

FORMAÇÃO DE BIOFILME MULTI-ESPÉCIES DE *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* E *Pseudomonas aeruginosa* ATRAVÉS DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Marcília Santos Rosado Castro¹, **Meg da Silva Fernandes**², Dirce Yorika Kabuki², Arnaldo Yoshiteru Kuaye²

¹. INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUDESTE DE MINAS GERAIS, Barbacena/MG, Brasil

². UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Campinas/SP, Brasil

Enterococcus e *Pseudomonas* são capazes de formar biofilmes em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados no processamento de alimentos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de formação de biofilme multi-espécies de *Enterococcus* sp. e *Pseudomonas* sp. através do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Os biofilmes foram formados em cupons de aço inoxidável 304#4 imersos em leite UHT integral, inoculado com um pool de aproximadamente 2 log UFC/mL de 5 cepas de *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, todas isoladas de uma indústria de processamento de queijo Minas frescal. A cada 48h, os cupons eram incubados em um novo leite inoculado com a mesma concentração inicial, a fim de manter a população no meio. A avaliação da formação dos biofilmes através do DCCR foi feita nos tempos 0; 1,2; 4; 6,8 e 8 dias e nas temperaturas 7; 13; 27; 41 e 47°C. Após cada combinação de tempo e temperatura, os cupons foram imersos em 10 mL de água peptona 0,1% por 1 min e, logo após, imersos em 5 mL de água peptonada 0,1%, submetidos a vortex por 2 minutos, seguido de plaqueamento em agar padrão para contagem (PCA) para contagem total, agar KF Streptococcus para contagem de *Enterococcus* sp. e em agar Cetrimid para contagem de *Pseudomonas* sp. com incubação a 35°C por 48h. Para verificação dos modelos encontrados, foram conduzidos ensaios experimentais em três repetições, em condições não avaliadas anteriormente (3 dias a 25°C), como forma de testar a eficiência do modelo. Foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$), embora as análises estatísticas tenham sido realizadas utilizando-se alfa de 5% ($p < 0,05$). Apenas o termo associado à interação (Temperatura x Tempo), não foi significativo, independentemente da análise, e, portanto, este foi incorporado aos resíduos para o cálculo da ANOVA. Os F calculados encontrados foram 2,79; 2,72 e 3,41 vezes maior que o F tabelado e as porcentagens de variáveis explicadas de 89,37; 89,16 e 91,11% para as contagens de *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp. e contagem total, respectivamente, demonstrando uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelos modelos. A região ótima para formação de biofilme multi-espécies por *E. faecium* e *E. faecalis* variou de 23,7 a 47°C e 3,6 a 8 dias, sendo a formação de biofilme observada de 10,2 a 47°C e 1,4 a 8 dias. Os resultados foram semelhantes aos encontrados para os biofilmes monoespécie (dados

mostrados), indicando que a interação não influenciou na formação de biofilme multi-espécies de *Enterococcus* sp. A regimetima para a formação de biofilme multi-espécies por *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* variou de 26,5 a 47°C por 3,1 a 7,7 dias, com formação de biofilme a partir de 19,6 a 47°C por 1,8 a 8 dias. Comparando com os resultados de biofilmes monoespécie (dados não mostrados), para a formação de biofilme multi-espécies de *Pseudomonas* sp. foi necessário um tempo de contato inicial, em média, um dia superior, bem como uma temperatura inicial, em média, 9,2 °C superior a necessária para os biofilmes monoespécie. Assim, pode-se afirmar que *Enterococcus* sp. inibiram o desenvolvimento de *Pseudomonas* sp. no biofilme multi-espécies. Os valores preditos para *Pseudomonas* sp. (4,14 log UFC/cm²) e *Enterococcus* sp. (5,41 log UFC/cm²) foram superiores aos encontrados experimentalmente (3,61 e 5,36 log UFC/cm²), respectivamente, demonstrando que as predições tendem ao lado seguro do modelo.

Agradecimentos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Processo n.140334/2009-2.