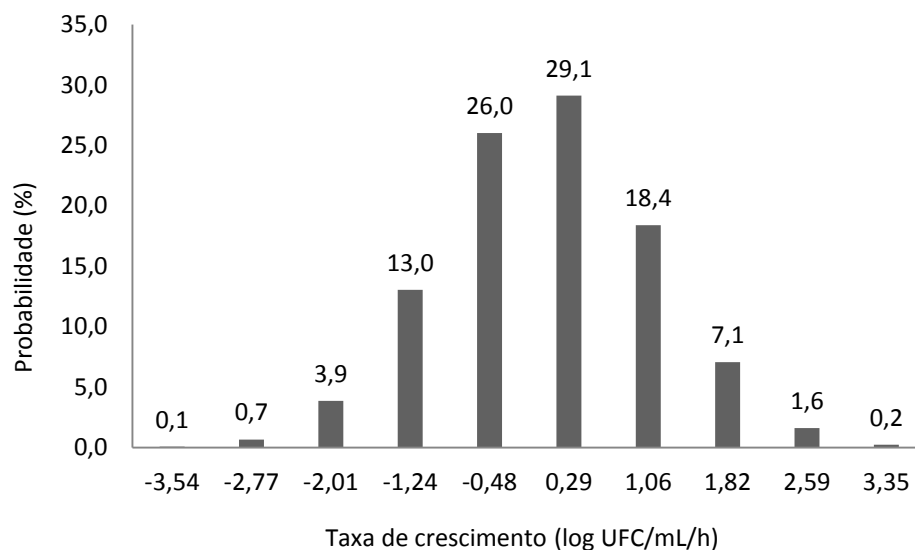


Figura 3 – Probabilidade de ocorrência de taxas de crescimento de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis* (10^5 UFC.mL⁻¹) a 8,2 °C e pH = 7,0 (ensaio 1).

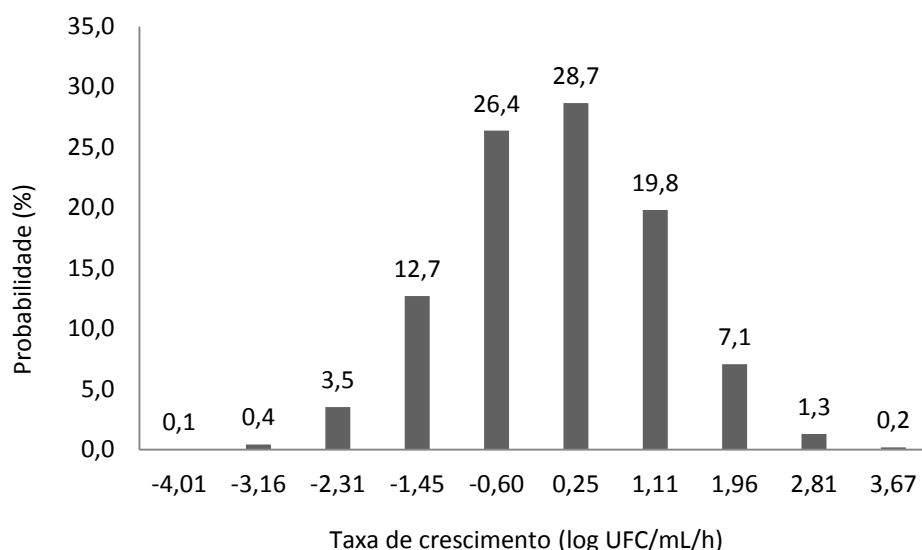


Figura 4 – Probabilidade de ocorrência de taxas de crescimento de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis* (10^7 UFC.mL⁻¹) a 25 °C e pH = 7,0 (ensaio 11).

Os valores negativos de taxas de crescimento indicam o não crescimento do patógeno, portanto, nas Figuras 3 e 4 e Tabela 7, pode ser observado que há probabilidade acumulada de 43,6 % e 43,0 % de *L. monocytogenes* não crescer nestas condições (Figura 3 e 4), respectivamente. No entanto, há uma probabilidade de 29,1 % de *L. monocytogenes* apresentar taxa de crescimento de

0,29 log UFC/mL/h, nas condições do ensaio 1 e probabilidade de 28,6 % de *L. monocytogenes* apresentar taxa de crescimento de 0,25 log UFC/mL/h, no ensaio 11. Estes resultados indicam que há probabilidade, mesmo que baixa, de *L. monocytogenes* crescer nestas condições experimentais, resultado que não pode ser obtido pelos modelos polinomiais, já que estes fornecem apenas um valor de taxa de crescimento.

Tabela 7 – Valores de taxa de crescimento e probabilidade obtidos pela Simulação de Monte Carlo para os ensaios 1 e 11.

Ensaio 1			Ensaio 11		
(8,2 °C, pH 7 e 10 ⁵ UFC.mL ⁻¹ <i>E.faecalis</i>)			(25 °C, pH 7 e 10 ⁷ UFC.mL ⁻¹ <i>E.faecalis</i>)		
μ	Probabilidade	P. acumulada	μ	Probabilidade	P. acumulada
-3,54	0,06	0,06	-4,01	0,05	0,05
-2,77	0,66	0,72	-3,16	0,41	0,46
-2,01	3,85	4,57	-2,31	3,51	3,97
-1,24	13,04	17,61	-1,45	12,69	16,66
-0,48	26,02	43,63	-0,60	26,37	43,03
0,29	29,11	72,74	0,25	28,65	71,68
1,06	18,39	91,13	1,11	19,81	91,49
1,82	7,06	98,19	1,96	7,05	98,54
2,59	1,59	99,78	2,81	1,29	99,83
3,35	0,22	100	3,67	0,17	100

μ: taxa de crescimento (log UFC/mL/h); Probabilidade (%); P. acumulada: probabilidade acumulada (%).

Este tipo de informação, probabilidades de ocorrência de diferentes taxas de crescimento, que a Simulação de Monte Carlo fornece gera interesse, principalmente das indústrias de alimentos. Por isso, torna menos dificultada a tomada de decisões em processamento de alimentos. Muñoz e colaboradores (2010) avaliaram o crescimento de *L. monocytogenes*, por meio da análise de regressão e Simulação de Monte Carlo e concluíram que ambos os métodos resultaram em predição confiável do comportamento de *L. monocytogenes* e ainda afirmam que estas análises dão maior fundamentação a tomada de decisões e

maior segurança alimentar. Sampedro e colaboradores (2011) também afirmaram que a Simulação de Monte Carlo é uma ferramenta útil e prática, para a indústria de alimentos, pois é possível verificar como os parâmetros do processo e as formulações do produto impactam na segurança do produto. Além disso, é possível prever a população final de micro-organismos ao final do processamento.

De acordo com os resultados e com objetivo do estudo, quanto mais mecanismos de avaliação do crescimento e inibição forem estudados, maior será a segurança na tomada de decisões pelas indústrias. Além disso, para a realização da Simulação de Monte Carlo é preciso ajustar os modelos de regressão, então estes métodos são complementares e fornecem informações de interesse para pesquisadores e indústrias.

CONCLUSÕES

Os modelos ajustados neste estudo, tanto para a fase lag quanto para a taxa de crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura, podem ser utilizados por pesquisadores e indústrias de alimentos, a fim de otimizar o tempo de análise, uma vez que estes abordaram faixas de temperatura e pH amplas e foram validados. O modelo estabelecido para o crescimento de *L. monocytogenes* em co-cultura com *E. faecalis* indica que este tem potencial ação como bioconservante, uma vez que a concentração de *E. faecalis* exerce influência negativa na taxa de crescimento de *L. monocytogenes*. Além disso, foi observado que a presença do bioconservante aumentou a fase de adaptação, reduziu a taxa de crescimento e a população máxima de *L. monocytogenes* em alguns ensaios experimentais.

A utilização de modelos preditivos é uma alternativa para avaliar o crescimento de *L. monocytogenes* em monocultura e em co-cultura com *E. faecalis*. A Simulação de Monte Carlo traz informações adicionais aos modelos de predição, por indicar probabilidades de ocorrência de diferentes taxas, ao passo que o modelo de predição informa um valor pontual de taxa de crescimento. O uso

da microbiologia preditiva e Simulação de Monte Carlo são ferramentas de auxílio para as indústrias de alimentos no gerenciamento de riscos e tomada decisões baseadas em probabilidades e previsões. Porém, ainda há necessidade de ser mais aplicadas em pesquisas relacionadas a microbiologia de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADOVA, A.; TODOROV, S. D.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; MIRHADI ZADI, T.; KULIYEV, A.; FRANCO, B. D. G. de M.; CHOBERT, J.-M.; HAERTLÉ, T. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 631–641, abr. 2013.

ARYANI, D. C.; DEN BESTEN, H. M. W.; HAZELEGER, W. C.; ZWIETERING, M. H. Quantifying strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 208, p. 19–29, 2015.

ASPRI, M.; O'CONNOR, P. M.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; ROSS, P.; HILL, C.; PAPADEMAS, P. Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. **International Dairy Journal**, v. 73, p. 1–9, out. 2017.

BARBOSA, J.; BORGES, S.; TEIXEIRA, P. Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 144–148, 2014.

BIGWOOD, T.; HUDSON, J. A.; COONEY, J.; MCINTYRE, L.; BILLINGTON, C.; HEINEMANN, J. A.; WALL, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus mundtii* isolated from soil. **Food Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 354–360, dez. 2012.

BOCKELMANN, W.; KOSLOWSKY, M.; GOERGES, S.; SCHERER, S.; FRANZ, C. M. A. P.; HELLER, K. J. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Staphylococcus equorum* SE3 in cheese models. **Food Control**, v. 71, p. 50–56, 2017.

COELHO, M. C.; SILVA, C. C. G.; RIBEIRO, S. C.; DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; ROSA, H. J. D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53–59, nov. 2014.

DAILEY, R. C.; MARTIN, K. G.; SMILEY, R. D. The effects of competition from non-pathogenic foodborne bacteria during the selective enrichment of *Listeria monocytogenes* using buffered Listeria enrichment broth. **Food Microbiology**, v.

44, p. 173–179, 2014.

DE CESARE, A.; VITALI, S.; TESSEMA, G. T.; TREVISANI, M.; FAGERENG, T. M.; BEAUFORT, A.; MANFREDI, G.; SKJERDAL, T. Modelling the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in pasta salads at different storage temperatures and packaging conditions. **Food Microbiology**, 30 abr. 2018.

GIMÉNEZ, B.; DALGAARD, P. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 96–109, 2004.

HUANG, Y.; YE, K.; YU, K.; WANG, K.; ZHOU, G. The potential influence of two *Enterococcus faecium* on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 67, p. 18–24, 2016.

LADO, B. H.; YOUSEF, A. E. Processors, Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food. In: **Listeria, listeriosis and food safety**. p. 157–214, 2007.

LEE, Y. J.; JUNG, B. S.; YOON, H. J.; KIM, K.-T.; PAIK, H.-D.; LEE, J.-Y. Predictive model for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in raw pork meat as a function of temperature. **Food Control**, v. 44, p. 16–21, 1 out. 2014.

LIANOU, A.; KAKOURI, A.; PAPPA, E. C.; SAMELIS, J. Growth interactions and antilisterial effects of the bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. cremoris M104 and *Enterococcus faecium* KE82 strains in thermized milk in the presence or absence of a commercial starter culture. **Food Microbiology**, v. 64, p. 145–154, 2017.

MALAKAR, P. K.; BARKER, G. C.; ZWIETERING, M. H.; RIET, K. Van. Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 263–272, 2003.

MANCHA AGRESTI, P.; GALA-GARCÍA, A.; LEBLANC, J. G.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A. Uso potencial de bacterias lácticas como vehículos vacunales. **Vacunas**, v. 13, n. 1, p. 15–20, jan. 2012.

MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: Providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 133–153, 2002.

MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T.; OLLEY, J. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n. 1–2, p. 13–32, jan. 1992.

MONNET, C.; BLEICHER, A.; NEUHAUS, K.; SARTHOU, A. S.; LECLERCQ-PERLAT, M. N.; IRLINGER, F. Assessment of the anti-listerial activity of microfloras from the surface of smear-ripened cheeses. **Food Microbiology**, v. 27,

n. 2, p. 302–310, 2010.

MUÑOZ, M.; GUEVARA, L.; PALOP, A.; FERNÁNDEZ, P. S. Prediction of time to growth of *Listeria monocytogenes* using Monte Carlo simulation or regression analysis, influenced by sublethal heat and recovery conditions. **Food Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 468–475, jun. 2010.

NYHAN, L.; BEGLEY, M.; MUTEL, A.; QU, Y.; JOHNSON, N.; CALLANAN, M. Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on *Listeria* growth in media and complex food matrices. **Food Microbiology**, v. 74, p. 75–85, 1 set. 2018.

PAUL ROSS, R.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1–2, p. 3–16, nov. 2002.

PERIN, L. M.; NERO, L. A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 36, 2014.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive food models in food microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 5, p. 501 - 508, 1996.

SALVUCCI, E.; LEBLANC, J. G.; PÉREZ, G. Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 185–191, jul. 2016.

SAMPEDRO, F.; RODRIGO, D.; MARTÍNEZ, A. Modelling the effect of pH and pectin concentration on the PEF inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by using the Monte Carlo simulation. **Food Control**, v. 22, n. 3–4, p. 420–425, 2011.

SCOLFORO, C. Z.; BAIRROS, J. V.; REZENDE, A. C. B.; SILVA, B. S.; ALVES, R. B. T.; COSTA, D. S.; ANDRADE, N. J.; SANT'ANA, A. S.; PENNA, W. E. L. Modeling the fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the pulp and on the outer rind of Canary melons (*Cucumis melo* (Indorus Group)). **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 290–297, 2017.

SOUZA, P. B. A. de. **Avaliação de *Listeria monocytogenes* em melão e jabuticaba**. UFV, Viçosa. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). 2013. Universidade Federal de Viçosa.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1–29, abr. 1997.

TAUB, I. A.; FEEHERRY, F. E.; ROSS, E. W.; KUSTIN, K.; DOONA, C. J. A quasi-chemical kinetics model for the growth and death of *Staphylococcus aureus* in

intermediate moisture bread. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 8, p. 2530–2537, 2003.

VAN IMPE, J. F.; POSCHET, F.; GEERAERD, A. H.; VEREECKEN, K. M. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1–3, p. 97–105, 2005.

VERA PINGITORE, E.; TODOROV, S. D.; SESMA, F.; GOMBOSSY DE MELO FRANCO, B. D. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 38–47, out. 2012.

VIMONT, A.; FERNANDEZ, B.; HAMMAMI, R.; ABABSA, A.; DABA, H.; FLISS, I. Bacteriocin-Producing *Enterococcus faecium* LCW 44: A High Potential Probiotic Candidate from Raw Camel Milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. May, p. 1–12, 2017.

WEMMENHOVE, E.; VAN VALENBERG, H. J. F.; VAN HOOIJDONK, A. C. M.; WELLS-BENNIK, M. H. J.; ZWIETERING, M. H. Factors that inhibit growth of *Listeria monocytogenes* in nature-ripened Gouda cheese: A major role for undissociated lactic acid. **Food Control**, v. 84, p. 413–418, 1 fev. 2018.

WHITING, R. C. Microbial modeling in foods. **Critical Rev Food Science Nutrition**, v. 35, p. 464–494, 1995.

ZOMORRODI, A. R.; SEGRÉ, D. Synthetic ecology of microbes: mathematical models and applications. **Journal of Molecular Biology**, v. 27, p. 837–861, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de *E. faecalis* como inibidor de *L. monocytogenes* e *Salmonella* pode ser uma alternativa dentre os métodos de conservação já existentes e a modelagem dessa inibição deve ser utilizada para nortear novas pesquisas na área. Ao realizar este trabalho foi possível verificar que através da modelagem preditiva e Simulação de Monte Carlo é possível obter dados que podem auxiliar na tomada de decisão em indústrias de alimentos e que reduzem custos e tempo em experimentos laboratoriais. Porém, para que a predição seja segura os modelos devem ser ajustados e avaliados dentro das condições testadas.

A microbiologia preditiva participa da avaliação de riscos e segurança alimentar, principalmente na indústria de alimentos, por isso, os modelos ajustados são de grande valor no controle do processamento de alimentos. Esta ferramenta é utilizada pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e o organismo da União Europeia (UE), os quais são responsáveis por aconselhar sobre riscos biológicos em relação a segurança alimentar e doenças transmitidas pelos alimentos. Seu uso deve ser mais incentivado no Brasil e em outros países da América Latina. A modelagem preditiva de co-cultura vem despertando interesse nos pesquisadores da área, uma vez que os alimentos são compostos de diferentes gêneros e espécies de micro-organismos.