Original Article

EFEITO DO FENOL SOBRE CÉLULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 LIVRES E IMOBILIZADAS EM ESPUMA DE POLIURETANO

EFFECT OF PHENOL ON FREE AND IMMOBILIZED CELLS OF Pseudomonas aeruginosa *ATCC 25619 IN POLYURETHANE FOAM*

Suzana Cláudia Silveira MARTINS[1]; Claudia Miranda MARTINS[2]; Ana Vitória OLIVEIRA[3]; Larissa Maria Cidrão Guedes FIÚZA[3]; Sandra Tédde SANTAELLA[4]

1. Professora, Doutora, Associada, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, CE, Brasil. suzana220@gmail.com; 2. Professora, Doutora, Departamento de Biologia – UFC, Fortaleza, CE, Brasil; 3. Discente do Curso de Tecnologia em Alimentos, UFC, Fortaleza, CE, Brasil; 4. Professora, Doutora, Instituto de Ciências do Mar – UFC, Fortaleza, CE, Brasil.

RESUMO: A imobilização de micro-organismos sobre superfícies sólidas é uma estratégia recente para tratamento de substâncias químicas tóxicas e recalcitrantes, minimizando o impacto do descarte no ambiente. Assim, este trabalho teve por objetivo, comparar o efeito do fenol sobre células de *Pseudomonas aeruginosa* livres e imobilizadas em espuma de poliuretano. Foram testados dois tipos de espuma de poliuretano e duas concentrações do meio de cultura. À retenção celular foi avaliada por meio da contagem de células viáveis aderidas ao poliuretano, em intervalos de tempo fixos por 24 h. Subsequentemente, células livres em suspensão e imobilizadas foram imersas em meio mineral contendo fenol como única fonte de carbono e energia. Contagens de células viáveis foram realizadas diariamente para avaliar o efeito do fenol. O número de células retidas foi semelhante nos dois tipos de espuma, sendo significativamente maior no meio de cultura mais concentrado. O efeito do fenol sobre as células imobilizadas foi menos severo que sobre as células livres. Os resultados obtidos nas condições experimentais sugerem que a imobilização celular sobre espuma de poliuretano de 16 e 23 $kg.m^{-3}$ em caldo Luria-Bertani pode ser usada como ferramenta no tratamento biológico de ambientes poluídos com fenol.

PALAVRAS-CHAVE: Retenção celular. Adsorção. Superfície sólida.

INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por substâncias químicas orgânicas tóxicas e recalcitrantes é considerada uma das mais representativas no mundo. Por persistirem no ambiente, são transportadas para outros locais, acumulam-se nos tecidos dos seres vivos e modificam a cadeia alimentar (NAIR et al., 2008).

Métodos biológicos se constituem uma alternativa prática e econômica para biorremediação de poluentes químicos (DUA et al., 2002). No entanto, o efeito tóxico de alguns poluentes sobre as células microbianas, reduz a eficiência desses processos. A imobilização microbiana, definida como o confinamento físico de células viáveis numa determinada região espacial, por limitar o contato direto entre os micro-organismos e as substâncias tóxicas, reduzir a migração celular e manter as atividades catalíticas, é uma estratégia para melhorar a eficiência dos referidos processos (DÍAZ et al., 2002; MARGARITIS; KILONZO, 2005; ZHOU et al., 2008; TALLUR et al., 2009).

Diferente dos problemas inerentes às células imobilizadas em géis, como acúmulo de células mortas e reduzida transferência de massa (BRASCHLER et al., 2005), a imobilização celular por adsorção permite o contato direto entre os nutrientes e as células. Nessa técnica, células são transportadas do meio líquido circundante para a superfície do material sólido, seguida da adesão e subsequente colonização da superfície suporte (KILONZO; BERGOUGNOU, 2012).

A seleção do material suporte é uma etapa fundamental no processo de imobilização celular (HSU et al., 2004). Materiais fibrosos, por apresentarem elevado poder de adsorção e interações eletrostáticas e hidrofóbicas positivas com a maioria das superfícies microbianas, são preferencialmente utilizados (CHU et al., 2009). Neste aspecto, as espumas flexíveis de poliuretano, por suas propriedades mecânicas, elevada porosidade, alta adsorção, resistência a solventes orgânicos e a degradação microbiana, fácil manuseio, regeneração e baixo custo, são consideradas excelentes suportes para a retenção e crescimento celular (PATIL et al., 2006; ROMAŠKEVIČ et al., 2006). Este material também mostra características favoráveis para a concentração de compostos aromáticos, como por exemplo, o fenol, otimizando a taxa de degradação dessas moléculas (ENKIRI et al., 1995).

Received: 07/05/12
Accepted: 12/12/12

Martins et al. (2012) relataram que *Pseudomonas* spp. são capazes de crescer sobre espuma de poliuretano. Assim, a linhagem *P. aeruginosa* ATCC 25619, previamente caracterizada quanto à hidrofobicidade, motilidade e produção de biofilme, foi usada como organismo teste para imobilização celular.

Entre as substâncias tóxicas e recalcitrantes o fenol se destaca por sua elevada toxicidade às células microbianas, mesmo em concentrações extremamente baixas, como 10 mg L^{-1} (PRIETO et al., 2002). Por este motivo, esta substância foi selecionada para avaliar o efeito da imobilização sobre as células de *P. aeruginosa* ATCC 25619.

Considerando a importância dos métodos biológicos na preservação dos recursos naturais, e a maior resistência das células microbianas imobilizadas, em relação ás livres, objetivamos comparar o efeito do fenol sobre células livres e imobilizadas de *P. aeruginosa* ATCC 25619.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

Pseudomonas aeruginosa ATCC 25619 mantida em meio de cultura Ágar Nutritivo (AN): 3 $g.L^{-1}$ de extrato de carne, 5 $g.L^{-1}$ de peptona e 15 $g.L^{-1}$ de ágar, a 4 °C no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Brasil, foi avaliada quanto as características fenotípicas motilidade, hidrofobicidade e formação de biofilme, importantes na imobilização celular.

Formação de biofilme

Para avaliar a capacidade de formar biofilme foi usado o método descrito por Christensen et al. (1982), modificado por Emira et al. (2011). *P. aeruginosa* ATCC 25619 foi inoculada em tubos de ensaio contendo meio caldo infusão cérebro-coração: infusão de cérebro 12,5 $g.L^{-1}$, infusão de coração 5,0 $g.L^{-1}$, proteose-peptona 10,0 $g.L^{-1}$, glicose 2 $g.L^{-1}$, cloreto de sódio 5$g.L^{-1}$ e fosfato de sódio dibásico 2,5 $g.L^{-1}$, e incubada a 37 °C durante 18-20 h. Após este tempo, a cultura foi descartada e os tubos corados com safranina. Uma película vermelha na parede dos tubos foi considerada positiva para a produção de biofilme.

Hidrofobicidade celular

O teste de adesão ao poliestireno descrito por Rosenberg (1981) foi utilizado para avaliar a hidrofobicidade celular da linhagem de *P. aeruginosa* ATCC 25619. Discos de poliestireno de 80 mm de diâmetro, estéreis, foram pressionados sobre a superfície de placas de Petri com Ágar Nutritivo contendo colônias isoladas de *P. aeruginosa*. As réplicas das colônias sobre a superfície de poliestireno foram lavadas por 2 min com água corrente para remover todas as células não aderidas. Áreas translúcidas na superfície do poliestireno correspondem às células aderidas e indicam um teste positivo. Para facilitar a visualização e comparação com as colônias originais, cada réplica foi fixada por lavagem com álcool etílico PA 96 º GL e, em seguida, coradas com cristal violeta a 2%.

Motilidade

O teste de motilidade foi realizado pela técnica da gota pendente, como descrito por Barrow; Feltham (2004). A cultura de *P. aeruginosa* foi depositada sobre uma lâmina escavada que foi examinada em microscópio óptico usando objetiva de 100X.

Preparação das matrizes de espuma de poliuretano

Espumas de poliuretano de densidades 16 $kg.m^{-3}$ (D16) e 23 $kg.m^{-3}$ (D23), disponíveis no comércio local, em Fortaleza, Ceará, foram cortadas com dimensões aproximadas de 10 x 10 x 5 mm correspondente a uma área 4,0 cm^2 recebendo a denominação de cupons. Estes cupons foram lavados com detergente líquido, água corrente e água destilada. Imersos em etanol 70% por 1 h, lavados com água destilada, secos a 70 º C durante 4 h, esterilizados a 121 º C por 15 min e secos durante a noite a 70 °C (PARIZZI et al., 2004; QUEK et al., 2005; CARELI et al., 2009; WANG et al., 2009).

Padronização do inóculo

Para padronização do inóculo, *P. aeruginosa* ATCC 25619 foi inoculada em placas de Petri com o meio Luria-Bertani (LB) contendo (por litro): 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl e 17 g de ágar. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Em seguida, uma colônia foi transferida para 100 mL de caldo LB incubados por 18 h, a 26 °C num agitador horizontal (150 rpm). Após este tempo, 1 mL desta cultura foi transferido para 100 mL de caldo LB e incubadas novamente sob as mesmas condições (KOMLOS et al., 2005). A absorbância desta suspensão foi ajustada para aproximadamente 0,6 a 600 nm, correspondendo a 10^8-10^9 $UFC.mL^{-1}$, estimada em curva padrão (absorbância x $UFC.mL^{-1}$) previamente construída para a linhagem da

bactéria *P. aeruginosa* ATCC 25619 (TORTORA et al., 2012).

Avaliação da disponibilidade de nutrientes e da espuma de poliuretano D16 e D23 sobre a retenção celular

Para avaliar o efeito da disponibilidade de nutrientes na retenção celular foi usado o meio de cultura caldo Luria-Bertani (LB) contendo por litro: 10,0 g de triptona, 5,0 g de extrato de levedura e 5,0 g de NaCl e (LB 1/10): 1,0 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura e 0,5 g de NaCl.

Doze Erlenmeyers com caldo LB 1/10 foram inoculados com *P. aeruginosa* ATCC 25619, seis com D16 e seis com D23. O mesmo procedimento foi executado com LB 1/10. Todos os frascos foram incubados a 26 °C durante 24 h. Após 2, 4, 6, 8, 10 e 24 h de incubação, um Erlenmeyer de cada tratamento foi retirado, quatro cupons removidos da suspensão celular, inoculados em 10 mL de água peptonada (0,1 g de peptona e 100 mL de água) e agitados em vórtex por 1 min para liberar as células fracamente aderidas. Células que permaneceram nos cupons após este procedimento foram consideradas aderidas à superfície. Assim, a primeira suspensão foi descartada, os cupons transferidos para tubos contendo 10 mL do mesmo diluente e novamente agitados em vortex por 1 min (PARIZZI et al., 2004; KUMAR et al., 2012). Diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-5} das suspensões obtidas foram preparadas e transferidas para placas de Petri contendo Ágar Métodos Padrão (AMP), que foram incubadas a 28 °C por 48 h. A concentração celular foi calculada em UFC.cm^{-2} de espuma de poliuretano.

Efeito do fenol sobre as células livres e imobilizadas

Para avaliar o efeito do fenol sobre as células livres e imobilizadas, uma solução estoque de fenol foi preparada por dissolução de 1 g de fenol em 1L de água destilada. Esta solução foi esterilizada usando membrana filtrante de 0,22µm de diâmetro.

Um meio mineral foi preparado por dissolução das seguintes substâncias químicas (g. L^{-1}): $(NH_4)_2SO_4$ (2,0); $NaNO_3$ (1,0); KH_2PO_4 (0,20); $MgSO_4$ (0,25); $CaCl_2.2H_2O$ (0,01); $CuSO_4.7H_2O$ (0,08), H_2MoO_4 (0,05); $MnSO_4.7H_2O$ (0,05); $Fe_2(SO_4)_3$ (0,05); $ZnSO_4$ (0,04) e extrato de levedura (2,0) em água de torneira. Um volume de 100 mL deste meio foi adicionado a Erlenmeyers de 250 mL que foram esterilizados a 121 °C por 15 min. O meio foi resfriado à temperatura ambiente (26 °C) e um volume da solução estoque de fenol correspondente a concentração final de 62,5 mg.L^{-1} foi adicionado ao meio base. O pH do meio mineral com fenol foi 5,5 (PINHEIRO et al., 2010).

O efeito do fenol sobre as células livres em suspensão e imobilizadas foi avaliado separadamente. Para isso, 1 mL de uma cultura de 24 h de *P. aeruginosa* ATCC 25619, contendo aproximadamente 3,2 x 10^7 UFC e 100 cupons de espuma de poliuretano de densidade 23 kg.m^{-3} contendo cerca de 1,6 x 10^7 UFC.cm^{-2} de células da mesma bactéria foram inoculadas separadamente em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio mineral suplementado com fenol. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (150 rpm) a 26 °C por quatro dias. Considerando que a inibição do crescimento é um dos parâmetros para avaliar o efeito de compostos tóxicos sobre populações microbianas (Nweke; Okpokwasili, 2010), a concentração da *P. aeruginosa* ATCC 25619 foi avaliada diariamente. Para isso, alíquotas de 100µL das suspensões celulares e das células liberadas da superfície de quatro cupons de espuma de poliuretano em água peptonada 0.1%, foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-3}, inoculadas no meio de cultura AMP e incubadas a 37 º C por 48 h. Após este período as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC.mL^{-1}, para as células em suspensão e em UFC.cm^{-2} para as células imobilizadas (Bastos et al., 2000). O experimento foi repetido três vezes e as análises relativas a cada experimento foram realizadas em triplicatas.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando a versão GraphPad Prism 5,00 (GraphPad Software *, San Diego, CA), com níveis de confiança de 95%. Os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a relação entre o tempo de contato e adesão celular. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas com pelo menos duas repetições. Os testes qualitativos foram lidos independentemente por dois diferentes observadores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Slime ou biofilme foi o termo usado por Heukelekian; Heller (1940) para descrever a adesão e colonização microbiana de superfícies bióticas ou abióticas. Micro-organismos produtores de biofilme apresentam maiores habilidades adesivas do que aquelas não produtoras (SAIDI et al., 2011). A coloração vermelha na parede dos tubos foi

indicativa da capacidade da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 de formar biofilme, confirmando os resultados de Deziel et al. (2001) para linhagens de *P. aeruginosa.*

Lawrence et al. (1987) sugeriram que a motilidade flagelar pode ser necessária para aproximar as células do material suporte e desempenha um papel chave na adesão às superfícies e na subsequente formação de biofilmes. A *P. aeruginosa* ATCC 25619 apresentou motilidade positiva. Este resultado era esperado porque quase todas as linhagens de *P. aeruginosa* são descritas como móveis por meio de um único flagelo polar (HOLT et al., 1994).

Rosenberg (1981) descreveu uma correlação entre adesão bacteriana ao poliestireno e hidrofobicidade da superfície celular. Áreas translúcidas coradas com cristal violeta sobre a superfície do poliestireno foram indicativas de interação entre a superfície celular da *P. aeruginosa* ATCC 25619 e o poliestireno sugerindo o caráter hidrofóbico desta linhagem. Resultados semelhantes foram relatados por Pijanowska et al. (2007) para *Pseudomonas aeruginosa* TK e por Prasad et al. (2009), para a *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Os resultados positivos dos testes para produção de biofilme, motilidade e hidrofobicidade confirmaram a adequabilidade da *P. aeruginosa* ATCC 25619 como organismo teste em ensaios de imobilização celular.

A eficiência de um material suporte é avaliada pela capacidade da superfície para armazenar células viáveis (PETRE et al., 1999). A Figura 1 mostra o número de células retidas nos cupons de poliuretano, D16 e D23, imersos no caldo de LB e LB-1/10, após 2, 4, 6, 8, 10 e 24 h.

Em todas as condições experimentais o coeficiente de correlação de Spearman entre o número de unidades formadoras de colônias e o tempo de contato foi significativo ($p<0.05$), mostrando uma relação positiva ($r>90\%$) entre a concentração celular e o tempo. Carelli et al. (2009) observaram que a adesão de *Pseudomonas fluorescens* em espuma de poliuretano também mostrou uma relação positiva com o tempo.

O teste de Wilcoxon mostrou que o número de células nos dois tipos de espuma, no mesmo meio de cultura, não foi significativamente diferente ($p>0.05$) Figura 1 (A) e (B). No entanto, a retenção celular nas espumas de 16 e 23 $kg.m^{-3}$ foi significativamente maior no meio de cultura LB em comparação com o LB-1/10 ($p<0.05$) [Figura 1 (C), (D), (E) e (F)].

Quek et al. (2005), em experimento para imobilização da bactéria *Rhodococcus* spp. em espuma de poliuretano de 14 $kg.m^{-3}$ e 22 $kg.m^{-3}$, após 48 h imersas em caldo nutriente também relataram concentrações em torno de 10^7 $UFC.cm^{-2}$, semelhantes a deste estudo.

Carelli et al. (2009) relataram que valores entre 10^5 a 10^6 $UFC.cm^{-2}$ de *Pseudomonas fluorescens* sobre superfícies de poliuretano foram indicativos de formação de biofilmes. Assim, após 8 h de contato as concentrações celulares nas espumas de poliuretano D16 e D23 em, LB e LB-1/10, são sugestivas de formação de biofilme.

Segundo Gerber et al. (2012) a agregação celular seria uma resposta dos micro-organismos á condições ambientais hostis. Assim, a limitação de nutrientes atuaria como catalisador à adesão bacteriana a superfícies sólidas (SANIN et al., 2003). Stepanovic et al. (2000) confirmaram que adesão de linhagens de *Salmonella* spp. sobre superfícies plásticas foi maior em caldo triptona de soja (CTS-1/20) que em CTS. No entanto, os mesmos autores constataram que à adesão de *Listeria monocytogenes* foi maior no meio (CTS) comparado ao (CTS-1/20), sugerindo a interferência da linhagem microbiana na agregação celular. No presente experimento, a concentração de *P. aeruginosa* ATCC 25619 em D16 e D23 foi significativamente maior no meio de cultura LB, em comparação ao meio diluído 10 vezes (LB-1/10). Dunne (2002); Prakash et al. (2003) também reportaram maior concentração de células bacterianas sobre superfícies inertes, em concentrações mais elevadas de nutrientes. Segundo Donlan (2002), a influência do meio de cultura sobre o crescimento microbiano sobre superfícies sólidas, é um mecanismo complexo e ainda pouco compreendido e, de acordo, com Romling et al. (2000) embora as razões para as diferentes influências do teor nutricional ainda permanecem no campo da especulação, uma possível explicação para as respostas diferentes dos micro-organismos a condições nutricionais pode estar relacionada a mutações genéticas que controlam a formação do biofilme resultante da agregação celular.

Os resultados do presente estudo mostraram que a concentração de nutrientes no meio LB-1/10 foi suficiente para a *P. aeruginosa* ATCC 25619 atingir valores superiores entre 10^6 e 10^7 $UFC.cm^{-2}$, após oito horas de contato com poliuretano.

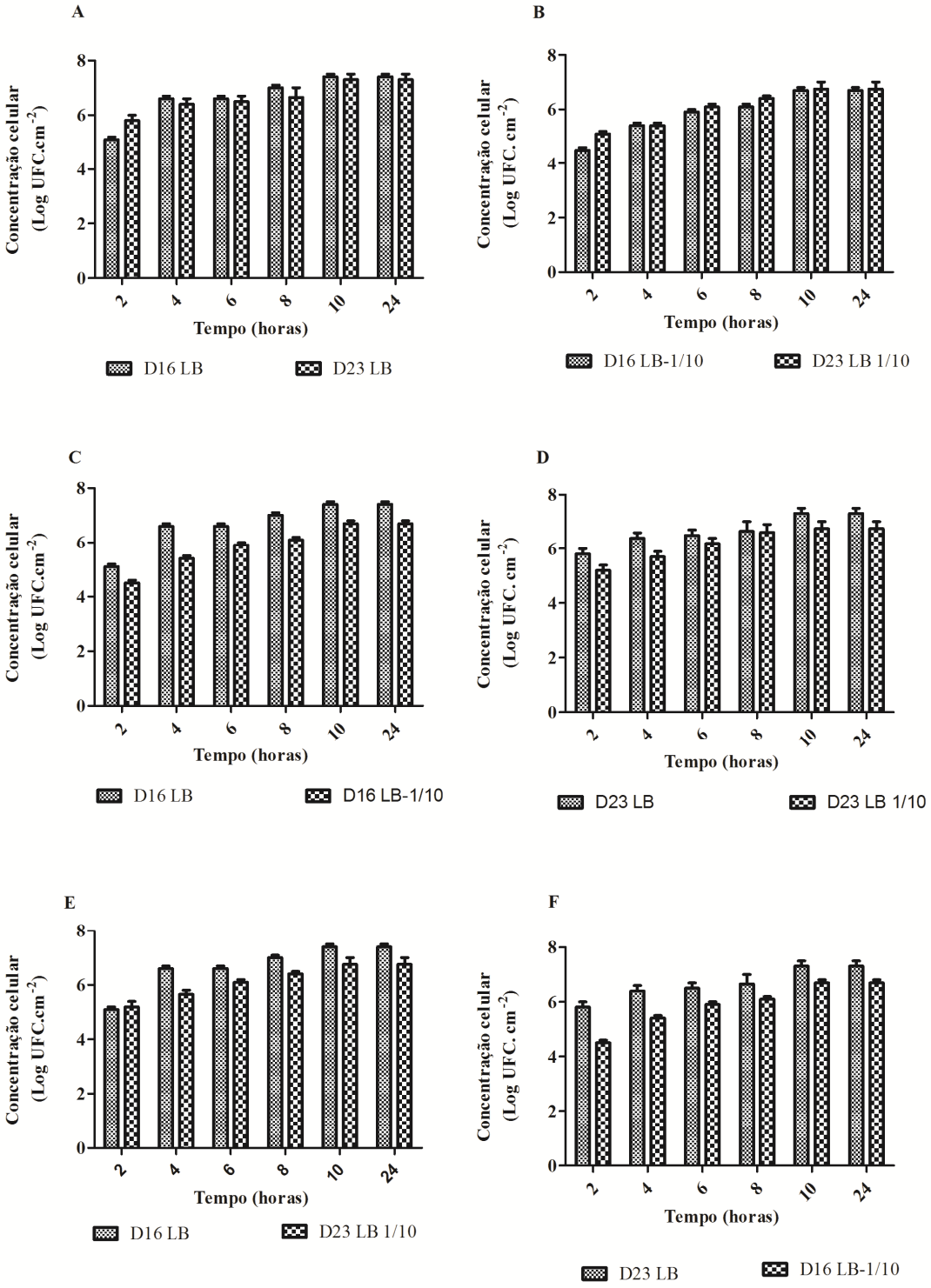


Figura 1. Adesão e crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 25619, imersa no meio de cultura caldo Luria-Bertani (LB) (A) em LB-1/10 (B) e em LB e LB-1/10 (C), (D), (E) e (F), durante 24 h. Os resultados foram apresentados como média de dois experimentos diferentes.

A Figura 2 mostra que a população viável de *P. aeruginosa* ATCC 25619 imobilizada em espuma de poliuretano D23, manteve-se em torno de 1,6 x 10^7 UFC.cm^{-2} (7,5 log UFC.cm^{-2}), após 4 dias de contato com fenol. Esta constatação sugere que, na concentração de 62,5 mg.L^{-1}, o fenol aparentemente, inibiu o crescimento das células imobilizadas. Para células livres em suspensão a concentração de fenol foi bactericida e a população foi reduzida dois ciclos logarítmicos após um dia

de contato. Após 4 dias de contato com fenol o número total de UFC de *P. aeruginosa* ATCC 25619 no tratamento com espuma, correspondente a área de cada cupom x UFC.cm^{-2} foi de aproximadamente 4,0 x 10 ^{9} . Para o tratamento sem espuma o volume total x UFC.mL^{-1} foi 3,2 x 10 ^{6}. Estes resultados reforçam o efeito protetor da imobilização celular, também relatado por Junter; Jouenne (2004) e Wang et al. (2005).

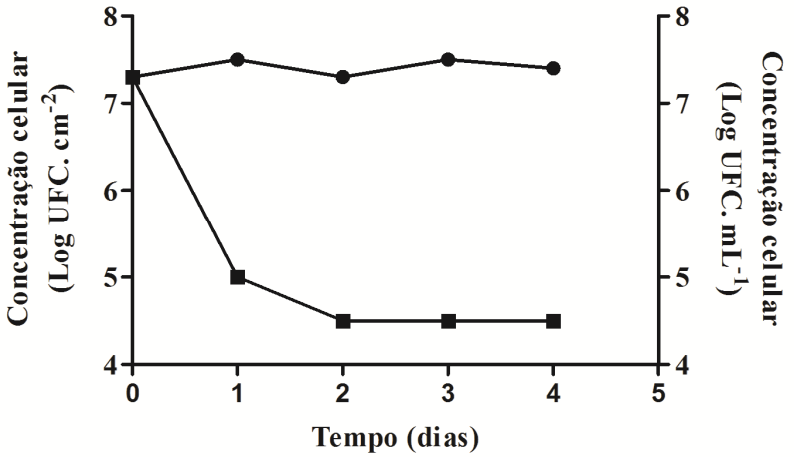


Figura 2. Número de células sobreviventes de *P. aeruginosa* ATCC 25619 imobilizadas em UFC.cm^{-2} (●) e livres em UFC.mL^{-1} (■) em contato por quatro dias com meio mineral contendo 62,5 mg.L^{-1}de fenol.

Embora os métodos de imobilização induzam alterações na fisiologia, no crescimento e na atividade metabólica dos micro-organismos (JUNTER; JOUENNE, 2004) e alguns relatos tenham sido publicados sobre o possível efeito protetor da imobilização contra substâncias químicas tóxicas, nenhuma explicação sobre o mecanismo desse fenômeno foi proposta (KRISCH; SZAJÁNI, 1997). De acordo com Carpentier e Cerf (1993), este efeito pode ser atribuído à agregação dos micro-organismos e ao aumento da produção de exopolissacarídeos (EPS).

CONCLUSÕES

Espuma flexível de poliuretano de 16 e 23 kg.m^{-3} são suportes igualmente eficientes para imobilização bacteriana por adsorção.

As células imobilizadas foram protegidas do efeito tóxico do fenol. Os resultados obtidos serão uma contribuição na perspectiva de aumentar a eficiência da imobilização celular como estratégia de biorremediação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e PETROBRAS (Petróleo Brasileiro S/A) o apoio financeiro para o desenvolvimento do presente trabalho.

ABSTRACT: The microbial immobilization on solid surfaces is a recent strategy for treatment of recalcitrant toxic chemicals minimizing the environmental impact of disposal. This study aimed, immobilize the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 in polyurethane foam and compare the effect of phenol on the free and immobilized cells. Two types of polyurethane foam and two concentrations of the culture medium were tested. The cell retention was evaluated by counting of viable cells adhered to the polyurethane in fixed time intervals for 24 h. Subsequently, cells in suspension and immobilized were immersed in mineral medium containing phenol as the sole source of carbon and energy. Viable cell counts were taken daily to assess the effect of phenol. The number of cells retained was similar for both types of foam, being significantly higher in the culture more concentrated. The effect of phenol on the immobilized cells was less severe than on the free cells. The results obtained in the experimental conditions suggest that cell immobilization on polyurethane foam of 16 and 23 kg.m^{-3} in Luria-Bertani broth can be used as a tool in the biological treatment of polluted environments with phenol.

KEYWORDS: Retention cellular. Adsorption. Solid surfaces.

REFERÊNCIAS

BARROW, G.I.; FELTHAM, R.K.A. Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria. 3. Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. 352 p.

BASTOS, A.E.R.; TORNISIELO, V.L; NOZAWA, S.R.; TREVORS, J.T.; ROSSI, A. Phenol metabolism by two microorganisms isolated from Amazonian forest soil samples. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 24, p. 403-409, 2000.

BRASCHLER, T.; JOHNN, R.; HEUL, M.; METREF, L.; RENAUD, P. Gentle cell trapping and release on a microfluidic chip by in situ alginate hydrogel formation. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 5, n.5, p. 553-559, 2005.

CARELI, R. T.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; ROSADO, M. S.; BERNARDES, P. C. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 171-176, 2009.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, n. 6, p. 499-511, 1993.

CHRISTENSEN, C. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L.; BEACHEY, E. H. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, Washington, v. 37, p. 318-326, 1982.

CHU, Y. F.; HSU, C. H.; SOMA, P. K.; LO, Y. M. Immobilization of bioluminescent *Escherichia coli* cells using natural and artificial fibers treated with polyethyleneimine. **Bioresource Technology**, New York, v. 100, n. 13, p. 3167-3174, 2009.

DÉZIEL, E.; COMEAU, Y.;VILLEMUR, R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 4, p. 1195-1204, 2001.

DÍAZ, M. P.; BOYD, K. G.; GRIGSON, S. W. J.; BURGESS, J. G. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 79, n .2, p. 145-153, 2002.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infection Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHNNATHAN, N.; JOBRI, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, n. 2-3, p. 143-152, 2002.

DUNNE JR, M.W. Bacterial adhesion-seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

EMIRA, N.; MEJDI, S.; DORRA, K.; BAKHROUF, A.; EULOGIO, V. Comparison of the adhesion ability of *Candida albicans* strains to biotic and abiotic surfaces. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 6, p. 977-985, 2011.

ENKIRI, F.; HULEN, C.; LEGAULT-DEMARE, J. Hydrophobic adsorption of aromatic compounds on polyurethane foam as carbon source for *Pseudomonas* growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 44, n. 3-4, p. 539-545, 1995.

GERBER, L. C.; KOEHLER, F. M.; GRASS, R. N.; STARK, W. J. Incorporating microorganisms into polymer layers provides bioinspired functional living materials. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 1, p. 90-94, 2012.

HEUKELEKIAN, H.; HELLER, A. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 40, n. 4, p. 546-558, 1940.

HOLT, J.; KRIEG, N.; SNEALTH, N.; STALEY, J.; WILLIAMS, S. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th Edition. Baltimore. Maryland. USA. William & Wilkins Editors, 1994. 787p.

HSU, C. H.; CHU, Y. F.; ARGIN-SOYSAL, S.; HAHM, T. S.; LO, Y. M. Effects of surface characteristics and xanthan polymers on the immobilization of *Xanthomonas campestris* to fibrous matrices. **Journal of Food Sciences**, Chicago, v. 69, n. 9, p. 441-448, 2004.

JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome in leader or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, New York, v. 22, n. 8, p. 633-658, 2004.

KILONZO, P.; BERGOUGNOU, M. Surface modifications for controlled and optimized cell immobilization by adsorption: Applications in fibrous bed bioreactors containing recombinant cells. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, Henderson, v. 4, p. 22-30, 2012.

KOMLOS, J.; CUNNINGHAM, A. B.; CAMPER, A. K.; SHARP, R. R. Interaction of *Klebsiella oxytoca* and *Burkholderia cepacia* in dual-species batch cultures and biofilms as a function of growth rate and substrate concentration. **Microbial Ecology**, New York, v. 49, n. 1, p. 114-125, 2005.

KRISCH, J.; SZAJANI, B. Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 19, n. 6, p. 525-528, 1997.

KUMAR, R.S.; SHANKAR, T.; ANANDAPANDIAN, K.T.K.; ISAIARASU, L. Effect of *Bacillus pumilus* EWBCM1 whole cell immobilization in various matrices on cellulase enzyme production and saccharification of sugarcane bagasse. **American-Eurasian Journal Agriculture & Environment Science**, Dubai, v. 12, n. 1, p. 128-132, 2012.

LAWRENCE, J. R.; DELAQUIS, P. J.; KORBER, D. R.; CALDWELL, D. E. Behavior of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. **Microbial Ecology**, New York, v. 14, n.1, p. 1-14, 1987.

MARGARITIS, A.; KILONZO, P. Production of ethanol using immobilized cell bioreactor systems. **Applications of Cell Immobilization Technology**, Heidelberg, v. 8B, p. 375-405, 2005.

MARTINS, S.C.S.; MARTINS, C.M.; OLIVEIRA, A.V.; FIÚZA, L.M.C.G.; SANTAELLA, S.T. Selection of culturable environmental microbial strains for cellular immobilization: Association of phenotypic adhesive characteristics and quantitative cellular retention. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 58, p. 12206-12212, 2012.

NAIR, C. I.; JAYACHANDRAN, K.; SHASHIDHAR, S. Biodegradation of phenol. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 25, p. 4951-4958, 2008.

NWEKE, C.O.; OKPOKWASILI, G.C. Influence of exposure time on phenol toxicity to refinery wastewater bacteria. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, Nairobi, v. 2, n. 2, p. 20-27, 2010.

PARIZZI, S. Q. F. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, C. A. S.; SOARES, N. F. F.; SILVA, E. A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n.1, p. 77-83, 2004.

PATIL, N. K.; VEERANAGOUDA, Y.; VIJAYKUMAR, M.; NAYAK, S.; KAREGOUDAR, T. Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus* sp. immobilized cells in alginate and polyurethane. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 57, n. 2, p. 82-87, 2006.

PETRE, E. M.; ZARNEA, G.; ADRIAN, P.; GHEORGHIU, E. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels. **Resource Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 309-332, 1999.

PIAJANOWSKA, A.; KACZOREK, L.; CHRZANOWSKI, L.; OLSZANOWSKI, A. Cell hydrophobicity of *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. bacteria and hydrocarbon biodegradation in the presence of Quillaya saponin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New Jersey, v. 23, n. 5, p. 677-682, 2007.

PINHEIRO, Z. B.; RODRIGUES, K.; PESSOA-WANDERLEY, C. R.; ARAÚJO, S. R.; MARINHO, G. Biological removal of phenol by use of continuous reactor with *Aspergillus niger* inoculum. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 47-52, 2010.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B.M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: A survival strategy of bacteria. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 9, p. 1299-1307, 2003.

PRIETRO, M. B.; HIDALGO, A.; RODRIGUEZ, F. C.; SERRA, J.L.; LLAMA, M. J. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropitics* UPV-1 immobilized in air-stirred reactor with clarifier. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, n. 6, p. 583-589, 2002.

PRASAD, S. V.; BALLAL, M.; SHIVANANDA, P. G. Slime production a virulence marker in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical and environmental specimens: a comparative study of two methods. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, Chandigarh, v. 52, n. 2, p. 191-193, 2009.

QUEK, E.; TING, Y. P.; TAN, H. M. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. **Bioresource Technology**, New York, v. 97, n.1, p. 32-38. 2005.

ROMAŠKEVIČ, T.; BUDRIENĖ, S.; PIELICHOWSKI, K.; PIELICHOWSKI, J. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. **Chemija**, Vilnius, v. 17, n. 4, p. 74-89, 2006.

ROMLING, U.; ROHDE, M.; OLSÉN, A.; NORMARK, S.; REINKÓSTER, J. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 10-23, 2000.

ROSENBERG, M. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 42, n. 2, p. 375-377, 1981.

SAIDI, N.; SNOUSSI, M.; USAI, D.; ZANETTI, S.; BAKHROUF, A. Adhesive properties of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from Tunisian aquatic biotopes. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 5, n. 31, p. 5644-5655, 2011.

SANIN, S. L.; SANIN, F. D.; BRYERS, J. D. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 6, p. 909-914, 2003.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

TALLUR, P. N.; MEGADI, V. B.; NINNEKAR, H. Z. Biodegradation of p-cresol by immobilized cells of *Bacillus* sp. strain PHN 1. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 20, n. 1, p. 79-83, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012. 934 p.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, New York, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WANG, J.; YANG, H.; LU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; ZHENG, C. Aerobic biodegradation of nitrobenzene by a defined microbial consortium immobilized in polyurethane foam. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 25, n. 5, p. 875-881, 2009.

ZHOU, L.; GUIYING, L.; TAICHENG, A.; JIAMO, F.; GUOWING, S. Recent patents on immobilized microorganism technology and its engineering application in wastewater treatment. **Recent Patents on Engineering**, Cambridge, v. 2, p. 28-35, 2008.