

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Avaliação dos efeitos de um coquetel fágico inespecífico sobre o biofilme e crescimento de *Stutzerimonas stutzeri*

Thalya Furtado Lopes
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

THALYA FURTADO LOPES

Avaliação dos efeitos de um coquetel fágico inespecífico sobre o biofilme e crescimento de *Stutzerimonas stutzeri*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Sergio Oliveira de Paula

Coorientador: Roberto Sousa Dias

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L864a
2025
Lopes, Thalya Furtado, 1999-
Avaliação dos efeitos de um coquetel fágico inespecífico sobre o biofilme e crescimento de *Stutzerimonas stutzeri* / Thalya Furtado Lopes. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (62 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2025.
Referências bibliográficas: f.52-62.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.733>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Biodegradação. 2. Bacteriófagos. 3. Metais - Superfícies.
I. Paula, Sérgio Oliveira de, 1976-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.26

THALYA FURTADO LOPES

Avaliação dos efeitos de um coquetel fágico inespecífico sobre o biofilme e crescimento de *Stutzerimonas stutzeri*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de agosto de 2025.

Assentimento:

Thalya Furtado Lopes
Autora

Sergio Oliveira de Paula
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 31/10/2025 às 21:42:51 e pelo orientador em 31/10/2025 às 21:51:55. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **I3PE.R3PI.BAHR** e clique no botão 'Validar documento'.

À minha mãe, que sempre acreditou na educação como ferramenta de mudança, e que nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me conduziu até aqui com saúde e proteção, e que sempre acompanhou meus passos, mesmo em meio às dúvidas e anseios.

À minha mãe, Rose, incansável guerreira que sempre priorizou os estudos. Nunca me esquecerei de quando fui aprovada no vestibular da UFV e ela, preocupada sem saber como manteria duas filhas estudando fora, não pensou duas vezes em arranjar um segundo emprego. Foi ela quem sempre me ouvia falar de cursos, congressos, eventos científicos e dava um jeito de me enviar o valor da inscrição. Tudo o que sou, o que conquistei – e o que ainda conquistarei – devo a você, mãe. À minha irmã, Stella, por todo apoio e incentivo.

Aos meus avós, Luzia e Valdemiro, por todas as orações.

Ao meu amor, Alexandre, que veio para trazer calma e segurança em meio às incertezas.

Aos amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular, que tornaram essa jornada mais leve: José, Fabi, Paloma, Lu, Adrielle, Flávia, Ana Júlia e Laís.

Não poderia deixar de agradecer especialmente aos que me ajudaram em cada etapa para que este trabalho fosse realizado. José, além de amigo e confidente, obrigada por me ensinar, me acompanhar e me ajudar ativamente nos experimentos, e por toda a convivência diária que fez tudo ser mais divertido. Adrielle, obrigada por toda a paciência e disposição em me ajudar em absolutamente tudo - não tenho palavras suficientes para agradecer! Paloma, obrigada por ter me acolhido como estagiária em 2024 e por continuar me ajudando até aqui. Flávia, obrigada por todos os ensinamentos – especialmente com a biologia molecular.

Ao professor Sérgio, pela acolhida, pela oportunidade de iniciar este projeto e pela confiança depositada em mim para a sua realização.

Ao Dr. Roberto, por todos os ensinamentos e sugestões ao longo deste trabalho.

Agradeço também aos técnicos e professores que tornaram possíveis as análises experimentais: ao Núcleo de Microscopia e Microanálise, Gilmar, Karla e Rosângela, muito obrigada. Ao Prof. Sukarno, pelo auxílio com a perfilometria óptica. Ao Dr. Alex, pela ajuda com a microscopia de fluorescência.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realizar este sonho.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Se você prefere a vida acadêmica como um retiro da realidade, não escolha a biologia. Essa área é para um homem ou mulher que deseja ir ainda mais para perto da vida”.

(Hermann Muller)

RESUMO

LOPES, Thalya Furtado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2025. **Avaliação dos efeitos de um coquetel fágico inespecífico sobre o biofilme e crescimento de *Stutzerimonas stutzeri*.** Orientador: Sergio Oliveira de Paula. Coorientador: Roberto Sousa Dias.

A corrosão microbiologicamente induzida (CMI) representa um desafio econômico e ambiental relevante, especialmente nas indústrias de petróleo e gás, onde a formação de biofilmes por microrganismos acelera a deterioração de superfícies metálicas. Entre as espécies bacterianas associadas a esse fenômeno destaca-se *Stutzerimonas stutzeri*, bactéria de origem marinha com capacidade de formar biofilmes e degradar hidrocarbonetos, comprometendo a integridade de estruturas metálicas e a qualidade do petróleo. Estratégias inovadoras de controle, como o uso de bacteriófagos, têm se mostrado alternativas promissoras aos biocidas químicos, devido à sua especificidade, à produção de enzimas que degradam a matriz extracelular e ao potencial de aplicação em coquetéis combinados. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos de fagos isolados e de um coquetel fágico inespecífico sobre o crescimento e a formação de biofilme de *S. stutzeri*. Ensaio foram conduzidos em microplacas MBEC (*Minimum Biofilm Eradication Concentration*) e em tanques piloto contendo cupons de aço carbono, com avaliação do crescimento bacteriano, biomassa total, morfologia do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), rugosidade superficial por perfilometria óptica e observação de células aderidas por microscopia de fluorescência. Os resultados mostraram que, embora o coquetel fágico não tenha causado uma redução significativa no crescimento de células planctônicas, foi capaz de prevenir a formação de biofilme, especialmente em uma Multiplicidade de Infecção (MOI) de 10. A análise de perfilometria óptica indicou menor rugosidade nos cupons tratados, sugerindo menor presença de biofilme. A microscopia de fluorescência também revelou células mais espaçadas nos cupons tratados com o coquetel no MOI 10. Esses resultados sugerem o potencial biotecnológico do coquetel fágico para o controle do biofilme de *S. stutzeri* e para a mitigação da CMI em ambientes industriais, como a exploração de petróleo.

Palavras-chave: corrosão microbiologicamente induzida; bacteriófagos; fagoterapia; superfícies metálicas

ABSTRACT

LOPES, Thalya Furtado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2025.
Evaluation of the effects of a nonspecific phage cocktail on the biofilm and growth of *Stutzerimonas stutzeri*

. Adviser: Sergio Oliveira de Paula. Co-adviser: Roberto Sousa Dias.

Microbiologically Induced Corrosion (MIC) represents a significant economic and environmental challenge, especially in the oil and gas industries, where the formation of biofilms by microorganisms accelerates the deterioration of metallic surfaces. Among the bacterial species associated with this phenomenon, *Stutzerimonas stutzeri* stands out. This is a marine bacterium with the capacity to form biofilms and degrade hydrocarbons, thus compromising the integrity of metallic structures and oil quality. Innovative control strategies, such as the use of bacteriophages, have proven to be promising alternatives to chemical biocides due to their specificity, their production of enzymes that degrade the extracellular matrix, and their potential for application in combined cocktails. In this work, the effects of isolated phages and a non-specific phage cocktail on the growth and biofilm formation of *S. stutzeri* were evaluated. Assays were conducted in MBEC (Minimum Biofilm Eradication Concentration) microplates and in pilot tanks containing carbon steel coupons, with assessment of bacterial growth, total biomass, biofilm morphology by Scanning Electron Microscopy (SEM), surface roughness by optical profilometry, and observation of adhered cells by fluorescence microscopy. The results showed that, although the phage cocktail did not cause a significant reduction in the growth of planktonic cells, it was capable of preventing biofilm formation, especially at a Multiplicity of Infection (MOI) of 10. Optical profilometry analysis indicated lower roughness on the treated coupons, suggesting a lower presence of biofilm. Fluorescence microscopy also revealed more spaced-out cells on the coupons treated with the cocktail at MOI 10. These results suggest the biotechnological potential of the phage cocktail for the control of *S. stutzeri* biofilm and for the mitigation of MIC in industrial environments, such as oil exploration.

Keywords: microbiologically induced corrosion (MIC); bacteriophages; phage therapy; metallic surfaces.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Indústria de óleo e gás e a Corrosão Microbiologicamente Induzida (CMI) .	13
2.2. Biofilmes.....	14
2.3. Bacteriófagos e a fagoterapia	15
2.4. Aspectos taxonômicos de <i>Stutzerimonas stutzeri</i>	19
2.5. Distribuição ecológica de <i>Stutzerimonas stutzeri</i>	20
2.6. Potencial biodegradador de hidrocarbonetos.....	21
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Isolados bacterianos e condições de cultivo	22
4.2. Extração de DNA e identificação molecular	22
4.3. Curva de crescimento bacteriano.....	23
4.4. Contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)	23
4.5. Propagação viral e formulação do coquetel fágico.....	23
4.6. Curva de crescimento bacteriano na presença dos fagos e do coquetel	25
4.7. Quantificação da biomassa total do biofilme formado	25
4.8. Ensaio MBEC.....	26
4.9. Microscopia de fluorescência de células aderidas	26
4.10. Ensaio em tanques piloto.....	27
4.10.1. Sistema de tanques piloto.....	27
4.10.2. Corpos de prova	27
4.10.3. Montagem do sistema de tanques piloto	28
4.10.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	28
4.10.5. Perfilometria Óptica	29
4.10.6. Estimativa de células aderidas.....	29
4.11. Análises estatísticas	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Identificação e análise filogenética através do gene <i>16S rRNA</i>	30
5.2. Curva de crescimento bacteriano.....	31
5.3. Montagem do coquetel fágico	31
5.4. Curva de crescimento bacteriano na presença dos fagos.....	32

5.5.	Curva de crescimento bacteriano na presença do coquetel fágico	32
5.6.	Quantificação da biomassa total do biofilme por coloração com cristal violeta 33	
5.7.	Prevenção de biofilme com o coquetel em diferentes MOIs	34
5.8.	Ensaio MBEC	35
5.9.	Ensaio em tanques piloto	36
5.9.1.	Estimativa de células aderidas nos cupons	36
5.9.2.	Microscopia eletrônica de varredura	37
5.9.3.	Perfilometria óptica	39
5.9.4.	Microscopia de fluorescência.....	43
6.	DISCUSSÃO	45
7.	CONCLUSÃO.....	50
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS	50
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam bactérias e estão entre as entidades biológicas mais abundantes do planeta (Breitbart *et al.*, 2018). Desde sua descoberta no início do século XX, têm despertado interesse pela capacidade de controlar populações bacterianas e foram amplamente explorados como agentes terapêuticos, especialmente nas primeiras décadas daquele século, quando preparações fágicas eram produzidas em larga escala para o tratamento de infecções bacterianas (Bruynoghe e Maisin, 1921; Sulakvelidze *et al.*, 2001). No entanto, com o advento dos antibióticos e a facilidade de sua produção industrial, o uso terapêutico dos fagos foi gradualmente substituído. Nas últimas décadas, porém, o aumento da resistência antimicrobiana e a redução na descoberta de novos antibióticos têm reacendido o interesse pelo potencial dos fagos como alternativa biotecnológica (Gargate, Laws e Rahman, 2025). Além da resistência associada aos antibióticos, a exposição bacteriana a concentrações subletais de biocidas também pode selecionar fenótipos resistentes (O'Reilly *et al.*, 2025), o que reforça a necessidade de estratégias de controle microbiano mais específicas e sustentáveis.

No contexto ambiental e industrial, os biocidas desempenham papel central na manutenção da segurança sanitária, sendo amplamente aplicados em procedimentos de desinfecção, inclusive em sistemas aquáticos. (O'Reilly *et al.*, 2025). No entanto, são produtos químicos de elevado custo, danosos ao meio ambiente devido à sua toxicidade e persistência em resíduos industriais e, ainda, sua eficácia pode ser comprometida frente à presença de biofilmes bacterianos. Alguns biocidas apresentam dificuldade em penetrar a matriz do biofilme e, mesmo quando o fazem, podem induzir o surgimento de bactérias resistentes (Guamet e Gómez De Saravia, 2005; Little *et al.*, 2007).

Os biofilmes são comunidades de microrganismos altamente organizadas que aumentam a eficiência de sobrevivência das células, tornando-as até mil vezes mais resistentes a pressões como antibióticos, desinfetantes, flutuações mecânicas e remoção física em comparação com as células planctônicas (Kang *et al.*, 2023). As células do biofilme estão aderidas a uma superfície de forma sésil, e são imersas em uma substância extracelular polimérica (EPS) rica em diferentes compostos, como polissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA.

Os biofilmes têm um impacto amplo em vários ambientes. Por exemplo, eles podem se desenvolver em cateteres hospitalares, resultando em obstrução e agravamento de doenças crônicas, em sistemas de abastecimento de água potável, e, por fim, em superfícies metálicas – como em tubulações e tanques de armazenamento industrial - levando a redução da vida útil de equipamentos (Thapa, Kim e Kim., 2023; Sharma *et al.*, 2023; Gholipour *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2023).

Esse último caso é particularmente relevante no contexto ambiental, pois a presença e atividade microbiana sobre superfícies metálicas podem acelerar processos de deterioração, fenômeno conhecido como corrosão microbiologicamente induzida (CMI). A CMI existe amplamente em ambientes marinhos, campos de petróleo, ambientes de água doce, solo e outros ambientes naturais, e é uma das principais causas de corrosão dos metais e outros materiais (Shi *et al.*, 2023). O prejuízo causado pela corrosão corresponde a cerca de 3 a 4% do produto interno bruto de cada país, e a CMI pode representar até 20% desses custos (Koch, 2017).

Diante do cenário atual, onde a CMI e a resistência antimicrobiana impõem desafios econômicos e ambientais significativos à indústria, estratégias inovadoras de controle biológico têm ganhado destaque. A fagoterapia surge como promissora neste cenário, considerando a alta especificidade dos fagos, seu ciclo de vida lítico, a presença de enzimas degradadoras do EPS e a possibilidade de formulação de coquetéis fágicos, potencializando a eficácia contra comunidades bacterianas resistentes.

Diante disso, o presente trabalho propõe avaliar o potencial de fagos isolados e de um coquetel fágico inespecífico no controle do biofilme formado por *Stutzerimonas stutzeri*, uma bactéria de origem marinha capaz de degradar hidrocarbonetos e se aderir a superfícies metálicas, contribuindo para processos de corrosão e perda da qualidade do petróleo. A escolha do coquetel baseia-se em estudos anteriores, nos quais essa formulação foi aplicada no controle de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e apresentou resultados promissores, mesmo sem relação de especificidade com esses microrganismos (Cunha, 2021; Silva, 2022). Essa observação sugere que os fagos podem exercer efeitos indiretos sobre diferentes espécies bacterianas, possivelmente mediados por enzimas extracelulares liberadas durante o ciclo lítico - como depolimerases e lisozimas - capazes de desestruturar o biofilme. Assim, este estudo busca compreender de forma inédita o efeito desses fagos, isoladamente e em combinação, sobre o crescimento e a adesão de *S. stutzeri*

em sistemas de bancada e em tanques piloto que simulam condições de ambiente marinho, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas mais sustentáveis de mitigação da corrosão microbiologicamente induzida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Indústria de óleo e gás e a Corrosão Microbiologicamente Induzida (CMI)

A indústria de óleo e gás é essencial para o abastecimento energético mundial, mas enfrenta um desafio constante: a corrosão. Segundo a National Association of Corrosion Engineers (NACE), a corrosão impõe à indústria um custo anual elevado de US\$ 1,372 bilhão. Segundo levantamento do Oil & Gas News em 2024, esse valor se distribui em US\$ 589 milhões para manutenção de tubulações e instalações de superfície, US\$ 463 milhões para os gastos anuais com tubulação de fundo de poço e US\$ 320 milhões em despesas de capital voltadas à corrosão. As repercussões econômicas e ambientais da corrosão no setor tendem a aumentar. Com o avanço da exploração em ambientes mais extremos, como reservatórios profundos com elevadas temperaturas, pressões e concentrações de gases ácidos, a vulnerabilidade à corrosão cresce consideravelmente.

A corrosão microbiologicamente induzida (CMI) é um processo eletroquímico que causa a deterioração de um material, sendo iniciado, intensificado ou sustentado pela presença de microrganismos e suas atividades metabólicas (Little et al., 2006). As perdas econômicas globais associadas à CMI na indústria de petróleo e gás chegam a aproximadamente US\$60 bilhões anuais, devido a fatores como substituição de equipamentos, redução de eficiência e altos custos de manutenção (Prasad, 2020). Mesmo quando os microrganismos não corroem diretamente o substrato, a formação de biofilmes pode diminuir a eficiência de equipamentos, como trocadores de calor e tubulações de transporte.

A corrosão pode afetar os oleodutos, pontes de transporte, plataformas offshore em ambientes marítimos e infraestruturas portuárias. Em oleodutos, o processo corrosivo pode começar com danos à estrutura interna ou ao revestimento da superfície externa. Agentes corrosivos presentes no petróleo bruto ou matéria-prima associados ao processo contribuem para o problema. Tubulações corroídas, com superfícies externas desgastadas e propensas a vazamentos, podem resultar em

quedas de pressão nos sistemas de bombeamento de petróleo, reduzindo indiretamente os lucros da operação.

As soluções utilizadas atualmente, em sua maioria, envolvem compostos tóxicos, o que tem impulsionado a busca por alternativas menos agressivas ao ambiente.

2.2. Biofilmes

Biofilmes são agregados microbianos envolvidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), composta por proteínas, lipídios e DNA extracelular, proporcionando proteção contra estressores ambientais e agentes antimicrobianos (Shree *et al.*, 2023). As EPS formam uma rede que conecta as células e as fixa à superfície, conferindo estabilidade estrutural ao biofilme, criando um ambiente interno estável que favorece a sobrevivência das células (Flemming *et al.*, 2016).

No ambiente, as células bacterianas frequentemente adotam um estilo de vida sésil, unindo-se a superfícies bióticas ou abióticas através de interações com essas superfícies, o que leva à formação de biofilmes. Segundo Flemming *et al.* (2016), as células dentro do biofilme mostram resistência à ação antimicrobiana e, mesmo em condições estressantes, como a aplicação de biocidas, as células em estado metabólico dormente não são eliminadas. Isso resulta em um ciclo contínuo de crescimento microbiano, gerando resistência bacteriana, necessidade de dosagens mais altas de biocidas e impactos negativos sobre o meio ambiente e a segurança dos manipuladores (Xu e Gu, 2015).

Bactérias presentes em ambientes contaminados por óleo frequentemente formam biofilmes como estratégia para superar a baixa solubilidade dos hidrocarbonetos nesse meio (Ehiosun *et al.*, 2022). A formação de biofilmes durante a degradação de hidrocarbonetos é uma estratégia adaptativa, na qual as células se aderem aos hidrocarbonetos na interface água-óleo (Dasgupta *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2014; Sivadon *et al.*, 2019). Além disso, as células e os agentes solubilizadores que elas liberam, como biossurfactantes e exoenzimas, fundamentais para a assimilação de hidrocarbonetos, ficam retidos e acumulados na matriz de EPS (Ennouri *et al.*, 2017; Sivadon *et al.*, 2019).

Para controlar a formação e desenvolvimento do biofilme, existem diversos métodos, a saber: a inibição da adesão bacteriana, a inibição da formação da matriz extracelular, a inibição do *quorum sensing* e interferência no metabolismo bacteriano.

Neste cenário, são empregados métodos químicos e/ou físicos, como antibióticos, biocidas, irradiação de luz não invasiva, e nanomotores (Kang *et al.*, 2023). Métodos biológicos também podem ser empregados, como o uso de fagos e probióticos (Tatsaporn, 2020).

Os biofilmes de *S. stutzeri*. são frequentemente detectados em ambientes marinhos e contribuem para a corrosão acelerada de superfícies metálicas e de aço (Sánchez-Lozano *et al.*, 2023; Pérez-Padilla *et al.*, 2025).

2.3. Bacteriófagos e a fagoterapia

Relatos indicam que a primeira observação dos fagos se deu em 1896, por Ernest Hankin, que observou uma limitação no crescimento de *Vibrio cholera* na amostra de água dos rios Ganges e Jumna, na Índia (Abedon *et al.*, 2011). Somente no início do século XX é que Félix D'Hérelle (1917) validou a hipótese de Frederick Twort (1915), de que as zonas claras com efeito letal ao redor das colônias de *Micrococcus* eram vírus (Duckworth, 1976). Os fagos são as entidades biológicas mais abundantes no planeta, especialmente nos oceanos, onde, em um litro de água do mar, existem cerca de 10^{10} partículas virais (Breitbart *et al.*, 2018). Os vírus infectam a grande maioria dos organismos marinhos, desde o fitoplâncton, passando por invertebrados, até mamíferos da megafauna (Munn, 2006). Contudo, como as bactérias são os microrganismos mais abundantes no mundo, é provável que a maioria dos vírus (nesse caso, os fagos) consigam infectá-las.

D'Hérelle aplicou e conduziu diversos estudos para testar o potencial dos fagos contra bactérias, incluindo o tratamento de pacientes infectados com cólera e disenteria (Fruciano e Bourne, 2007; Dublanquet e Fruciano, 2008). O primeiro artigo sobre terapia fágica foi publicado em francês em 1921 e focava em infecções causadas por estafilococos (Bruynoghe e Maisin, 1921). Durante o período Entre-Guerras (1918-1939), vários pesquisadores europeus se debruçaram a entender os bacteriófagos, como o Prof. George Eliava, que trabalhou com o próprio D'Hérelle nos anos de 1918 a 1920 (Myelnikov, 2018). O Instituto Eliava, criado posteriormente, empregou aproximadamente 1.200 pesquisadores, que produziam preparações de fagos (chegando a toneladas por dia) contra vários patógenos bacterianos (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Todos os fagos compartilham uma estrutura básica, composta por um genoma de ácido nucleico envolto por um capsídeo, que protege o material genético e facilita sua transferência para a célula hospedeira (Kasman, 2022).

Quando um bacteriófago encontra uma célula suscetível, ele injeta seu material genético no hospedeiro. A partir desse ponto, dois ciclos tradicionais podem ser seguidos: o ciclo lisogênico, onde o material genético viral se integra ao cromossomo da bactéria, e o ciclo lítico, que leva à lise celular e a liberação de novos vírions no ambiente (figura 1). Do ponto de vista biotecnológico, os fagos líticos são de interesse, pois possuem uma alta taxa de replicação, podem lisar e levar à morte das células hospedeiras, não carregam genes de virulência no genoma do hospedeiro (haja vista que não se integram ao genoma, como no caso dos fagos temperados) e se auto propagam (Álvarez e Biosca, 2025).

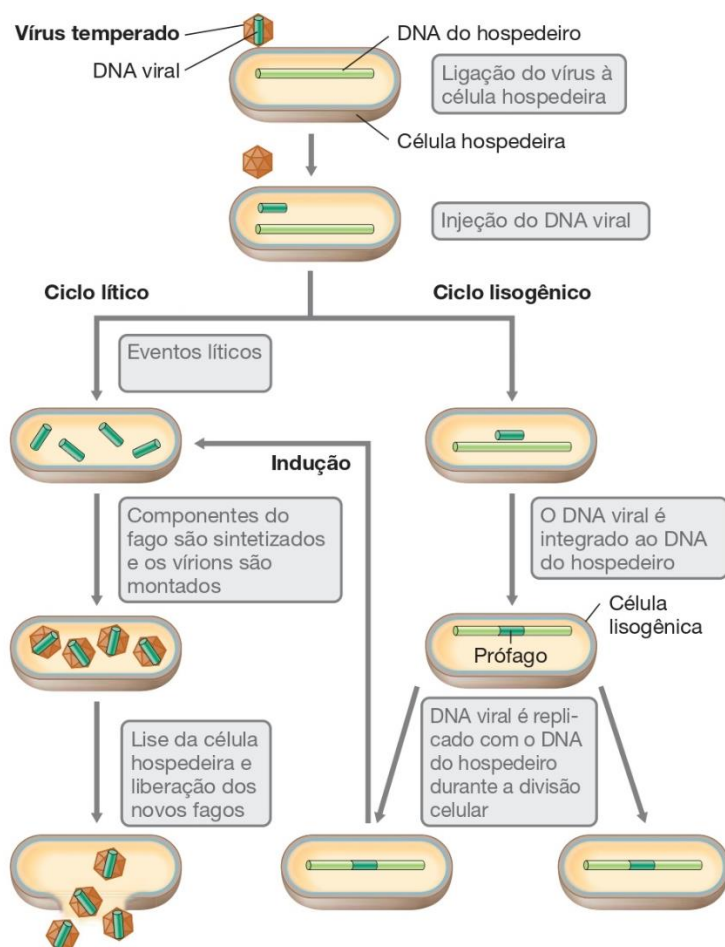


Figura 1. Ciclo lítico e lisogênico dos fagos (Madigan *et al.*, 2016).

Embora estratégias baseadas em fagos representem uma alternativa promissora para o controle microbiano, o uso extensivo de antibióticos ainda

predomina em diferentes setores. Essa prática contribui diretamente para a liberação desses compostos no ambiente e para a intensificação da pressão seletiva sobre comunidades bacterianas, favorecendo a disseminação de genes de resistência.

Diversas pesquisas apontam que a elevada concentração de antibióticos em várias amostras de águas residuais pode elevar as taxas de aquisição de resistência das bactérias ali presentes (Sutradhar *et al.*, 2023; Maghsodian *et al.*, 2022; Mutuku *et al.*, 2022). Atualmente, 70 dos 100 tipos de antibióticos utilizados por humanos e outros organismos foram detectados em águas superficiais e sedimentos (Maghsodian *et al.*, 2022).

De forma semelhante ao que ocorre com os antibióticos, pesquisas recentes mostram que a redução da suscetibilidade bacteriana a biocidas está aumentando, e que os genes envolvidos - capazes de elevar a concentração inibitória mínima (CIM) - estão frequentemente ligados à transferência genética horizontal por elementos móveis. Além disso, mutações adquiridas que conferem resistência a biocidas também aparecem associadas a bactérias resistentes a antibióticos, incluindo patógenos críticos e de alta prioridade listados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Esse cenário, especialmente entre os patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*), ameaça comprometer a eficácia das estratégias de desinfecção em saúde pública. Embora seja raro que bactérias resistam às altas concentrações normalmente usadas de desinfetantes e antissépticos, a tendência de queda na suscetibilidade acende um alerta para o futuro uso desses compostos (O'Reilly *et al.*, 2025).

A fagoterapia tem se destacado não apenas como alternativa diante do aumento da resistência bacteriana a antibióticos e biocidas, mas também por suas vantagens práticas, econômicas e ambientais. Diferentemente dos compostos químicos convencionais, os fagos são altamente específicos, atuando apenas sobre a bactéria-alvo, sem afetar os demais microrganismos, e sem gerar resíduos tóxicos. Neste sentido, a fagoterapia ajudaria a reduzir a quantidade de reagentes químicos nocivos – como os biocidas - para as bactérias benéficas e para o meio ambiente (Mathieu *et al.*, 2019).

Outro ponto relevante é que os fagos podem se replicar no local de aplicação enquanto houver células hospedeiras disponíveis, o que reduz a necessidade de reaplicações frequentes e aumenta a eficiência do tratamento ao longo do tempo. Em

comparação, os biocidas e antibióticos costumam exigir reaplicações constantes e apresentam custo mais elevado de formulação e descarte, além de perderem eficiência frente a biofilmes maduros e resistentes (Álvarez e Biosca, 2025).

Ainda, o uso de fagos também se alinha à abordagem *One Health*, que integra a saúde humana, animal e ambiental. Por serem agentes biológicos naturais, os fagos podem contribuir direta ou indiretamente para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) relacionados à saúde e bem-estar, segurança alimentar e proteção ambiental (Organização das Nações Unidas, 2015).

A aplicação de bacteriófagos tem sido estudada como uma alternativa promissora para o controle de biofilmes bacterianos (Lu e Koeris, 2011). Esses vírus podem atuar tanto na formação quanto na eliminação dos biofilmes, graças à presença de enzimas como as depolimerases, que podem estar associadas à estrutura dos fagos - como fibras ou cauda - ou liberadas durante a lise das células bacterianas. Essas enzimas têm a capacidade de degradar os componentes da matriz extracelular, desestabilizar as bactérias que estão na forma planctônica, facilitar o contato entre o fago e os receptores da célula hospedeira.

Acerca das depolimerases, os fagos podem comprometer a estrutura do biofilme através da degradação de polissacarídeos de superfície, como exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos (LPS). Essa ação desorganiza a matriz do biofilme mesmo sem infectar diretamente as células bacterianas, tornando-as mais susceptíveis a estresses físicos (como a dessecação) e químicos (como os antibióticos) (Roach e Donovan, 2015). Dessa forma, diferentes fagos podem ser empregados no biocontrole de biofilmes mesmo sem infectarem diretamente a bactéria (Latka *et al.*, 2017; Abdelkader *et al.*, 2019). Exemplos experimentais reforçam esse efeito: Cunha (2021) observou que fagos isolados de *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* e *Shigella flexneri* foram capazes de reduzir a formação de biofilme de *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus* (espécies não hospedeiras). Isso indica que a ação indireta dos fagos, mediada por enzimas extracelulares, pode contribuir significativamente para o controle da formação de biofilme.

O uso da fagoterapia como estratégia de controle biológico apresenta várias vantagens em relação aos antimicrobianos tradicionais. Os bacteriófagos são encontrados naturalmente em diversos ambientes e fazem parte da microbiota com a

qual os seres humanos entram em contato frequentemente, sem causar danos à saúde.

2.4. Aspectos taxonômicos de *Stutzerimonas stutzeri*

O gênero *Pseudomonas* é um dos mais antigos na taxonomia bacteriana, remontando ao ano de 1894, quando foi descrito por Migula, que designou *Bacterium aeruginosum* (Schroeter, 1872) como a espécie-tipo do gênero. Desde então, a definição do gênero passou por várias revisões. A descrição proposta por Palleroni (2005) no Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (1984) define o grupo como: bastonetes, Gram-negativos, geralmente móveis por flagelos polares (Yang *et al.*, 2013), com metabolismo estritamente respiratório, com o oxigênio comoceptor final de elétrons.

Uma enorme confusão da taxonomia e nomenclatura acerca do gênero ocorreu ao longo das décadas. *Pseudomonas stutzeri*, foi descrita há mais de 100 anos por Burri e Stutzer em 1895, como *Bacillus denitrificans* II. Entre os problemas de nomenclatura enfrentados ao longo dos anos (Van Niel e Allen, 1952), destacam-se a variedade de nomes que a espécie recebeu ao longo dos anos, como: *Bacterium stutzeri* (Lehman e Neumann, 1896), *Bacillus nitrogenus* (Migula, 1900), *Bacillus stutzeri* (Chester, 1901), *Achromobacter sewerinii* (Bergey *et al.*, 1923), *Achromobacter stutzeri* (Bergey, 1930) e *Pseudomonas stutzeri* (Sijderius, 1946). Sua designação como *P. stutzeri* foi estabelecida por Lehman e Neumann (1896).

Apesar de algumas diferenças em relação à cepa-tipo (*Pseudomonas aeruginosa*), as similaridades nas sequências de rRNAs por hibridização DNA-rRNA justificam a inclusão de *P. stutzeri* no gênero *Pseudomonas* (van Niel e Allen, 1952).

Embora *P. stutzeri* apresente um conjunto bem caracterizado de traços morfológicos, fisiológicos e bioquímicos que permitem distingui-la de outras espécies do mesmo gênero, essa espécie abriga uma ampla variabilidade genética (García-Valdés *et al.*, 2010). Devido à alta diversidade genômica das várias cepas de *P. stutzeri*, alguns autores usam termos como: “grupo *P. stutzeri*”, “superespécie *P. stutzeri*” (Sorokin, Teske, Kuenen, 1999) ou “complexo *P. stutzeri*” (Yamamoto *et al.*, 2000).

Essa diversidade é evidenciada pela presença de múltiplos genomovares (gv) (grupos genômicos com diferenças suficientes para sugerir uma divisão em espécies diferentes). Existem, pelo menos, 18 gv identificados. Membros do mesmo gv

compartilham mais de 70% de similaridade ao fazer a hibridização DNA-DNA, enquanto cepas de diferentes gv possuem valores de hibridização menores que 65%.

Antes da popularização das abordagens genômicas, *P. stutzeri* era confundida frequentemente com outras espécies de *Pseudomonas*, como *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes* e *P. putida*. Mais de um século após a descoberta da espécie, graças aos avanços nas técnicas de sequenciamento, a taxonomia do gênero *Pseudomonas* passou por uma grande revisão. Em 2022, foi proposto o novo gênero *Stutzerimonas*, para acomodar a espécie *P. stutzeri* e outras espécies relacionadas (Lalucat *et al.*, 2022).

Stutzerimonas stutzeri, anteriormente classificada como *P. stutzeri* é um bacilo, de 1 a 3 um de comprimento e 0,5 um de largura, pertencente à classe *Gammaproteobacteria*, Gram negativas, catalase e oxidase positivas, com metabolismo estritamente respiratório (Lalucat *et al.*, 2006). Além disso, são desnitrificantes e não produzem pigmentos fluorescente, o que as diferencia de outros membros do gênero *Pseudomonas* spp.

2.5. Distribuição ecológica de *Stutzerimonas stutzeri*

S. stutzeri possui distribuição quase universal (García-Valdés *et al.*, 2010). Cepas da espécie podem ser encontradas nos solos, associadas às plantas, onde desempenham um papel crucial nos ciclos de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, e em águas subterrâneas com baixa disponibilidade de nutrientes e oxigênio, como em águas profundas. A ocorrência de cepas de *S. stutzeri* no ambiente marinho, como em colunas d'água e em sedimentos, permite que ela seja classificada como uma bactéria de origem marinha, ou seja, possui características fisiológicas que requerem (ou pelo menos toleram) altas concentrações de sal (Lalucat *et al.*, 2006).

No ambiente marinho, *S. stutzeri* é reconhecida como uma bactéria capaz de realizar a nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia (HN/AD) (Medina *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2011). Este processo permite que a bactéria utilize nitrato, nitrito e também amônio, que é um importante efluente gerado durante a exploração do petróleo e que pode ser prejudicial ao meio ambiente (Ahn, 2006; Munirasu, Haija e Banat, 2016). Essa versatilidade metabólica reflete a capacidade de *S. stutzeri* conseguir sobreviver em ambientes anaeróbicos, como é o caso das águas subterrâneas de extração de petróleo (Knowles, 1982; Zumft, 1997) e causar danos às estruturas metálicas associadas ao ambiente de exploração de petróleo.

2.6. Potencial biodegradador de hidrocarbonetos

S. stutzeri está envolvida em diversas atividades metabólicas, das quais se destaca a degradação de compostos xenobióticos, como hidrocarbonetos aromáticos e não aromáticos. As vias de degradação do naftaleno, fenantreno e β -cetoadipato são as vias de degradação de hidrocarbonetos aromáticos mais extensivamente estudados na espécie *S. stutzeri* (Galmés, 2016).

Li e colaboradores (2019) relataram que a cepa *Pseudomonas* spp. LKY-5 revelou fortes atividade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo em alta salinidade (3%) e alta alcalinidade (pH 9,0) em condições aeróbias. Lin e colaboradores (2023) demonstraram que as concentrações de diferentes frações de petróleo diminuíram na presença da cepa M3 de *S. stutzeri*, que possui diversos genes funcionais para a degradação do petróleo.

No contexto de armazenamento de petróleo, a degradação de compostos aromáticos representa uma perda significativa da qualidade do produto final. A presença de microrganismos como *S. stutzeri* nesses ambientes pode contribuir para alterações químicas indesejadas, já que a espécie possui um arsenal enzimático capaz de atuar sobre frações complexas do petróleo, inclusive em condições adversas como alta salinidade e pH elevado. Por isso, compreender o papel dessa bactéria na biodegradação de hidrocarbonetos se torna fundamental tanto do ponto de vista ambiental quanto industrial.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de bacteriófagos inespecíficos usados isoladamente e em um coquetel sobre o biofilme de bactérias isoladas de ambientes de produção de petróleo.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento e a formação de biofilme por *S. stutzeri* em placas MBEC e cupons de aço carbono;
- Avaliar a eficácia do coquetel fágico inespecífico em prevenir a formação de biofilme por *S. stutzeri* em placas MBEC e tanques pilotos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Isolados bacterianos e condições de cultivo

Dois isolados bacterianos foram obtidos da coleção do Laboratório de Microbiologia Ambiental Aplicada (LAMAP-UFV), a saber: *Gordonia amicalis* UFV4 (isolado 2.26) e *Pseudomonas balearica* UFV3 (isolado 2.23) e encontram-se na tabela 1. As espécies foram isoladas de uma amostra de sistema de tratamento de efluentes por lodo ativado, proveniente do Terminal Marítimo de exploração de petróleo e utilizadas para os ensaios. Já as bactérias *Escherichia coli* 30 e *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 foram utilizadas para propagação, titulação e manutenção dos fagos utilizados. A cepa de *E. coli* 30 foi originalmente isolada de um caso de mastite bovina e cedida pela EMBRAPA® Gado de Leite, e a hospedeira *E. cloacae* faz parte do estoque bacteriano do Laboratório de Imunovirologia Molecular da UFV.

As bactérias foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) (10 g NaCl₂, 10 g peptona e 5 g extrato de levedura por litro) sob agitação de 100 rpm e temperatura ótima de crescimento de 30 °C *overnight* e estocadas em glicerol 20% (v/v) no ultra freezer.

Tabela 1. Isolados bacterianos, número de acesso no *GenBank*, identificação por Gram e metabolismo de oxigênio.

Bactéria	Número de acesso	Gram	Metabolismo de oxigênio
<i>Gordonia amicalis</i> UFV4	KU904410.1	+	Aeróbica
<i>Pseudomonas balearica</i> UFV3	KX495190.2	-	Anaeróbia facultativa

4.2. Extração de DNA e identificação molecular

O DNA dos isolados bacterianos foi extraído conforme descrito por Pospiech & Neumann (1995). Após a extração, a avaliação da pureza e quantificação do DNA foram realizadas no espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Thermo Scientific™) a 230, 260 e 280 nm. Posteriormente, o DNA foi submetido à reação em cadeia da polimerase utilizando os primers 10f e 1100r (LANE *et al.*, 1991), homólogos às regiões conservadas do domínio 16S *rRNA* de bactérias. Os fragmentos amplificados de 16S *rRNA* foram purificados através do kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA) seguindo as recomendações do

fabricante e enviados para o sequenciamento (ACTGene LTDA). A sequência gerada foi comparada com outras já depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio da ferramenta BLASTn. O alinhamento das sequências foi feito utilizando o programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997) e analisado com o software MEGA 7.0.18 (Tamura *et al.*, 2007). Por fim, foi construída uma árvore filogenética pelo método *Neighbor-Joining* com 1.000 repetições de *bootstrap*, a fim de avaliar a confiabilidade estatística dos agrupamentos filogenéticos formados.

4.3. Curva de crescimento bacteriano

Para determinar a fase logarítmica de crescimento bacteriano de *G. amicalis* e *P. balearica*, foram realizadas curvas de crescimento segundo o protocolo de Sharma *et al.* (2021) com modificações. Resumidamente, em uma microplaca de 96 poços, 200 µL de meio LB caldo foram adicionados aos poços controle. Nos demais poços, 180 µL de caldo LB e 20 µL de suspensão bacteriana na DO₆₀₀ 0.2 foram adicionados e a placa foi incubada a 30 °C por 48 h no leitor de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific®) com leituras a cada 15 min em um comprimento de onda de 600 nm.

4.4. Contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)

Para avaliar a contagem de unidades formadoras de colônia, os isolados foram cultivados em meio LB até atingir a DO₆₀₀ 0.2. Posteriormente, a bactéria foi submetida a diluição seriada de PBS 1X (NaCl 0,13 M, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 9 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,4), até 10⁻⁶ e plaqueada pelo método *spread plate*. Para isto, 100 µL de cada diluição foram espalhados em placas de Petri contendo ágar LB 1,5% (m/v) e incubadas a 30 °C por 48 h. Foram utilizadas duas placas (duplicatas) para cada diluição. As contagens de UFC/mL foram determinadas utilizando a equação 1:

Equação 1. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

$$\frac{\text{número de colônias} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume da alíquota plaqueada (mL)}}$$

4.5. Propagação viral e formulação do coquetel fágico

O coquetel de bacteriófagos utilizado foi composto por quatro fagos previamente isolados pelo LIVM da UFV, como *vB_EcoM-UFV09*, *vB_EcoM-UFV13* e *Escherichia phage EcoM1*, os quais infectam *E. coli* 30, e o fago *vB_EcIM-UFV01*, que

tem *E. cloacae* ATCC 13047 como hospedeira. Todos os fagos encontram-se depositados no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) e seus números de acesso encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Fagos isolados pelo LIVM e suas respectivas bactérias hospedeiras.

Fago	Abreviação	Nº de acesso (GenBank)	Bactéria hospedeira
<i>vB_EcoM-UFV09</i>	<i>EcoM-UFV09</i>	MZ291552	<i>E. coli</i> 30
<i>vB_EcoM-UFV13</i>	<i>EcoM-UFV13</i>	NC_031103	<i>E. coli</i> 30
<i>Escherichia phage EcoM1</i>	<i>EcoM1</i>	PQ818760	<i>E. coli</i> 30
<i>vB_EcIM-UFV01</i>	<i>EcIM-UFV01</i>	ON454249	<i>E. cloacae</i> ATCC 13047

Inicialmente, para a preparação dos pré-inóculos, uma colônia isolada de cada bactéria hospedeira foi ativada em caldo LB. A cepa *E. coli* 30 foi inoculada em 30 mL de meio LB, enquanto *E. cloacae* ATCC 13047 foi inoculada em 10 mL. As culturas foram incubadas a 37°C *overnight*. No dia seguinte, foi aferida a leitura DO_{600nm} dos pré-inóculos, que foram então adicionados a 300 mL de caldo LB, de modo que a DO final estivesse em 0,1 nos Erlenmeyers.

Uma vez atingida a DO 0,1, 100 µL de cada suspensão viral foi adicionado ao Erlenmeyer contendo LB da sua respectiva bactéria hospedeira. Os Erlenmeyers com a propagação viral foram incubados a 37°C *overnight*, sob agitação de 100 rpm. No dia seguinte, o conteúdo foi transferido para tubos de 50 mL e centrifugados a 8000 g, 4 °C, por 15 min. O sobrenadante foi recuperado e filtrado em membranas de 0,22 µm (Kasvi®).

Para a titulação dos fagos, foram realizadas diluições seriadas em tampão SM (NaCl 5,8 g/L, MgSO₄ 2 g/L, Tris-HCl 6,057 g/L, gelatina 0,1 g/L, pH 7,5) para cada um dos vírus. Em seguida, 100 µL de cada diluição (1:9) foram adicionados a 900 µL das culturas bacterianas *E. coli* 30 e *E. cloacae* ATCC 13047, previamente cultivadas até atingir DO_{600nm} de 0,6. A mistura foi plaqueada utilizando o método da dupla camada em ágar e incubada a 37 °C por 24 h. Após esse período, foram contadas as placas de lise formadas na superfície do ágar, e o título de cada fago foi determinado com base na contagem das unidades formadoras de placas (UFP), segundo a equação 2:

Equação 2. Contagem de unidades formadoras de placas de lise por mililitro (UFP/mL).

$$\frac{\text{número de placas de lise x fator de diluição}}{\text{volume da alíquota plaqueada (mL)}}$$

4.6. Curva de crescimento bacteriano na presença dos fagos e do coquetel

Da mesma forma que a curva de crescimento bacteriano, foram realizadas leituras das curvas de crescimento bacteriano de *S. stutzeri* na presença dos fagos isoladamente e na formulação do coquetel. Em uma microplaca de 96 poços, 200 µL de meio LB caldo foram adicionados aos poços controle. Nos demais poços, 180 µL de LB caldo e 20 µL de suspensão bacteriana na DO₆₀₀ 0.2 foram adicionados. Nos poços de prevenção do crescimento bacteriano, foram adicionados 160 µL de LB caldo, 20 µL de suspensão bacteriana e 20 µL dos fagos nos MOIs (Multiplicidade de Infecção, conforme a equação 3) 10, 1 e 0,1, respectivamente. A placa foi incubada a 30 °C por 48 h no leitor de microplacas Multiskan Go com leituras a cada 15 min em um comprimento de onda de 600nm.

Equação 3: Multiplicidade de Infecção (MOI):

$$MOI = \frac{\text{número de vírus}}{\text{número de células}}$$

4.7. Quantificação da biomassa total do biofilme formado

Microplacas de 96 poços foram montadas da mesma forma que o item anterior a fim de verificar a capacidade dos fagos em prevenir a formação de biofilme bacteriano, por meio da quantificação da biomassa total utilizando o método de coloração com cristal violeta, adaptado de Da Silva Duarte *et al.* (2018). Brevemente, após 48 h de incubação a 30 °C, o meio de cultura das placas foi descartado e os poços foram lavados três vezes com PBS para remover as células não aderidas. Em seguida, as microplacas foram mantidas em estufa a 50 °C por 30 min para a secagem. As células aderidas foram fixadas com metanol por 15 min e, posteriormente, coradas com cristal violeta 0,1% (m/v) durante 20 min. Após esse tempo, os poços foram novamente lavados com PBS e secos em estufa. O corante aderido foi solubilizado com 250 µL de etanol-acetona (80:20, v/v) por 15 min à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 590 nm

(Abs_{590nm}), sendo que maiores valores de absorbância indicam maior formação de biomassa no biofilme.

4.8. Ensaio MBEC

O ensaio em placas MBEC objetiva a determinação do número de UFC/mL. Para isso, as placas foram montadas adicionando-se 200 µL de meio LB caldo aos poços controle do meio de cultura. Nos poços de controle da bactéria, 180 µL de LB caldo e 20 µL de suspensão bacteriana na DO₆₀₀ 0.2 foram adicionados. Nos poços tratamento, foram adicionados 20 µL dos fagos nos MOIs 10, 1 e 0,1, respectivamente, além de 160 µL de LB caldo e 20 µL de suspensão bacteriana. A placa foi incubada a 30 °C por 48 h, e os pinos foram quebrados utilizando alicate estéril. Cada pino foi inserido em um tubo Eppendorf contendo 200 µL de PBS e sonicados por 10 min em banho ultrassom (50 Hz). Posteriormente, os tubos sonicados passaram por diluições seriadas, foram plaqueados pelo método *spread plate* e incubados a 30 °C por 48 h para posterior contagem de UFC/mL.

4.9. Microscopia de fluorescência de células aderidas

A interação entre o coquetel fágico e *S. stutzeri* na capacidade de aderência das células à superfície foi avaliada em uma placa de 24 poços. Brevemente, a bactéria foi cultivada até atingir a DO_{600nm} 0,2. Em seguida, 100 µL da cultura bacteriana e 100 µL do fago nos MOIs 10, 1 e 0,1 foram adicionados em uma placa de cultura de 24 poços contendo uma lamínula de vidro no fundo, completados com 800 µL de meio LB caldo. Os poços-controle receberam apenas 1 mL de meio LB caldo. A placa foi incubada a 30 °C por 48 h, sem agitação. Após esse período, todo o líquido foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS. Sobre cada lamínula, foram adicionados 30 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (100 µg/mL m/v) para corar o DNA celular, e a placa foi incubada no escuro por 10 min. Em seguida, foram adicionados 30 µL de fluoresceína isotiocianato (FITC) (25 µg/mL m/v), que se liga covalentemente a grupos amina de proteínas, permitindo a visualização da estrutura celular. As placas foram novamente incubadas no escuro por mais 10 min. O excesso de corante foi removido com uma lavagem com PBS. As lamínulas foram retiradas com o auxílio de agulha e pinça estéreis e depositadas sobre lâminas de vidro e examinadas em microscópio de fluorescência EVOS M7000 (Thermo Scientific, EUA), utilizando os canais DAPI (357/447 nm) e GFP (470/525 nm).

4.10. Ensaio em tanques piloto

4.10.1. Sistema de tanques piloto

Os tanques piloto utilizados possuem volume útil de 8 L, com o corpo principal feito de material plástico e braços laterais em PVC transparente, permitindo a visualização do volume interno, conforme mostrado na figura 2. A parte superior é fechada por uma tampa com quatro roscas e vedação por anel de borracha, garantindo melhor isolamento e favorecendo a manutenção de condições anaeróbias. Na parte inferior, uma válvula permite a circulação do volume durante os ensaios através de uma bomba peristáltica conectada à tampa dos tanques.

Ao todo, seis tanques (3 controles e 3 tratamentos) foram utilizados. Inicialmente, eles foram lavados com água corrente e imersos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) por 48 h, com o objetivo de remover possíveis resíduos e garantir melhores condições de assepsia. Apesar do volume útil de 8 L dos tanques, durante os experimentos foi utilizado um volume total de 3,5 L para maior facilidade durante a execução dos mesmos.

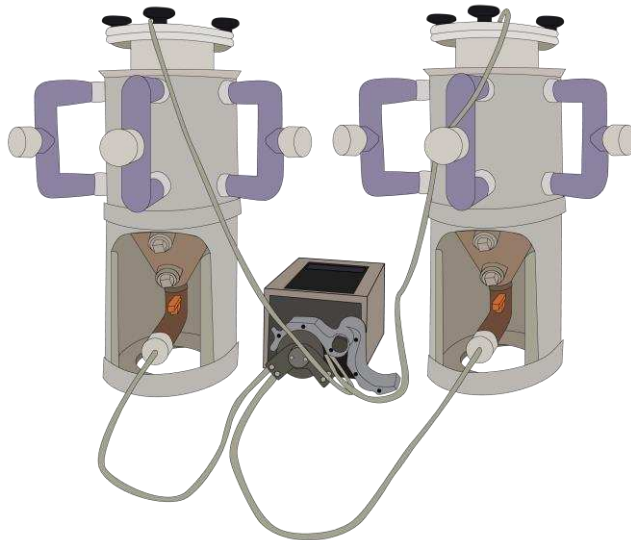


Figura 2. Sistema de tanques piloto. Fonte: a autora.

4.10.2. Corpos de prova

Os cupons de aço carbono AISI 1020 foram preparados por jateamento com areia a fim de eliminar ao máximo a rugosidade. Após essa etapa, os cupons foram submetidos à radiação UV por 30 minutos em cada lado, em cabine de fluxo laminar, com o objetivo de reduzir a carga microbiana superficial antes do ensaio de formação de biofilme. Os cupons previamente limpos foram inseridos com fita dupla face nas

laterais dos tanques, que estavam em contínuo contato com o fluido do sistema. Em cada um dos 6 tanques foram fixados com fita dupla-face 8 cupons de aço carbono, sendo que cada duas unidades foram destinadas para as seguintes análises: contagem de UFC/mL, coloração com cristal violeta, perfilometria óptica e microscopia de varredura (MEV).

4.10.3. Montagem do sistema de tanques piloto

Primeiramente, um total de 20 L de água do mar foram filtrados em membrana de 0,45 µm e armazenada sob refrigeração até sua utilização. Os tanques foram suplementados com 10% do volume (350 mL) de solução nutritiva LB caldo 10X (NaCl 100 g/L, peptona 100 g/L, extrato de levedura 50 g/L). O sistema foi montado em triplicatas, onde três tanques foram controle (sem o coquetel fágico) para avaliar a formação de biofilme por *S. stutzeri* nos cupons, e três foram tratamentos (bactéria + coquetel fágico). Para formular o coquetel fágico, os fagos foram combinados em uma única solução de 365 mL, de modo que em 3,5 L (volume utilizado dos tanques), a concentração final do coquetel chegaria a 10^7 UFP/mL em um MOI 10, com a adição de 35 mL de inóculo de *S. stutzeri* na DO_{600nm} 0,2. Em cada tanque-controle, 2.750 mL de água do mar foi adicionada, juntamente com 350 mL de solução LB caldo 10X e 35 mL de *S. stutzeri* na DO 0,2. Nos tanques-tratamento, foram adicionados 365 mL do coquetel no MOI 10.

4.10.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise do biofilme formado sobre a superfície dos cupons, tanto nos tanques controle quanto nos tanques com tratamento, foi realizada por MEV no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM/UFV), com metodologia adaptada de Wang (2012). Após as 48 h do experimento, os cupons foram retirados e lavados três vezes em tampão PBS 1X para remoção de células não aderidas. Em seguida, foram fixados em solução de paraformaldeído a 3,7% (v/v) por 12 h, em temperatura ambiente. No dia seguinte, os cupons foram novamente lavados com PBS 1X e passaram pelo processo de desidratação em séries crescentes de etanol (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90% e 100%), por 10 min em cada concentração. A etapa com etanol 100% foi repetida três vezes para garantir a remoção total de água. Após a desidratação, os cupons foram secos em ponto crítico (CPD Bal-tec® 030), fixados em *stubs* com fita

dupla face e metalizados com ouro (Quorum® Q150R S). As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura Leo 1430 VP.

4.10.5. Perfilometria Óptica

Para avaliação do biofilme formado na superfície dos cupons, foi realizada a análise de perfilometria óptica no Perfilômetro óptico 3D Contour-GT K, Buker® (Laboratórios em Nanoscopia – Departamento de Física, UFV). Após três lavagens em série em tampão PBS 1X, os cupons foram fixados em paraformaldeído 3,7% por 12 h. No dia seguinte, os cupons foram novamente lavados com PBS 1X e passaram pelo processo de desidratação em séries crescentes de etanol (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90% e 100%), por 10 min em cada concentração. A etapa com etanol 100% foi repetida três vezes para garantir a remoção total de água. Posteriormente, os cupons foram secos em estufa e mantidos no dessecador até a data de análise.

4.10.6. Estimativa de células aderidas

Quatro cupons de cada um dos 6 tanques foram removidos após as 48 h e lavados três vezes com PBS 1X, e armazenados em tubos falcon com 2 mL de PBS para a contagem de estimativa de células aderidas (UFC/mL). Em seguida, os cupons foram sonicados em banho ultrassom por 30 min (50 Hz) a fim de desprender as células aderidas. Por fim, 100 µL da solução sonicada de cada tubo contendo os cupons foi diluída serialmente em 900 µL de PBS e plaqueada pelo método *spread plate*, em duplicatas. Uma alíquota de 2 mL sem diluir foi plaqueada como controle.

4.11. Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como médias e desvio padrão, calculados usando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla CA USA). Para verificar a normalidade da distribuição dos dados, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$), utilizou-se o teste t de Student (*unpaired t-test*) para comparações entre dois grupos. Nos casos em que os dados não seguiram distribuição normal ($p < 0,05$), foram adotados testes não paramétricos. Para comparações entre dois grupos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. *P value* foi considerado significativo quando $< 0,05$ e representado por asterisco.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação e análise filogenética através do gene *16S rRNA*

Após a extração de DNA, o gel de agarose revelou bandas específicas para os três isolados. Ao quantificar no NanoDrop, as concentrações de DNA foram 1.209,5 e 1.072,3, respectivamente, para *G. amicalis* UFV4, *P. balearica*.

P. balearica UFV3 (código de acesso KX495190.2) foi reavaliado por meio de sequenciamento do gene *16S rRNA*. A análise filogenética obtida a partir dessa sequência revelou que *P. balearica* UFV3 se agrupou com *P. stutzeri* ATCC 17588 com alto suporte, como demonstra o *bootstrap* de 100% (Figura 3), indicando então que sua identidade filogenética é mais próxima de *P. stutzeri* do que de *P. balearica*, como na antiga classificação taxonômica.

O agrupamento com outras espécies do gênero, como *P. abietaniphila*, *P. aeruginosa* e *P. balearica*, reforça a classificação filogenética dentro do grupo das *Pseudomonas*. A presença de *Streptococcus agalactiae* como grupo externo (*outgroup*) serviu para enraizar a árvore e evidenciar a distância filogenética entre os gêneros analisados, validando a estrutura da árvore gerada pelo método *Neighbor-Joining* com 1000 repetições de *bootstrap*.

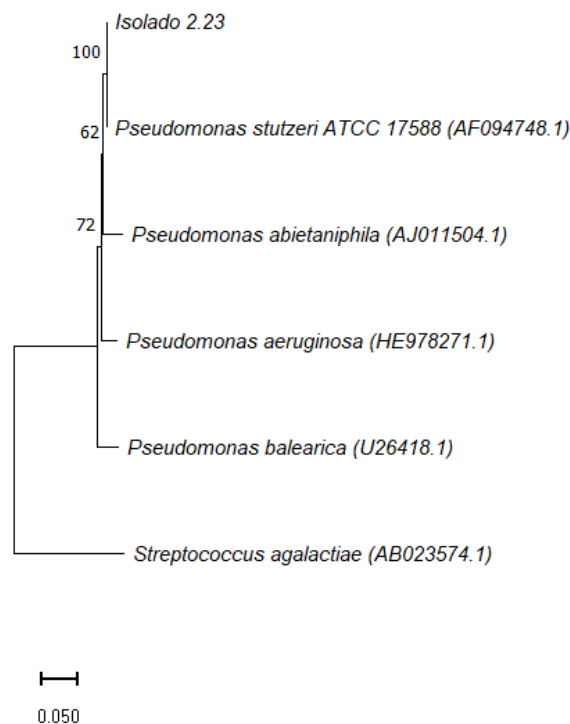


Figura 3: Árvore filogenética construída com base na sequência parcial do gene *16S rRNA* do isolado bacteriano 2.23 e de sequências de referência disponíveis no GenBank. A análise foi realizada pelo método *Neighbor-Joining*, com suporte estatístico avaliado por 1.000

repetições de *bootstrap*, cujos valores estão indicados nos ramos. Os números de acesso das sequências utilizadas estão apresentados entre parênteses.

5.2. Curva de crescimento bacteriano

S. stutzeri apresentou a fase exponencial/logarítmica no tempo de 8 a 24 h, variando a $DO_{600\text{nm}}$ entre 0.1 até 0.3 nm (Figura 4). O valor de $DO_{600\text{nm}}$ na fase logarítmica foi então adotado como referência para preparar os estoques bacterianos de todas as demais análises.

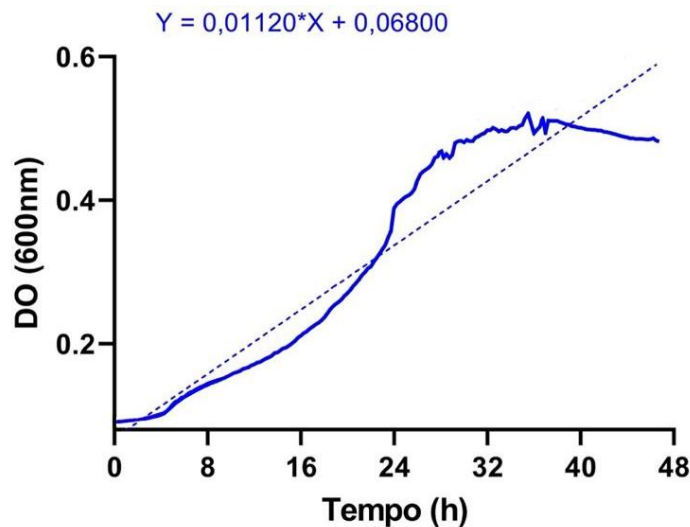


Figura 4. Curva de crescimento de *S. stutzeri* obtida por leitura de densidade óptica ($DO_{600\text{nm}}$) ao longo de aproximadamente 48 h.

5.3. Montagem do coquetel fágico

Os títulos obtidos após a propagação viral encontram-se na tabela 3. Para obter uma concentração final no coquetel de 10^7 UFP/mL, um cálculo de $C_i V_i = C_f V_f$ foi utilizado, seguindo os títulos virais obtidos. Para corresponder aos 10% de coquetel utilizados em cada tanque de 3,5 L, o volume final a ser utilizado de cada fago também se encontra na tabela.

Tabela 3. Fagos, títulos virais obtidos e respectivo volume final no coquetel de 350 mL.

Fago	Título viral (UFP/mL)	Volume final no coquetel (mL)
<i>EcoM-UFV09</i>	$7,9 \times 10^8$	44,3
<i>EcoM-UFV13</i>	$1,2 \times 10^8$	291,66
<i>EcoM1</i>	$2,2 \times 10^9$	15,9
<i>EclM-UFV01</i>	$2,5 \times 10^9$	14,0

5.4. Curva de crescimento bacteriano na presença dos fagos

Para *S. stutzeri*, todos os fagos provocaram aumento do crescimento bacteriano (Figura 5).

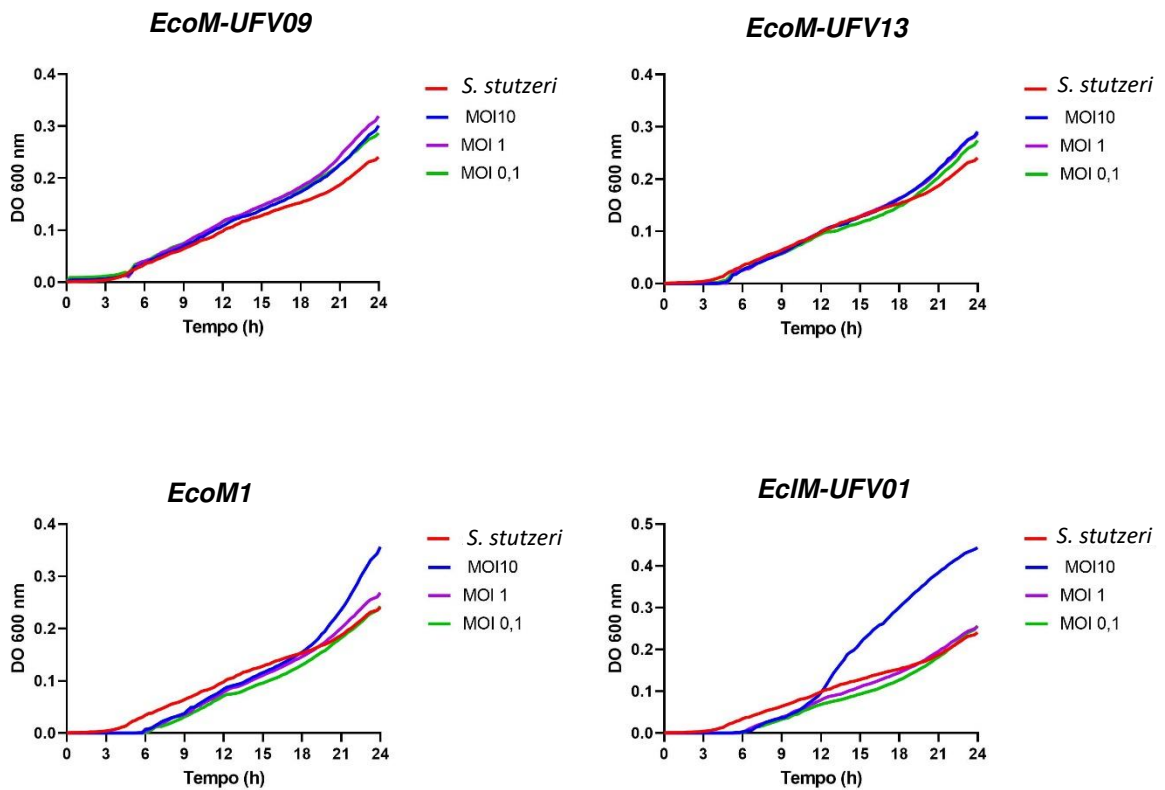


Figura 5. Curvas de crescimento de *S. stutzeri* quando cultivada na presença dos fagos *EcoM-UFV09*, *EcoM-UFV13*, *EcoM1* e *EcIM-UFV01*, respectivamente, nos MOIs 10, 1 e 0,1.

5.5. Curva de crescimento bacteriano na presença do coquetel fágico

A curva de crescimento bacteriano com o coquetel fágico nos MOIs 10, 1 e 0,1 não apresentou redução do crescimento (Figura 5) em nenhum MOI. Contudo, como os resultados da prevenção de biofilme foram significativos (Figura 6), optou-se por continuar as análises, a fim de entender melhor a dinâmica deste isolado com o coquetel viral.

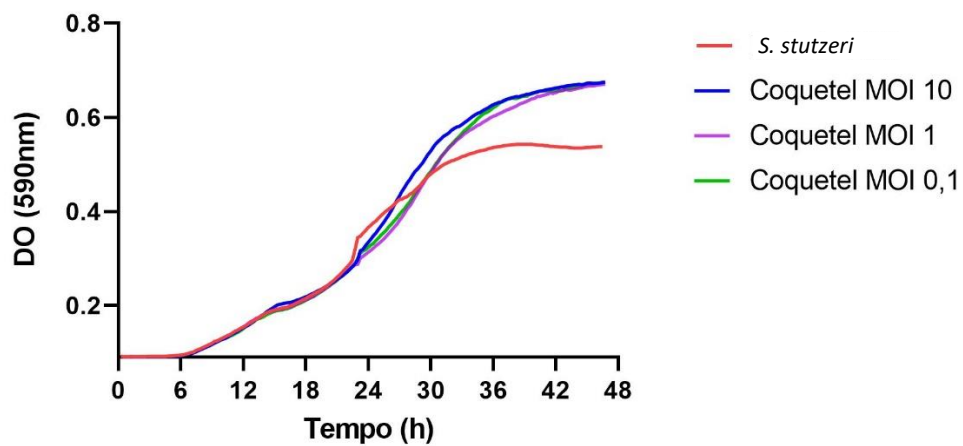


Figura 6. Curva de crescimento de *S. stutzeri* na presença do coquetel fágico por 48 h.

5.6. Quantificação da biomassa total do biofilme por coloração com cristal violeta

Quando avaliada a capacidade de prevenção da formação de biofilme de *S. stutzeri* na presença dos fagos isolados (Figura 7), observou-se que *S. stutzeri* apresentou redução significativa do biofilme, sobretudo na presença dos fagos *EcoM-UFV13*, *EcoM1* e *EcIM-UFV01*, com significância estatística marcante no MOI 10, atingindo valores de $p < 0,0001$ (Figura 7).

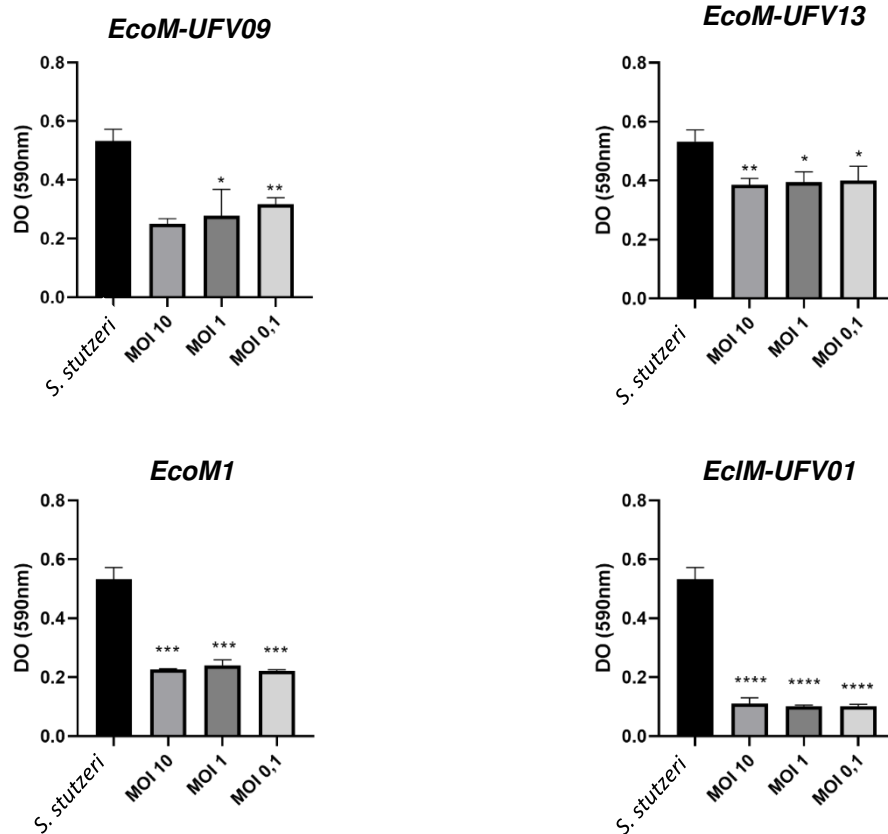


Figura 7. Quantificação da biomassa total do biofilme por coloração com cristal violeta de *S. stutzeri* quando cultivada com os fagos isolados (e não em coquetel). Diferenças estatisticamente significativas foram representadas por asteriscos: ($p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****)).

5.7. Prevenção de biofilme com o coquetel em diferentes MOIs

A partir da redução da formação de biofilme observada com os fagos separadamente (Figura 7), foi avaliada a capacidade de prevenção da formação de biofilme na presença do coquetel. De maneira diferente dos fagos isolados, que apresentaram redução (especialmente os fagos *EcoM1* e *EcIM-UFV01*, com $p < 0,0001$), quando combinados num coquetel, a redução não foi tão expressiva quanto anteriormente (Figura 8).

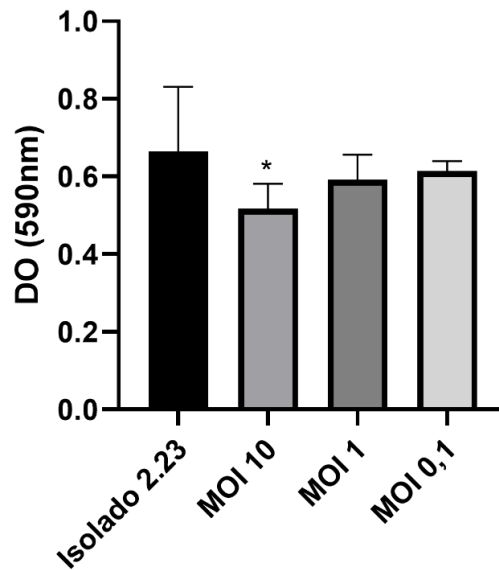


Figura 8. Quantificação da biomassa total por coloração com cristal violeta do isolado 2.23 com o coquetel fágico nos MOIs 10, 1 e 0,1. $P < 0,01$ no MOI 10.

5.8. Ensaio MBEC

No ensaio MBEC, a quantidade de células viáveis de *S. stutzeri* aderidas aos pinos da placa foi maior na presença do coquetel fágico (Figura 9). Além disso, no plaqueamento foi possível observar uma alteração na morfologia das colônias do grupo tratado com o coquetel (Figura 9B), que aparentavam ser mais opacas e difusas do que as colônias de bactéria sem tratamento com o coquetel (Figura 9A). Essa alteração morfológica pode indicar uma interação do fago para com a bactéria. Apesar da alta variabilidade entre as amostras, houve significância estatística entre o controle e o tratamento, conforme o teste de Mann-Whitney ($p < 0,0001$) (Figura 9).

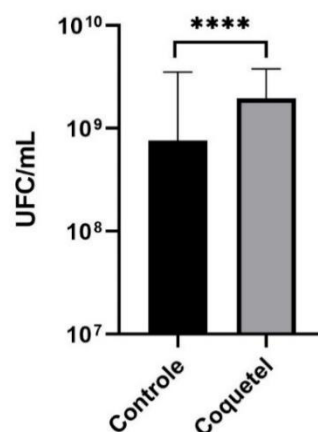


Figura 9: Contagem de células viáveis de *S. stutzeri* aderidas aos pinos no ensaio MBEC. $P \leq 0,0001$ (****).

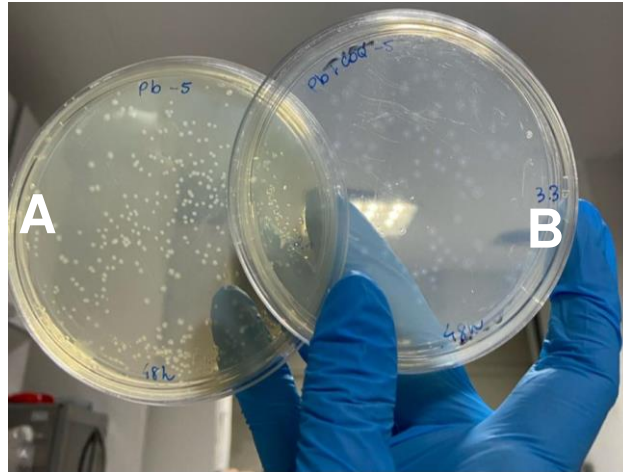


Figura 10: Plaqueamento da solução sonicada dos pinos MBEC. A) controle da bactéria na diluição 10^{-5} . B) *S. stutzeri* + coquetel MOI 10 na mesma diluição. Diferença fenotípica nas colônias, que em B se apresentaram mais opacas e difusas.

5.9. Ensaio em tanques piloto

5.9.1. Estimativa de células aderidas nos cupons

Os cupons retirados dos 3 tanques foram diluídos e plaqueados em duplicatas, até a diluição 10^{-6} . Essas diluições foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos nos resultados da placa MBEC. Contudo, após as 48 h de incubação, não houveram colônias em nenhuma das diluições selecionadas, apenas nas placas controle, onde $100 \mu\text{L}$ da suspensão sonicada dos cupons foi plaqueada com $900 \mu\text{L}$ de PBS. Como as placas sem diluição não foram feitas em duplicatas, pois eram apenas controles, não foi possível aplicar a estatística. De maneira geral, o tanque 1 apresentou redução na contagem de células viáveis, mas o mesmo não se aplica aos tanques 2 ou 3, mesmo tendo sido montados sob as mesmas condições experimentais (Figura 11).

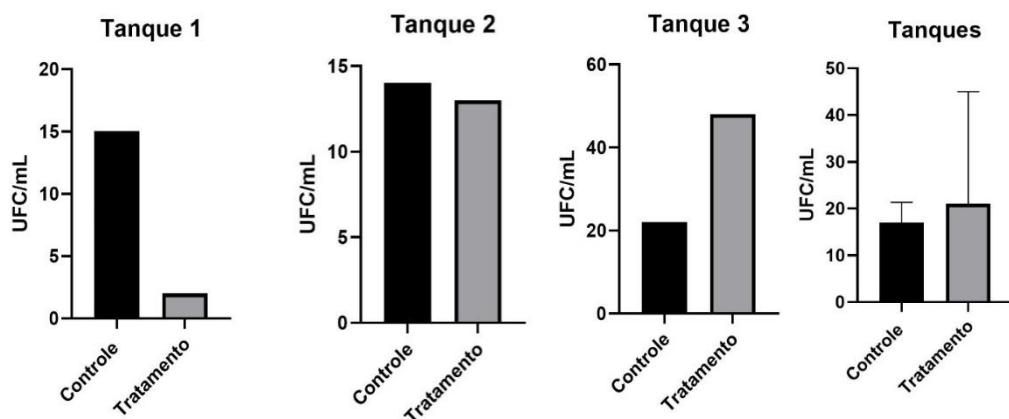


Figura 11: Estimativa de células aderidas nos cupons através da contagem de UFC/mL. Não foi possível analisar a estatística.

5.9.2. Microscopia eletrônica de varredura

Com relação a análise MEV (Figura 12) foi possível observar que, tanto os cupons do grupo controle (Figura 12A), quanto os do grupo tratamento com o coquetel fágico apresentaram fissuras nas superfícies (Figura 12D), provavelmente devido à desidratação em série crescente de etanol durante a preparação do material.

Os cupons dos tanques controle (Figuras 12B e 12C) apresentaram grandes aglomerados de células, com a presença de estruturas filamentosas (setas amarelas) indicando um biofilme maduro formado (setas vermelhas), e indícios da presença de substância extracelular polimérica (EPS). Nos cupons tratados com o coquetel fágico, aparentemente, a superfície interna (em contato com o líquido) apresentou maior número de células aderidas, em comparação com a superfície externa, que apresentou maior número de aglomerados de biofilme (Figuras 12E e 12F). Ao explorar em maior aumento as células aderidas nas superfícies, foram observadas células com morfologia de bacilos e a presença de um flagelo monotríquio polar (Figuras 12G e 12H).

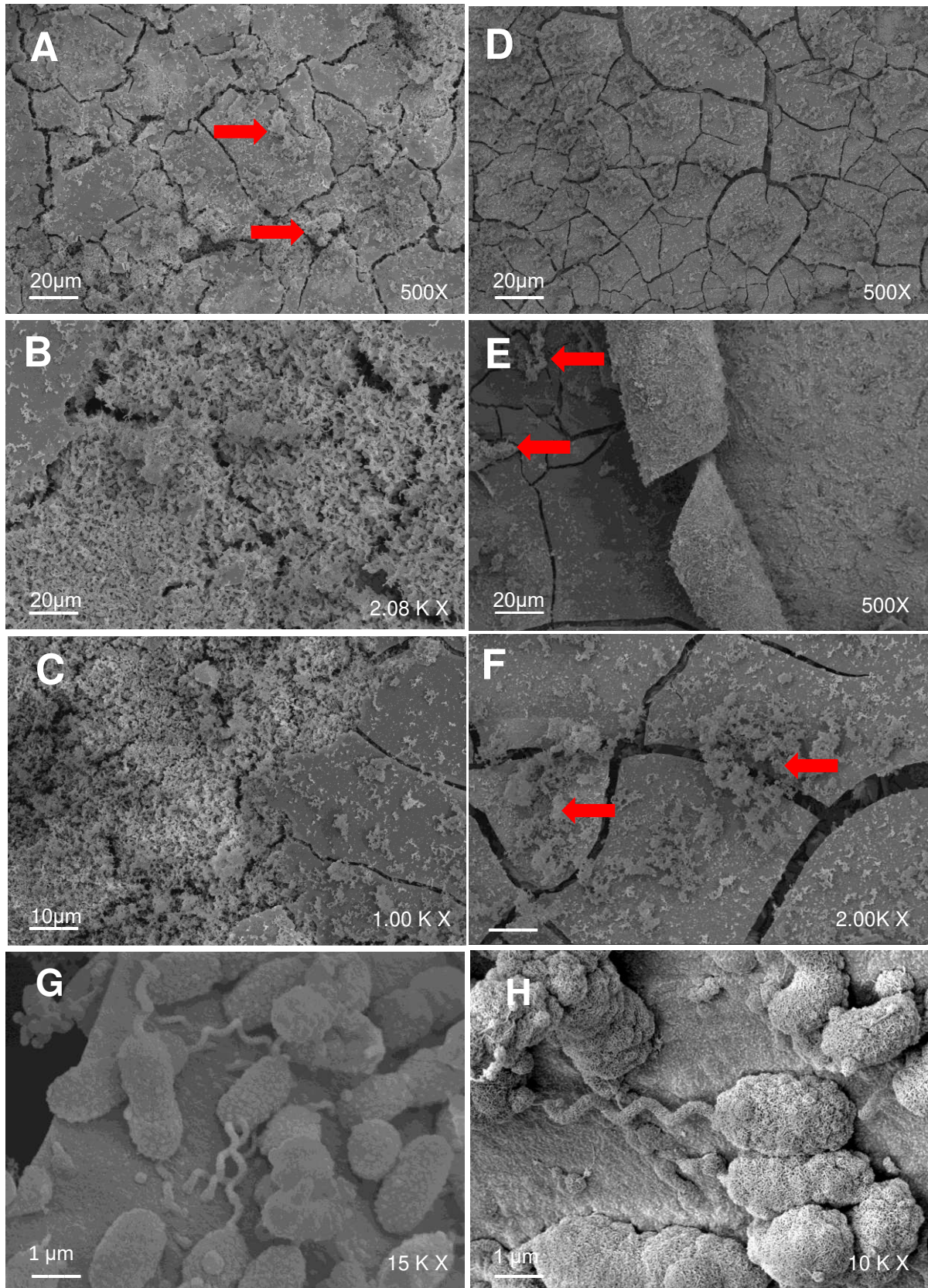


Figura 12. Micrografias de MEV mostrando a superfície dos cupons de aço carbono dos tanques após 48h de incubação com *S. stutzeri*. (A–C) Grupo controle, com densa formação de biofilme e matriz extracelular visível, setas vermelhas indicam biofilme maduro. (D–F)

Grupo tratado com coquetel fágico, com biofilme concentrado em algumas regiões dos cupons. (G e H) Morfologia bacilar de *S. stutzeri* dos grupos tratados. Figura H obtida por FEG Jeol® JSM-iT700 HRLA.

5.9.3. Perfilometria óptica

A perfilometria óptica permite inferir a rugosidade de uma superfície à medida em que feixes de luz varrem a superfície e medem os picos de altura da mesma. Desta forma, os resultados são plotados graficamente em um *heat map* (Figura 13), onde picos mais altos são identificados pelas cores mais quentes (amarelo, laranja e vermelho), e regiões mais baixas da superfície são identificadas em tons claros (azul e verde). Pontos pretos podem ocorrer eventualmente, e indicam locais onde o equipamento não conseguiu processar a imagem (por isso o *Percent Data Points* nunca é 100%). Os resultados de rugosidade obtidos encontram-se na tabela 4. Além do *heat map*, o software permite avaliar os perfis dos eixos X e Y, representando a profundidade vertical e horizontal dos picos e vales (Figura 14).

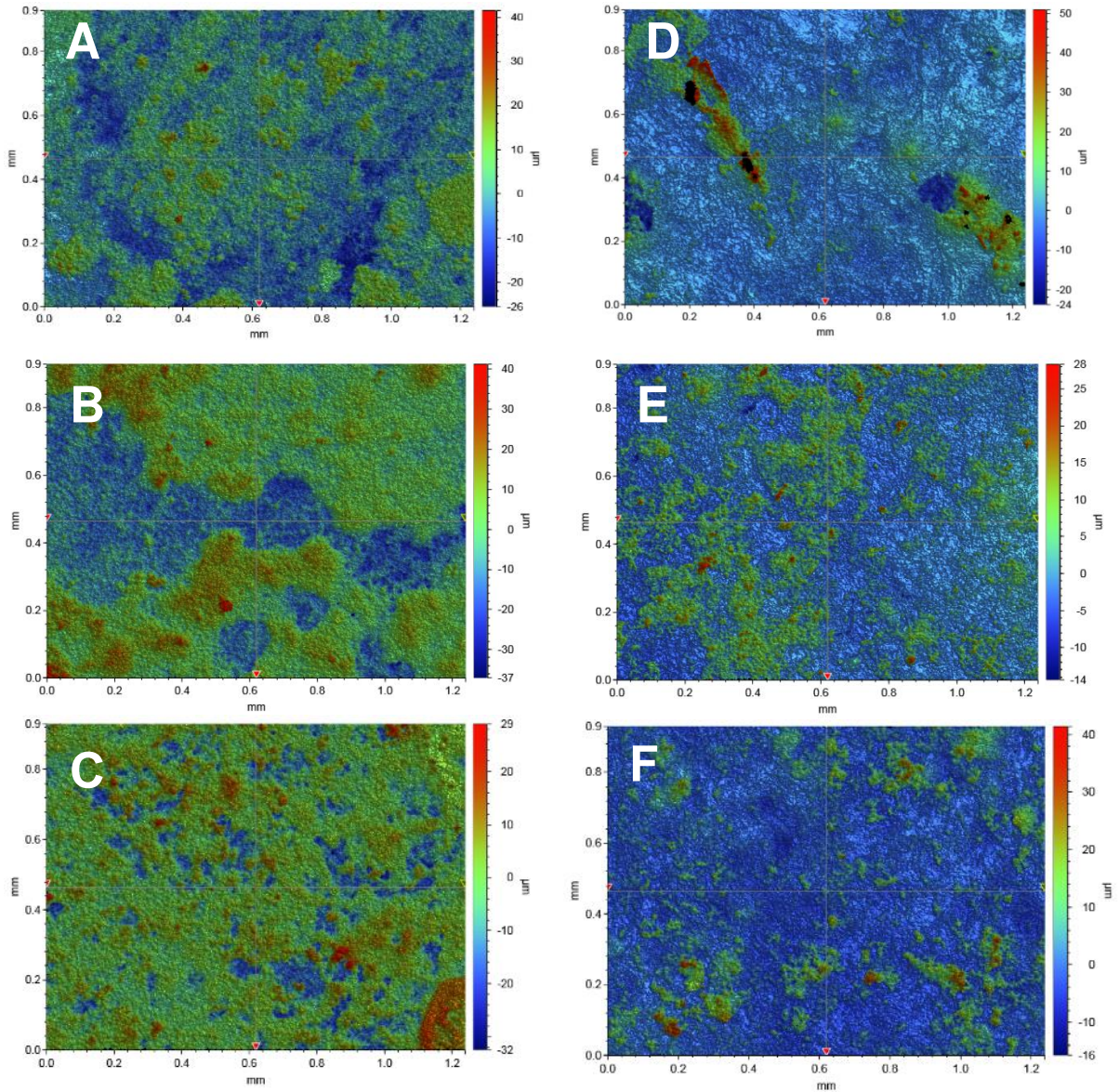


Figura 13: Perfilometria óptica da superfície dos cupons expostos durante 48h na ausência (A, B, C) e na presença do coquetel fágico (D, E, F). A-C: Cupons dos tanques-controle, com maior deposição de biofilme. D-F: Cupons dos tranques tratados com coquetel fágico, apresentando menor deposição de biofilme.

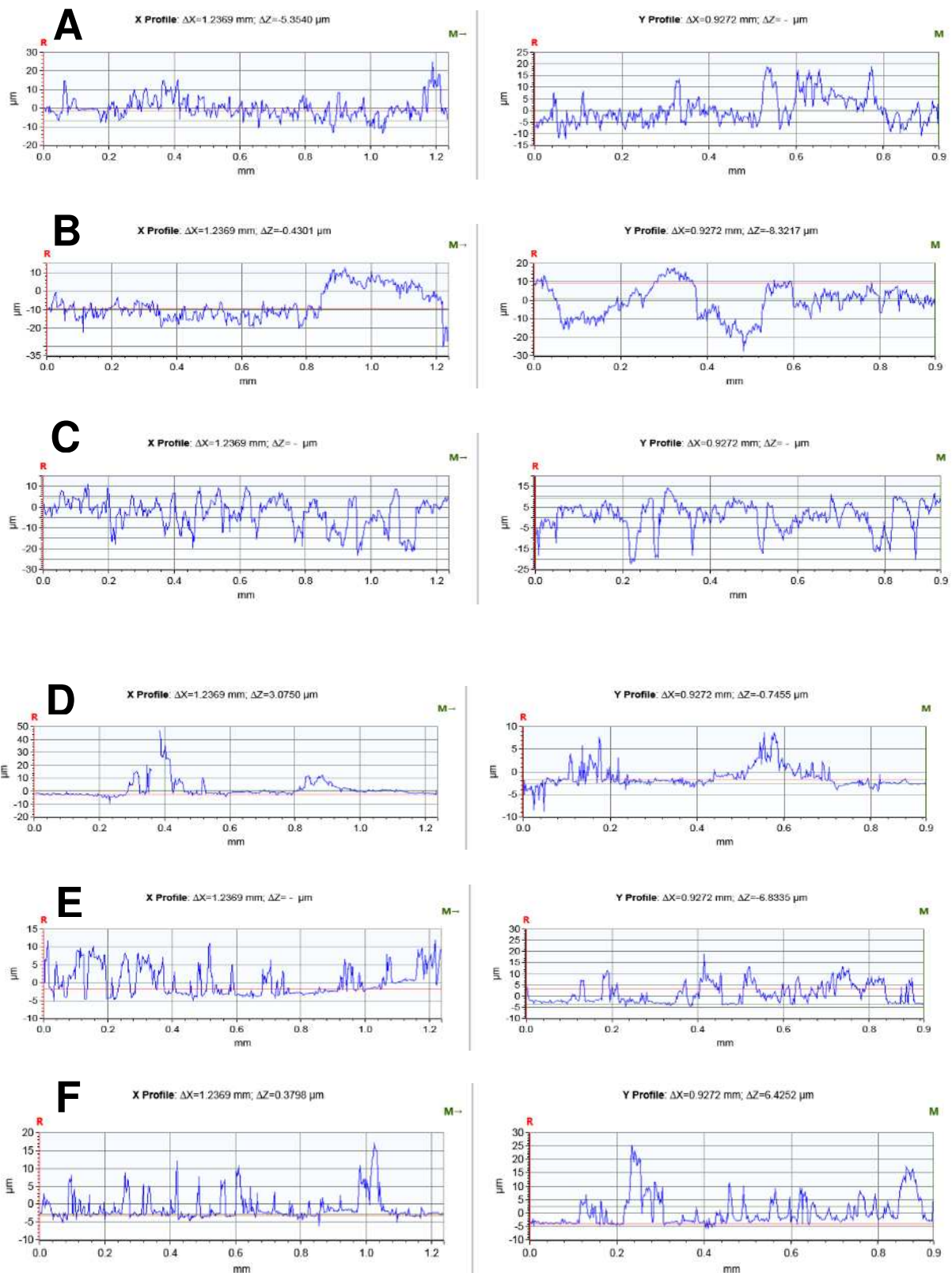


Figura 14: Perfis dos eixos X e Y de cada amostra dos cupons. Eixo X representa um corte horizontal na superfície analisada, enquanto o eixo Y representa um corte vertical. A-C representam os perfis dos grupos controle, somente com a bactéria, D-F representam os perfis dos tratamentos com coquetel fágico.

Tabela 4: Índices de rugosidade da superfície (μm) dos cupons após 48h na ausência e presença do coquetel fágico.

Rugosidade da superfície (μm)	Tanques Controle			Controle (média \pm DP)	Tanques Tratamento			Trat. (média \pm DP)
	A	B	C		D	E	F	
Rugosidade média (Ra)	5,29	8,06	5,5	6,28 \pm 1,54	3,74	3,4	3,92	3,69 \pm 0,26
Altura máxima do pico (Rp)	41,47	41,23	28,91	37,20 \pm 7,18	50,92	28,31	41,41	40,21 \pm 11,35
Raiz quadrada média (Rq)	6,87	9,81	7,32	8,00 \pm 1,58	6,79	4,45	5,75	5,66 \pm 1,17
Total (pico + vale) (Rt)	67,04	78,32	61,39	68,92 \pm 8,62	74,78	42,69	57,2	58,22 \pm 16,07
Profundidade média do vale (Rv)	-25,56	-37,09	-32,48	-31,71 \pm 5,80	-23,86	-14,38	-15,79	-18,01 \pm 5,12

A análise por perfilometria óptica evidenciou diferenças claras entre as superfícies dos cupons controle e daqueles tratados com o coquetel fágico. De modo geral, as amostras tratadas apresentaram uma superfície mais uniforme, com menor rugosidade média, o que sugere a redução do biofilme aderido após a ação dos fagos. A diminuição dos valores de Ra e Rq indica que o tratamento foi capaz de suavizar as irregularidades da superfície, reduzindo a presença de picos e vales acentuados. Esse resultado é compatível com a capacidade dos fagos de degradar a matriz extracelular e interferir na estrutura do biofilme, favorecendo uma topografia mais homogênea.

Além disso, a redução observada nos parâmetros Rt e Rv reforça essa tendência, sugerindo que as superfícies tratadas apresentam perfis menos profundos e mais regulares. Esses achados indicam que o coquetel fágico, mesmo sendo composto por fagos inespecíficos, foi capaz de alterar a morfologia superficial associada ao biofilme, provavelmente pela ação de enzimas extracelulares, como as depolimerases.

De forma geral, os resultados da rugosidade apontam para a eficácia do coquetel em reduzir o acúmulo de biomassa e em promover superfícies mais lisas e menos heterogêneas, um indicativo do potencial dos fagos como estratégia de controle de biofilmes em ambientes industriais.

De maneira geral, os controles apresentaram perfis bastante irregulares, com picos e vales bem definidos. Isso indica maior presença de biofilme ou formação biológica mais espessa.

Quanto aos tanques tratados com o coquetel fágico, observou-se que o perfil superficial variou entre os cupons, mas com tendência geral de redução na rugosidade quando comparados aos controles. O tratamento D apresentou picos estreitos e altos, o que justifica o valor mais elevado de R_t , possivelmente relacionado à presença residual de estruturas do biofilme. Já o tratamento E mostrou um perfil mais plano e regular, com menor variação vertical, indicando uma superfície mais homogênea e menos aderida. O tratamento F, embora ainda apresentasse picos visíveis, apresentou menor amplitude entre picos e vales em relação aos controles, sugerindo redução do relevo superficial e, conseqüentemente, menor acúmulo de biomassa.

5.9.4. Microscopia de fluorescência

As lamínulas controle (contendo somente bactéria) quando visualizadas no microscópio de fluorescência apresentaram alta densidade celular, evidenciado pela forte intensidade do corante FitC (cor verde) que cora porções aminoterminais dos biofilmes (Figura 14A) e do corante DAPI (cor azul) que cora ácidos nucleicos (Figura 14B). O canal TRANS, obtido em luz transmitida, permitiu observar a morfologia geral e a distribuição das células sobre a superfície, servindo como referência para a sobreposição das imagens fluorescentes (Figura 14C, 14D). Dentre os MOIs testados, o tratamento com o coquetel no MOI 10 mostrou células distribuídas mais espaçadamente (Figura 14D, 14E), enquanto o MOI 1 apresentou pouca diferença para o controle (Figura 14F).

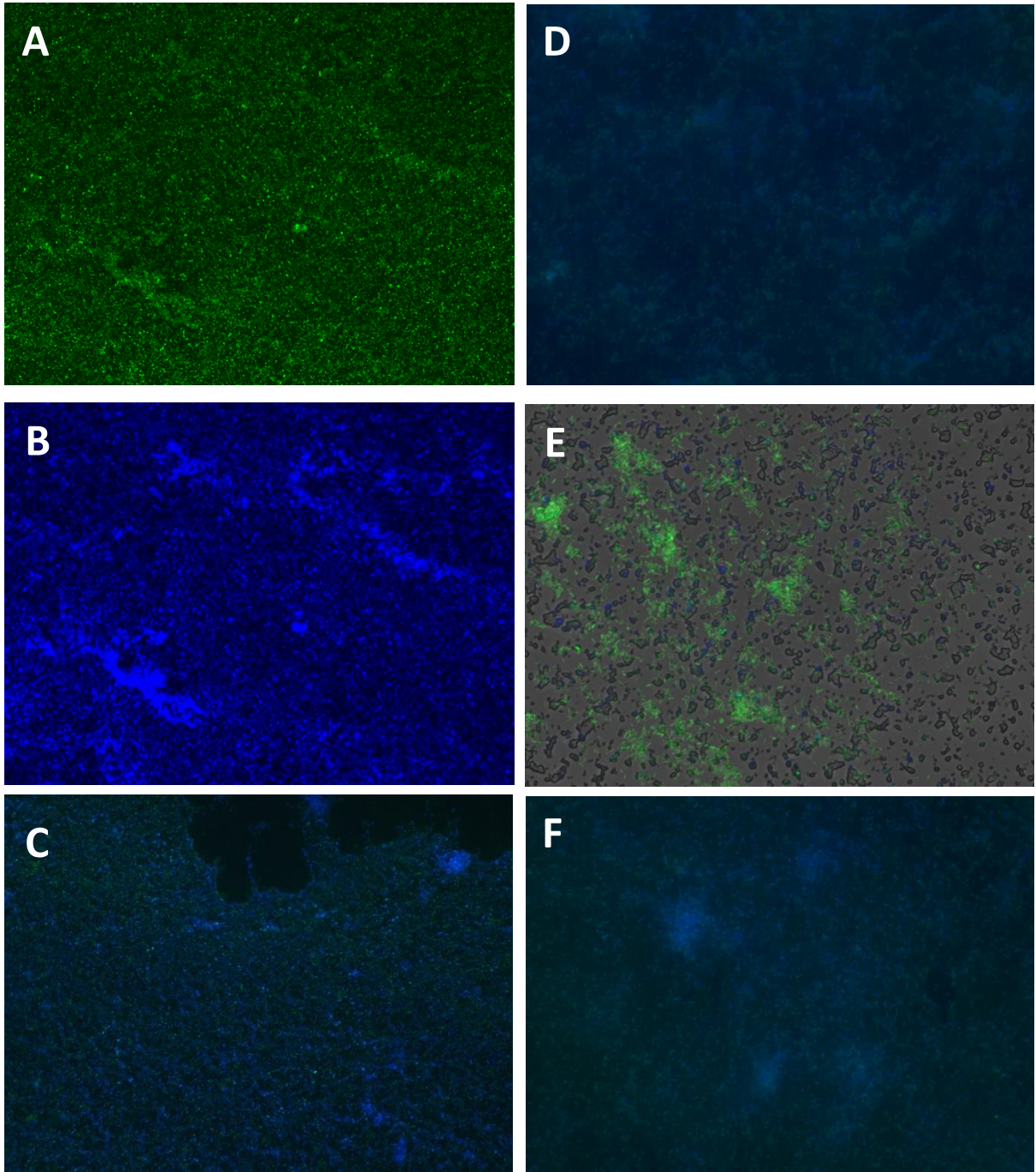


Figura 14. Microscopia de fluorescência do biofilme formado em lamínulas após 48 h. A) Controle de bactéria no canal GFP. B) Controle de bactéria no canal DAPI. C) Controle de bactéria no canal TRANS. D) Tratamento com o coquetel no MOI 10, canal DAPI. E) Tratamento com o coquetel no MOI 10, canal TRANS. F) Tratamento com o coquetel no MOI 1, canal DAPI. Aumento de 600X.

6. DISCUSSÃO

Inicialmente, o isolado 2.23 foi identificado como *Pseudomonas balearica* com base em análises de sequenciamento *16S rRNA* (Silva *et al.*, 2019; Medina *et al.*, 2024). No entanto, ao realizarmos uma nova comparação com bancos de dados mais recentes e atualizados, observou-se maior similaridade com *Stutzerimonas stutzeri*, resultando na reclassificação do isolado. Essa mudança taxonômica é compatível com a revisão recente do gênero *Pseudomonas*, que passou a abranger novas subdivisões filogenéticas, como *Stutzerimonas* (Lalucat *et al.*, 2022).

A visualização de flagelos associadas à superfície celular do isolado 2.23, que foi agrupado filogeneticamente com *Stutzerimonas stutzeri* está de acordo com a morfologia característica da espécie, conhecida por apresentar flagelo polar (Lalucat, 2006). Cozar (1987) relatou que 70% das células da cepa AN11 eram flageladas, das quais 38% tinham apenas um flagelo, e 31% tinham um ou mais flagelos laterais. Além disso, a presença de flagelos reforça o potencial do isolado em participar da formação de biofilme, uma vez que essas estruturas estão diretamente envolvidas na fase inicial de colonização da superfície.

Os flagelos bacterianos, além de conferirem motilidade, desempenham papel essencial na adesão primária e na regulação do processo de formação de biofilme, participando ativamente da fase inicial de colonização da superfície. Segundo Bouteiller *et al.* (2021), essas estruturas são moduladas por estímulos externos, como o contato com superfícies sólidas ou sinais ambientais, e estão diretamente envolvidas na transição das células do estado planctônico (livres no meio) para o estado aderido.

Além das estruturas de motilidade, a microscopia de varredura revelou a presença de uma matriz densa e irregular em volta das células aderidas, o que pode ser o indício da formação de EPS.

A curva de crescimento bacteriano ao longo de 48 h foi realizada para acompanhar o desenvolvimento de *S. stutzeri* na ausência dos fagos, a fim de entender em que momento iniciava sua fase de crescimento logarítmica – o que foi padronizado para todos os demais ensaios. A fase log foi observada aproximadamente na DO 0,2, o que está em conformidade com a fase logarítmica observada por Qiu e colaboradores (2023). Essa análise foi fundamental para entender o momento em que a bactéria estaria metabolicamente ativa, para então compreender o efeito dos fagos.

Quando a curva de crescimento foi realizada com os fagos individualmente (e não na forma de coquetel), observou-se um aumento no crescimento celular em todos os MOIs. Isso pode acontecer porque as enzimas extracelulares, ao hidrolisarem o biofilme, iniciam o desprendimento de células sésseis e as convertem para um estado planctônico (Amankwah *et al.*, 2022), o que é detectado na curva de crescimento.

Os resultados apresentados nos gráficos de prevenção de biofilme indicam que os fagos foram capazes de interferir na adesão e no desenvolvimento inicial do biofilme, sugerindo que eles conseguem atingir as células bacterianas presentes. Individualmente, os fagos foram capazes de reduzir a formação de biofilme do isolado 2.23, mas não do isolado 2.26, que não apresentou resposta satisfatória ao tratamento e, portanto, não foi incluído nas etapas seguintes. Ainda sobre o efeito dos fagos sobre o isolado 2.23, a curva de crescimento da bactéria com o coquetel seguiu o mesmo padrão da curva com os fagos isolados, onde não houve redução do crescimento na presença do coquetel. Os fagos isoladamente foram capazes de prevenir a formação de biofilme do isolado 2.23 e, posteriormente, quando combinados em um coquetel, também foram capazes de prevenir a formação no MOI 10. Contudo, mesmo os 4 fagos isolados ou combinados em um coquetel não afetaram a curva de crescimento bacteriano. Novamente, um resultado que pode advir da ação das enzimas extracelulares, que desprendem as células sésseis do interior do biofilme e as convertem para um estado planctônico, que é então detectado nas curvas.

O MOI 10 foi então padronizado para todos os demais experimentos. Acerca da multiplicidade de infecção, Alvi e colaboradores (2020) também demonstraram a capacidade de um fago isolado de *P. aeruginosa* de controlar o crescimento bacteriano por até 20 h, quando aplicado em um MOI de 10. De maneira semelhante, Scarascia e colaboradores (2018) demonstraram que fagos de *Pseudomonas* em condições salinas exibiram infectividade ótima no MOI 10 para diferentes bactérias do grupo *Alphaproteobacteria*, *Pseudoalteromonas* e *Planococcaceae*, que são encontradas em ambientes marítimos.

O resultado das placas MBEC vai de encontro às curvas de crescimento bacteriano e os testes de prevenção de formação de biofilme por cristal violeta. O MBEC envolve a sonicação dos pinos, onde encontram-se as células aderidas. Possivelmente, o coquetel sensibilizou o biofilme, liberando as células viáveis, que foram então quantificadas no plaqueamento. Mesmo que a contagem de células viáveis tenha sido maior, é possível observar uma diferença morfológica entre as

células bacterianas sem o coquetel para aquelas com o coquetel – nessas, as colônias apresentam-se mais difusas e opacas, indicando que o coquetel afetou o fenótipo da bactéria.

Análises proteômicas e comparações de perfis de expressão gênica tanto do estado planctônico, quanto do biofilme em diferentes espécies contribuem para o entendimento dessas adaptações fenotípicas. Por exemplo, alguns estudos mostraram que logo após uma célula atingir uma superfície, genes que codificam proteínas flagelares são reprimidos e outros genes que codificam EPS e proteínas de adesina são induzidos (Sauer e Camper, 2001; Davies, Chakrabarty, Geesey, 1993; Vidal *et al.*, 1998; Prigent-Combaret *et al.*, 2001).

Provavelmente, a diferença nos resultados de coloração com cristal violeta para o ensaio de MBEC se deve às especificidades de cada técnica. O cristal violeta quantifica a biomassa total aderida, sem distinguir a viabilidade das células. Com os fagos isolados, provavelmente eles reduziram a adesão das células, o que diminuiu a biomassa detectada pelo CV, e conseqüentemente levou aos dados de redução do biofilme.

A quantificação de células aderidas recuperadas dos cupons após sonicação indicou uma variação significativa entre os tanques analisados. De modo geral, o objetivo era verificar se o coquetel fágico aplicado teria algum efeito na redução da carga bacteriana aderida às superfícies, possivelmente associada à atuação de enzimas extracelulares presentes nos fagos. No ensaio MBEC, observamos contagem de células nas diluições 10^{-5} . Dessa forma, para a contagem de células aderidas aos cupons dos tanques, as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueadas, além de uma placa sem diluição, onde esperava-se observar o tapete bacteriano. Após 48 h de incubação das placas, entretanto, foram observadas colônias apenas nas placas sem diluição, tanto dos cupons controles, quanto dos tratamentos.

É importante destacar que, diferente do ensaio de MBEC, os tanques piloto foram operados com água do mar natural, o que pode influenciar a viabilidade tanto dos fagos quanto das enzimas extracelulares associadas, como as depolimerases. A salinidade do meio pode interferir na estabilidade das partículas fágicas e na atividade dessas enzimas, o que ajuda a explicar possíveis variações na eficiência de controle observadas entre os dois experimentos.

Em algumas regiões dos cupons, foi possível visualizar células isoladas e aderidas à superfície, enquanto outras regiões apresentavam biofilmes maduros e

abaixo da superfície, com grande quantidade de células. Em algumas regiões dos cupons, foi possível visualizar células isoladas e aderidas à superfície, enquanto outras apresentavam biofilmes mais densos e maduros. A presença de áreas parcialmente limpas, com menor quantidade de material extracelular, foi observada tanto nos controles quanto nos tratamentos, o que é esperado, uma vez que o biofilme não se forma de maneira uniforme em toda a superfície. Ainda assim, nos cupons tratados, essas regiões parecem mais frequentes e menos espessas visualmente, o que sugere que o coquetel fágico pode ter interferido no processo de maturação do biofilme.

Assim, mesmo que a redução de UFC nos cupons dos tanques não tenha sido estatisticamente significativa, a MEV revela uma diferença importante na organização estrutural do biofilme. Essas diferenças podem indicar que as bactérias estavam em estágios diferentes do desenvolvimento do biofilme, como a adesão inicial, maturação e dispersão, conforme salientado por Sauer *et al.*, 2002.

A depender do estágio em que se encontram, as bactérias podem mudar a produção de proteínas do EPS e a liberação de enzimas (Sauer *et al.*, 2002), isso pode explicar porque nem todas as imagens do grupo controle ou do grupo tratamento mostram o biofilme uniforme. Além disso, a formação do biofilme é dinâmica e multifatorial: cargas da superfície, presença ou não de ranhuras e sua profundidade, fluxo de líquido, presença de agentes atrativos para os microrganismos, dentre outros.

Essas diferenças na produção de proteínas e enzimas ao longo do tempo podem influenciar a reprodutibilidade dos resultados, mesmo que o experimento seja conduzido de forma idêntica (Sauer *et al.*, 2002; Sommer *et al.*, 1998). Uma segunda explicação para os resultados encontrados seria o fato de que algumas bactérias podem estar em estado de repouso – sem atividade metabólica – o que também afeta a formação do biofilme (Torsvik; Sorheim; Goksoyr, 1996).

A análise da perfilometria óptica mostrou que, de maneira geral, os tratamentos com o coquetel fágico reduziram a rugosidade média (R_a) das superfícies em comparação aos controles. Essa diminuição de R_a observada, por exemplo, no tratamento E (R_a mais baixa e $R_t = 42,69 \mu\text{m}$) pode estar associada a menor adesão inicial de células, como relatado por Awad *et al.* (2018). Além disso, os parâmetros R_q e R_v também apresentaram valores menores nos tratamentos, indicando superfícies mais uniformes e possivelmente menos propensas à retenção de microrganismos e detritos.

Nos controles, valores elevados de Rp e Rt foram encontrados, como em A (Rt = 67,04 μm) e B (Rt = 78,32 μm), sugerindo superfícies com picos proeminentes e vales profundos, características que favorecem a formação de biofilmes mais espessos e dificultam sua remoção (Ortega *et al.*, 2010). O controle C apresentou menor Rp (28,91 μm), possivelmente indicando menor deposição de biofilme nesta replicata, embora a variação experimental seja esperada devido à heterogeneidade intrínseca dessas estruturas (Bridier *et al.*, 2011).

Entre os tratamentos, D apresentou o maior valor de Rp (50,92 μm) e Rt elevado (74,78 μm), sugerindo regiões pontuais com resíduos de biofilme. Já E teve perfil mais plano e regular, com baixos valores de Rp e Rt, o que pode indicar remoção ou desestruturação mais eficiente do biofilme. O tratamento F mostrou valores intermediários, com redução da rugosidade, mas ainda apresentando picos visíveis. Padrões semelhantes já foram descritos por Xu *et al.* (2022), que associaram maior concentração de depósitos na superfície à maior adesão celular e, conseqüentemente, à presença de biofilmes mais espessos.

Assim, embora o coquetel fágico tenha promovido redução da rugosidade e uniformização da superfície em boa parte das amostras, a ação não foi homogênea entre as replicatas, possivelmente refletindo tanto a variação estrutural do biofilme quanto diferenças locais na eficácia do tratamento – que pode estar ligado a alguns fatores durante a montagem dos tanques, mesmo com a tentativa de controlar ao máximo a esterilidade do experimento.

Vale ressaltar que o biofilme é uma estrutura heterogênea e de organização estrutural complexa, composta por células e EPS, que se distribuem de forma desigual sobre a superfície colonizada - mesmo sob condições experimentais controladas (Neu *et al.*, 2019). Conforme descrito pelos autores em suas pesquisas, apesar dos biofilmes cultivados sob condições controladas em laboratório apresentarem uma homogeneidade em larga escala, foi observada uma heterogeneidade em pequena escala: por exemplo, a espessura do biofilme em seções de cm de uma tubulação variou em até 4 vezes, o que está em consonância com os resultados obtidos. Isto pode acontecer por variações, como pH, meio de cultivo e força de cisalhamento, que levam ao estabelecimento de microambientes diferentes. Isto, por sua vez, pode resultar em distribuição espacial desigual das colônias, do EPS e dos canais intersticiais dos biofilmes (Neu *et al.*, 2019). Segundo Jang (2017), em sistemas com baixas vazões, esses microambientes podem gerar múltiplas repercussões na

dinâmica do biofilme, abrindo novos nichos ecológicos, promovendo heterogeneidade fenotípica e, ainda, influenciar a suscetibilidade a antimicrobianos.

Quando estão sob estresse, as bactérias possuem vários mecanismos pelos quais podem aumentar a variabilidade genética e fenotípica, como mutação adaptativa, variação de fase e transferência genética (conjugação e transformação) (Webb; Lau; Kjelleberg, 2004). Além disso, o estresse gerado pela presença dos fagos pode estimular processos de modificação genética (Kutsukake e Lino, 1980).

Ainda que o coquetel fágico inespecífico não tenha demonstrado ação bactericida consistente sobre *S. stutzeri*, foram observadas alterações importantes na morfologia das colônias, na rugosidade superficial dos cupons e adesão celular, sugerindo efeitos indiretos relevantes. A originalidade deste estudo consiste na utilização de tanques piloto simulando condições marinhas, associada à aplicação de um coquetel não específico, o que contribui para o avanço do conhecimento sobre as possibilidades (e limites) do uso de fagos em contextos biotecnológicos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa reforçam a importância de explorar estratégias alternativas para o controle de biofilmes em ambientes industriais, além de contribuir com uma perspectiva inovadora sobre a aplicação de fagos em sistemas de maior complexidade, como tanques com água do mar e superfícies metálicas. Foi demonstrado que os fagos podem exercer efeitos que vão além da ação lítica direta sobre as células bacterianas, influenciando também a estrutura dos biofilmes, a rugosidade superficial e a adesão de bactérias presentes no ambiente de extração de petróleo.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para buscar compreender melhor a dinâmica de *S. stutzeri* na presença dos fagos, estudos futuros devem ser realizados. Análises metabolômicas e proteômicas poderão contribuir para o entendimento das respostas fisiológicas da bactéria frente a interação com os fagos e as condições ambientais simuladas. Com isto, espera-se gerar conhecimento acerca do comportamento do isolado frente às pressões ambientais pelas quais a bactéria enfrentou.

Além disso, a capacidade de *S. stutzeri* em degradar hidrocarbonetos, como o petróleo cru, deve ser avaliada em experimentos futuros para verificar se a bactéria pode atuar na deterioração do produto durante o armazenamento em tanques,

alterando sua composição química e, conseqüentemente, prejudicando a sua qualidade.

Por fim, considerando que *S. stutzeri* está envolvida no processo de formação de biofilme e na potencialização da corrosão em aço carbono (Zhang *et al.*, 2025), e na corrosão, utilizando CO₂ como fonte de carbono e ferro metálico como doador de elétrons (Liu *et al.*, 2022), estudos adicionais poderão investigar suas interações com bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Fu *et al.*, 2022). Esse tipo de investigação pode revelar se a presença de *S. stutzeri* contribui para mitigar ou intensificar a corrosão microbiana em ambientes marinhos e de produção de petróleo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELKADER, K. et al. The Preclinical and Clinical Progress of Bacteriophages and Their Lytic Enzymes: The Parts are Easier than the Whole. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 96, 24 jan. 2019.
- ABDULAZIZ KHATTAK. **Corrosion in the oil and gas industry: A costly challenge**. Disponível em: <https://ognnews.com/Article/46837/Corrosion_in_the_oil_and_gas_industry_A_costly_challenge>. Acesso em: 29 jul. 2025.
- ABEDON, S. T. et al. Bacteriophage prehistory. **Bacteriophage**, v. 1, n. 3, p. 174–178, 22 maio 2011.
- AHMAD, T. A. et al. From forgotten cure to modern medicine: The resurgence of bacteriophage therapy. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 39, p. 231–239, dez. 2024.
- AHN, Y.-H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1709–1721, ago. 2006.
- ÁLVAREZ, B.; BIOSCA, E. G. Harnessing the Activity of Lytic Bacteriophages to Foster the Sustainable Development Goals and the “One Health” Strategy. **Viruses** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 abr. 2025.
- ALVI, I. A. et al. RLP, a bacteriophage of the family Podoviridae, rescues mice from bacteremia caused by multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Virology**, v. 165, n. 6, p. 1289–1297, 3 jun. 2020.
- AMANKWAH, S.; ABDUSEMED, K.; KASSA, T. Bacterial Biofilm Destruction: A Focused Review On The Recent Use of Phage-Based Strategies With Other Antibiofilm Agents. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. Volume 14, p. 161–177, set. 2021.
- ANDREAS POSPIECH, B. N. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, v. 11, n. 6, p. 217–218, jun. 1995.
- ASLAM, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* ventricular assist device infections: findings from ineffective phage therapies in five cases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 68, n. 4, 3 abr. 2024.
- BEECH, I. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 181–186, jun. 2004.

- BENNASAR, A. et al. 16S rRNA Gene Sequence Analysis Relative to Genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and Proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 200–205, 1 jan. 1996.
- BERGEY, D. H. , F. C. H. R. S. B. B. W. H. AND F. M. H. Bergey's manual of determinative bacteriology, 1st ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. 1923. [s.d.].
- BERGEY, D. H. 1930. Bergey's manual of determinative bacteriology, 3rd ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. [s.d.].
- BERLANGA, M.; GUERRERO, R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 165, 1 dez. 2016.
- BOUTELLER, M. et al. **Pseudomonas flagella: Generalities and specificities.** **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 abr. 2021.
- BREITBART, M. et al. Phage puppet masters of the marine microbial realm. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 754–766, 4 jun. 2018.
- BRIDIER, A. et al. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, n. 9, p. 1017–1032, 15 out. 2011.
- BROWNE, K. et al. A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7047, 24 set. 2020.
- Brunet_Galmes_Isabel. [s.d.].
- BRUYNOGHE, R. A. J. M.; MAISIN, J. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage. . **CR Soc Biol**, v. 85, p. 1120–1121, 1921.
- BUTTNER, C. et al. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 20 jan. 2017.
- CARNEIRO FIDÉLIS SILVA, L. et al. Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. **Journal of Environmental Management**, v. 248, p. 109294, out. 2019a.
- CARNEIRO FIDÉLIS SILVA, L. et al. Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. **Journal of Environmental Management**, v. 248, 15 out. 2019b.

- CARNEIRO FIDÉLIS SILVA, L. et al. Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. **Journal of Environmental Management**, v. 248, 15 out. 2019c.
- CESTA, N. et al. Application of Phage Therapy in a Case of a Chronic Hip-Prosthetic Joint Infection due to *Pseudomonas aeruginosa*: An Italian Real-Life Experience and *In Vitro* Analysis. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, 3 fev. 2023.
- CHESTER, F. D. 1901. A manual of determinative bacteriology. Macmillan, New York, N.Y. 1901.
- COURNET, A. et al. Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by *Pseudomonas aeruginosa*. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 17, p. 4902–4908, jul. 2010.
- COYTE, K. Z. et al. Microbial competition in porous environments can select against rapid biofilm growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 2, 10 jan. 2017.
- COZAR, E. **Caracterización taxonómica, fisiológica y bioquímica de nuevas *Pseudomonas* marinas degradadoras de hidrocarburos cíclicos**. Palma de Mallorca, Spain.: [s.n.].
- CUNHA CAVALCANTE, P. **Proposição de um coquetel fágico para controle de biofilmes de bactérias redutoras de sulfato em ambientes relacionados à indústria de óleo e gás**. Viçosa - MG: [s.n.].
- DASGUPTA, D.; GHOSH, R.; SENGUPTA, T. K. Biofilm-Mediated Enhanced Crude Oil Degradation by Newly Isolated *Pseudomonas* Species. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1–13, 5 mar. 2013.
- DAVIES, D. G.; CHAKRABARTY, A. M.; GEESEY, G. G. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1181–1186, abr. 1993.
- DOBRETISOV, S.; RITTSCHOF, D. **Love at first taste: Induction of larval settlement by marine microbes**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 fev. 2020.
- DUBLANCHET, A.; FRUCIANO, E. A short history of phage therapy. . **Med Mal Infect**, v. 38, n. 8, p. 415–420, 2008.
- DUCKWORTH, D. H. **“Who Discovered Bacteriophage?”** **BACTEREZOLOGICAL REVIews**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/br>>.

- EHIOSUN, K. I.; GRIMAUD, R.; LOBINSKI, R. Mass spectrometric analysis for carboxylic acids as viable markers of petroleum hydrocarbon biodegradation. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 35, p. e00172, set. 2022.
- ENNOURI, H. et al. The extracellular matrix of the oleolytic biofilms of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* comprises cytoplasmic proteins and T2SS effectors that promote growth on hydrocarbons and lipids. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 159–173, 8 jan. 2017.
- FLEMMING, H.-C. Mikrobielle Werkstoffzerstörung – Grundlagen: Ökonomisch-technischer Überblick. **Materials and Corrosion**, v. 45, n. 1, p. 5–9, 4 jan. 1994.
- FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 11 set. 2016.
- FLEMMING, H.-C. Microbial Biofouling: Unsolved Problems, Insufficient Approaches, and Possible Solutions. In: [s.l.: s.n.]. p. 81–109.
- FLINT, J. et al. **Principles of Virology**. 5. ed. [s.l.: s.n.]. v. 1 Molecular Biology
- FRUCIANO, D. E.; BOURNE, S. Phage as an Antimicrobial Agent: D’herelle’s Heretical Theories and Their Role in the Decline of Phage Prophylaxis in the West. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 19–26, 21 jan. 2007.
- FU, Q. et al. Biologically competitive effect of *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas stutzeri* on corrosion of X80 pipeline steel in the Shenyang soil solution. **Bioelectrochemistry**, v. 145, p. 108051, jun. 2022.
- FU, Q. et al. Combined Chemical-Biological Method for Efficient Clean Treatment of Oily Sludge. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 236, n. 2, p. 124, 22 fev. 2025.
- GARCÍA-VALDÉS, E.; MULET, M.; LALUCAT, J. Insights into the life styles of *Pseudomonas stutzeri*. In: **Pseudomonas**. [s.l.] Springer Netherlands, 2006. v. 6p. 177–198.
- GARCÍA-VALDÉS, E.; MULET, M.; LALUCAT, J. Insights into the Life Styles of *Pseudomonas stutzeri*. In: **Pseudomonas**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 177–198.
- GARGATE, N.; LAWS, M.; RAHMAN, K. M. Current economic and regulatory challenges in developing antibiotics for Gram-negative bacteria. *npj Antimicrob Resist*, [S. l.], v. 3, n. 50, 2025.
- GARRETTO, A. et al. Bacteriophages of the lower urinary tract. **Nature Reviews Urology**, v. 16, n. 7, p. 422–432, 9 jul. 2019.

- GHOLIPOUR, S. et al. The bacterial biofilm resistome in drinking water distribution systems: A systematic review. **Chemosphere**, v. 329, p. 138642, jul. 2023.
- GOMILA, M. et al. Genome-Based Taxonomy of the Genus *Stutzerimonas* and Proposal of *S. frequens* sp. nov. and *S. degradans* sp. nov. and Emended Descriptions of *S. perfectomarina* and *S. chloritidismutans*. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1363, 6 jul. 2022.
- GREEN, S. I. et al. A Retrospective, Observational Study of 12 Cases of Expanded-Access Customized Phage Therapy: Production, Characteristics, and Clinical Outcomes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 77, n. 8, p. 1079–1091, 13 out. 2023.
- HADFIELD MG. Biofilms and marine invertebrate larvae: what bacteria produce that larvae use to choose settlement sites. *Ann Rev Mar Sci.* 2011;3:453-70. . [s.d.].
- JANG, H.; RUSCONI, R.; STOCKER, R. Biofilm disruption by an air bubble reveals heterogeneous age-dependent detachment patterns dictated by initial extracellular matrix distribution. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 3, n. 1, p. 6, 3 mar. 2017.
- JÉSSICA CARMO, A. DO. **INFLUÊNCIA DO FAGO vB_EcoM-UFV13 NO BIOFILME FORMADO PELO CONSÓRCIO P48SEP.** [s.l.: s.n.].
- KANG, X. et al. Strategies and materials for the prevention and treatment of biofilms. **Materials Today Bio**, v. 23, p. 100827, dez. 2023a.
- KANG, X. et al. Strategies and materials for the prevention and treatment of biofilms. **Materials Today Bio**, v. 23, p. 100827, dez. 2023b.
- KAUR, S.; CHHIBBER, S.; BANSAL, S. Disrupting the mixed-species biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO using bacteriophages alone or in combination with xylitol. **Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 1369–1377, 1 jul. 2015.
- KNOWLES, R. Denitrification. **Microbiological Reviews**, v. 46, n. 1, p. 43–70, mar. 1982.
- KOCH, G. Cost of corrosion. In: **Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies.** [s.l.] Elsevier, 2017. p. 3–30.
- KUTSUKAKE, K.; IINO, T. Inversions of specific DNA segments in flagellar phase variation of *Salmonella* and inversion systems of bacteriophages P1 and Mu. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 12, p. 7338–7341, dez. 1980.
- LALUCAT, J. et al. Biology of *Pseudomonas stutzeri* . **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 510–547, jun. 2006.

- LALUCAT, J. et al. Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 126289, jan. 2022.
- LANE, D. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, p. 115–175, 1991.
- LANE, D. J. et al. **Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses (reverse transcriptase/dideoxynucleotide)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.pnas.org>>.
- LATKA, A. et al. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 8, p. 3103–3119, 23 abr. 2017.
- LEHMAN, K. B. , AND NEUMANN. 1896-1927. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik, 1st (1896), 2nd (1899), 3rd (1904), 5th (1912), 6th (1920), and 7th (1927) ed. J. F. Lehman, München, Germany. [s.d.].
- LI, L. et al. Dynamic responses in *Pseudomonas stutzeri* M3 bioaugmentation of crude-oil-contaminated soil: Hydrocarbons, microbial community structures, and functional genes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, n. 1, p. 111863, fev. 2024.
- LI, L. et al. Removal of petroleum hydrocarbons and heterocycles by *Pseudomonas* sp. LKY-5 under aerobic conditions. **Petroleum Science and Technology**, v. 37, n. 11, p. 1298–1305, 3 jun. 2019.
- LITTLE, B. J.; LEE, J. S.; RAY, R. I. Diagnosing Microbiologically Influenced Corrosion: A State-of-the-Art Review. **Corrosion**, v. 62, n. 11, p. 1006–1017, 1 nov. 2006.
- LITTLE, B.; LEE, J.; RAY, R. A review of 'green' strategies to prevent or mitigate microbiologically influenced corrosion. **Biofouling**, v. 23, n. 2, p. 87–97, 5 jan. 2007.
- LIU, H. et al. Characterizations of the biomineralization film caused by marine *Pseudomonas stutzeri* and its mechanistic effects on X80 pipeline steel corrosion. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 125, p. 15–28, out. 2022.
- LU, T. K.; KOERIS, M. S. The next generation of bacteriophage therapy. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 524–531, out. 2011.
- MAALEJ, H. et al. Optimization of exopolysaccharide production from *Pseudomonas stutzeri* AS22 and examination of its metal-binding abilities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 2, p. 356–367, fev. 2015.

- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: [s.n.].
- MEDINA, L. R. et al. Genomic insights into heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria from petroleum terminal effluents. **Heliyon**, v. 10, n. 21, 15 nov. 2024.
- MIGULA, W. 1900. *System der Bakterien*, vol. 2. Gustav Fisher, Jena, Alemanha. 1900.
- MUNIRASU, S.; HAIJA, M. A.; BANAT, F. Use of membrane technology for oil field and refinery produced water treatment—A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 100, p. 183–202, mar. 2016.
- MUNN, C. B. Viruses as pathogens of marine organisms—from bacteria to whales. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 86, n. 3, p. 453–467, 10 jun. 2006.
- MYELNIKOV, D. An Alternative Cure: The Adoption and Survival of Bacteriophage Therapy in the USSR, 1922–1955. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 73, n. 4, p. 385–411, 1 out. 2018.
- NAKANO, K. et al. First Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 (DSM 50071^T), Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology. **Genome Announcements**, v. 3, n. 4, 27 ago. 2015.
- NEU, L. et al. Small-Scale Heterogeneity in Drinking Water Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 29 out. 2019.
- O'REILLY, P. et al. Reviewing the complexities of bacterial biocide susceptibility and in vitro biocide adaptation methodologies. **npj Antimicrobials and Resistance**, v. 3, n. 1, p. 39, 13 maio 2025.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. *Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development*. Nova Iorque: ONU, 2015. Disponível em: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/>. Acesso em: 10 ago. 2025.
- PALLERONI, N. J. **Pseudomonas classification A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria** *Antonie van Leeuwenhoek*. [s.l.: s.n.].
- PALLERONI, N. J. The genus *Pseudomonas*. In: **Practical handbook of Microbiology**. [s.l.] CRC Press, 2008. p. 251–262.
- PATRICIA, G. S.; GUIAMET, P. S.; GÓMEZ DE SARAVIA, S. G. **Laboratory studies of biocorrosion control using traditional and environmentally friendly biocides: An overview**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/237533038>>.

- PÉREZ-PADILLA, V. et al. Genetic basis of biofilm formation and salt adaptation in the plant-beneficial strain *Stutzerimonas stutzeri* MJL19. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 109, n. 1, 1 dez. 2025.
- PIRNAY, J.-P. et al. Personalized bacteriophage therapy outcomes for 100 consecutive cases: a multicentre, multinational, retrospective observational study. **Nature Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1434–1453, 4 jun. 2024.
- PRASAD, A. R.; KUNYANKANDY, A.; JOSEPH, A. Corrosion Inhibition in Oil and Gas Industry. In: **Corrosion Inhibitors in the Oil and Gas Industry**. [s.l.] Wiley, 2020. p. 135–150.
- PRIGENT-COMBARET, C. et al. Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in *Escherichia coli* via Regulation of the *csgD* Gene. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 24, p. 7213–7223, 15 dez. 2001.
- QIU, L. et al. Inhibition Effect of *Pseudomonas stutzeri* on the Corrosion of X70 Pipeline Steel Caused by Sulfate-Reducing Bacteria. **Materials**, v. 16, n. 7, p. 2896, 5 abr. 2023.
- RAMON ROSSELLÓ-MÓRA, R. A. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 209–216, jun. 2015.
- ROACH, D. R.; DONOVAN, D. M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. **Bacteriophage**, v. 5, n. 3, p. e1062590, 3 jul. 2015.
- SÁNCHEZ-LOZANO, I. et al. Metabolomic Insights of Biosurfactant Activity from *Bacillus niabensis* against Planktonic Cells and Biofilm of *Pseudomonas stutzeri* Involved in Marine Biofouling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, 1 fev. 2023.
- SAUER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1140–1154, 15 fev. 2002.
- SAUER, K.; CAMPER, A. K. Characterization of Phenotypic Changes in *Pseudomonas putida* in Response to Surface-Associated Growth. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 22, p. 6579–6589, 15 nov. 2001.
- SCARASCIA, G. et al. Bacteriophage Infectivity Against *Pseudomonas aeruginosa* in Saline Conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2 maio 2018.
- SHARMA, S. et al. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1614, 19 jun. 2023.

- SHEN, Y. et al. Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1818–1824, ago. 2013.
- SHI, X. et al. Comprehensive Review on the Use of Biocides in Microbiologically Influenced Corrosion. **Microorganisms**, v. 11, n. 9, p. 2194, 30 ago. 2023.
- SHREE, P. et al. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. **Medicine in Microecology** Elsevier B.V., , 1 jun. 2023.
- SHUKLA, S. K. et al. Biofilm-Mediated Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: **Microbial Biodegradation and Bioremediation**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 203–232.
- SIJDERIUS, R. **Heterotrophe bacterien, die thiosulfaat oxydeeren. Ph.D. thesis. University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands. 1946.** [s.l.: s.n.].
- SIVADON, P. et al. Biofilm formation as a microbial strategy to assimilate particulate substrates. **Environmental Microbiology Reports**, p. 1758- 2229.12785, 9 ago. 2019.
- SOMMER, H. M. et al. Examination of reproducibility in microbiological degradation experiments. **Biodegradation**, v. 9, n. 1, p. 65–82, jan. 1998.
- SOROKIN, D. YU. et al. Anaerobic oxidation of thiosulfate to tetrathionate by obligately heterotrophic bacteria, belonging to the *Pseudomonas stutzeri* group. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, n. 2, p. 113–123, out. 1999.
- SUGANYA, S.; KUMAR, M. A.; HALDAR, S. Effect of bacterial attachment on permeable membranes aided by extracellular polymeric substances. In: **Microbial and Natural Macromolecules**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 733–749.
- SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G. Bacteriophage Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649–659, mar. 2001.
- TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596–1599, ago. 2007.
- TATSAPORN, T.; KORNKANOK, K. Using Potential Lactic Acid Bacteria Biofilms and their Compounds to Control Biofilms of Foodborne Pathogens. **Biotechnology Reports**, v. 26, p. e00477, jun. 2020.

- THAPA, R. K.; KIM, J. O.; KIM, J. Antimicrobial strategies for topical biofilm-based wound infections: past, present, and future. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 53, n. 5, p. 627–641, 27 set. 2023.
- THOMPSON, J. D. et al. **The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools** *Nucleic Acids Research*. [s.l.] Oxford University Press, 1997.
- TINGYUE GU, D. X. The War against Problematic Biofilms in the Oil and Gas Industry. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 05, 2015.
- TORSVIK, V.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. **Total bacterial diversity in soil and sediment communities a review** *Journal of Industrial Microbiology*. Oslo: [s.n.].
- VAN NIEL CB, A. M. A NOTE ON PSEUDOMONAS STUTZERI. *J Bacteriol*64:1952. [s.d.].
- VIDAL, O. et al. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 Mutant Strain Able To Form Biofilms on Inert Surfaces: Involvement of a New *ompR* Allele That Increases Curli Expression. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 9, p. 2442–2449, maio 1998.
- VIEIRA SILVA, M. **Validação de um sistema de tanques piloto para avaliação do efeito de um coquetel de bacteriófagos sobre o biofilme e produção de H₂S por bactérias redutoras de sulfato**. Viçosa - MG: [s.n.].
- WEBB, J. S.; LAU, M.; KJELLEBERG, S. Bacteriophage and Phenotypic Variation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 23, p. 8066–8073, dez. 2004.
- WELIKALA, S. et al. Biofilm Development on Carbon Steel by Iron Reducing Bacterium *Shewanella putrefaciens* and Their Role in Corrosion. **Metals**, v. 12, n. 6, p. 1005, 12 jun. 2022.
- YAMAMOTO, S. et al. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes The GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are: *gyrB*, D37926, D37297, D86005–D86019 and AB039381–AB039492; *rpoD*, D86020–D86036 and AB039493–AB039624. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2385–2394, 1 out. 2000.
- YANG, G. et al. *Pseudomonas guangdongensis* sp. nov., isolated from an electroactive biofilm, and emended description of the genus *Pseudomonas* Migula 1894. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_12, p. 4599–4605, 1 dez. 2013.

- YANG, H. et al. Mini-Review of Biofilm Interactions with Surface Materials in Industrial Piping System. **Membranes**, v. 13, n. 2, p. 125, 18 jan. 2023.
- YOUNG, M. J. et al. Phage Therapy for Diabetic Foot Infection: A Case Series. **Clinical Therapeutics**, v. 45, n. 8, p. 797–801, ago. 2023.
- ŻACZEK, M. et al. Phage Therapy in Poland – a Centennial Journey to the First Ethically Approved Treatment Facility in Europe. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 5 jun. 2020.
- ZHANG, J. et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 9866–9869, nov. 2011.
- ZHANG, S. et al. Corrosion of carbon steel by *Pseudomonas stutzeri* CQ-Z5 in simulated oilfield water. **Bioelectrochemistry**, v. 162, p. 108846, abr. 2025.
- ZHOU, E. et al. Accelerated corrosion of 2304 duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 1–9, fev. 2018a.
- ZHOU, E. et al. Accelerated corrosion of 2304 duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 127, p. 1–9, 1 fev. 2018b.
- ZUMFT, W. G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 4, p. 533–616, dez. 1997.