

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ANA JULIA DILL ROSSETO

ESTRATÉGIA PARA REDUÇÃO DE BIOCORROSÃO NA INDÚSTRIA PETROLÍFERA
UTILIZANDO BACTERIÓFAGOS

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2026

ANA JULIA DILL ROSSETO

ESTRATÉGIA PARA REDUÇÃO DE BIOCORROSÃO NA INDÚSTRIA PETROLÍFERA
UTILIZANDO BACTERIÓFAGOS

Monografia apresentada ao curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Viçosa como
requisito para a obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2026

ANA JULIA DILL ROSSETO

ESTRATÉGIA PARA REDUÇÃO DE BIOCORROSÃO NA INDÚSTRIA PETROLÍFERA
UTILIZANDO BACTERIÓFAGOS

Monografia apresentada ao curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Viçosa como
requisito para a obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas

APROVADA: 22 de junho de 2026.

Documento assinado digitalmente
 ANA JULIA DILL ROSSETO
Data: 04/07/2026 21:20:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ana Julia Dill Rosseto

(Autora)

(UFV)

Documento assinado digitalmente
 SERGIO OLIVEIRA DE PAULA
Data: 03/07/2026 17:43:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Sérgio Oliveira de Paula

(Orientador)

(UFV)

À minha mãe Marcia, às minhas avós Lorena e Alzira e à minha irmã Camila...
mulheres que me criaram e moldaram meu caráter...

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e amigos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela formação e oportunidades oferecidas.

À todos os meus professores da graduação, ensino fundamental e médio, por todos os ensinamentos.

A todos do LIVM, principalmente Lu, Fabi, Duda, Gaby, Carlos e Igor, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos, Lais, José e Flávia, por tornar os dias mais alegres e por toda a ajuda.

Ao meu orientador, professor Sérgio Oliveira de Paula, por todo o suporte e orientação ao longo do processo.

Às doutoras Paloma Cavalcante Cunha e Adriele Jéssica do Carmo Santos, pelos ensinamentos e apoio, sem os quais este trabalho não seria possível.

À Petrobras, pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

A corrosão microbiologicamente induzida (CMI), causada predominantemente por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), representa um dos maiores desafios operacionais e econômicos na indústria petrolífera, devido à formação de biofilmes resistentes aos tratamentos convencionais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de coquetéis de bacteriófagos como agentes biológicos de controle de biofilmes de BRS. Inicialmente, realizou-se a triagem de 20 coquetéis fágicos em microplacas, sendo o Coquetel 20 selecionado para testes em cupons de aço-carbono. A eficácia do tratamento foi avaliada após 24 e 48 horas de exposição por meio de quantificação de células viáveis (NMP), quantificação de ATP, qPCR para 16S rRNA e *dsrA*, perfilometria óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e testes de atividade de BRS. Os resultados demonstraram que, embora o tratamento tenha promovido uma tendência de redução na viabilidade celular e metabólica, não houve diferença estatisticamente significativa. Contudo, a análise de qPCR revelou uma redução significativa nas cópias do gene *dsrA* após 48 horas, indicando a eficiência do coquetel em maiores períodos de tratamento. As análises estruturais por MEV e perfilometria confirmaram a persistência da matriz polimérica extracelular (EPS), que atuou como barreira física, limitando a eficácia do tratamento em curtos períodos. Conclui-se que os bacteriófagos são alternativas promissoras, mas que, isoladamente, podem ser insuficientes para a erradicação de biofilmes maduros, sugere-se que abordagens combinadas, integrando fagos a agentes químicos ou físicos, sejam exploradas para potencializar a mitigação da biocorrosão em sistemas industriais.

Palavras-chave: Bacteriófagos; Bactérias Redutoras de Sulfato; Corrosão Microbiologicamente Induzida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO09

OBJETIVOS11

OBJETIVO GERAL11

OBJETIVOS ESPECÍFICOS11

OBJETIVOS ESPECÍFICOS11

3 METODOLOGIA12

3.1 TESTE DE CONTROLE DE BIOFILME EM MICROPLACAS DE 96 POÇOS.12

3.1.1 CULTURAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.12

3.1.2 PROPAGAÇÃO, TITULAÇÃO E MONTAGEM DOS COQUETÉIS FÁGICOS. 12

3.1.3 INÓCULOS E MONTAGEM DAS MICROPLACAS DE 96 POÇOS15

3.1.4 QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME POR CRISTAL VIOLETA15

3.2 TESTE EM CUPONS DE AÇO-CARBONO.16

3.2.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO E DOS CUPONS DE AÇO CARBONO.16

3.2.2 MONTAGEM EXPERIMENTAL.16

3.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA... 17

3.2.4 NÚMERO MAIS PROVÁVEL18

3.2.5 TESTE DE ATIVIDADE DE BRS18

3.2.6 QUANTIFICAÇÃO DE ATP18

3.2.7 qPCR19

3.2.8 PERFILOMETRIA ÓPTICA20

4 RESULTADOS20

4.1 CONTROLE DE BIOFILME20

4.2 TESTE EM CUPONS DE AÇO-CARBONO28

4.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA28

4.2.2 NÚMERO MAIS PROVÁVEL29

4.2.3 TESTE DE ATIVIDADE DE BRS31

4.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE ATP32

4.2.5 qPCR 32

4.2.6 PERFILOMETRIA ÓPTICA33

5 DISCUSSÃO34

5.1 CONTROLE DE BIOFILME34

5.2	TESTE EM CUPONS DE AÇO-CARBONO	36
5.2.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	36
5.2.2	NÚMERO MAIS PROVÁVEL	36
5.2.3	TESTE DE ATIVIDADE DE BRS	37
5.2.4	QUANTIFICAÇÃO DE ATP	37
5.2.5	qPCR	37
5.2.6	PERFILOMETRIA ÓPTICA	38
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera é um dos pilares da economia mundial e nacional, desempenhando papel estratégico na geração de energia, arrecadação fiscal e manutenção da balança comercial. No Brasil, o setor corresponde a aproximadamente 17 % do Produto Interno Bruto (PIB) industrial, além de movimentar uma ampla cadeia produtiva que envolve desde a exploração e refino até a distribuição e comercialização de derivados. O país figura entre os dez maiores produtores de petróleo do mundo, com destaque para a exploração em águas profundas e ultra profundas, especialmente na camada do pré-sal, que representa mais de 70 % da produção nacional. (Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás, 2025).

O petróleo, além de ser uma fonte de energia, é um insumo essencial para a produção de combustíveis, plásticos, fertilizantes, medicamentos e inúmeros produtos químicos. A dependência global dessa matéria-prima faz com que sua exploração e transporte sejam temas centrais nas políticas econômicas e ambientais. Mesmo diante da transição energética e do avanço das fontes renováveis, o petróleo ainda representa cerca de 30 % da matriz energética mundial, e projeções da Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP) indicam que a demanda mundial deve crescer mais de 19 milhões de barris por dia entre 2024 e 2050, impulsionada pelo aumento populacional e pela expansão industrial em países emergentes (Organização dos Países Exportadores de Petróleo, 2026).

Esse panorama reforça a importância de aprimorar os processos de extração e transporte de petróleo, especialmente em ambientes offshore, onde as condições extremas de salinidade, temperatura e pressão favorecem o desgaste dos materiais metálicos utilizados nas estruturas de produção. A complexidade das operações petrolíferas exige o uso de materiais metálicos de alta resistência, como aços carbono e ligas de níquel, que estão constantemente expostos a ambientes agressivos. Um dos principais desafios enfrentados pela indústria é a corrosão, fenômeno que causa perdas econômicas expressivas e compromete a segurança operacional. Segundo a National Association of Corrosion Engineers International (NACE), o custo anual da corrosão equivale a cerca de 3,4 % do PIB mundial, representando aproximadamente US\$ 2,5 trilhões em prejuízos diretos e indiretos (NACE International, 2016). Além dos custos, a corrosão está associada a falhas estruturais que podem resultar em vazamentos, contaminação ambiental e acidentes graves, tornando-se um problema de relevância global (Etim, 2022).

A corrosão é um processo natural de degradação de materiais metálicos, resultante de reações químicas ou eletroquímicas entre o metal e o meio ambiente. Em sistemas

petrolíferos, ela é intensificada pela presença de água, sais, gases dissolvidos e micro-organismos, sendo esta última denominada corrosão microbiologicamente induzida (CMI). A CMI é definida como um processo eletroquímico em que micro-organismos participam do início, facilitação ou aceleração da corrosão metálica (Javaherdashti, 2007). Ela ocorre em ambientes úmidos e confinados, como tubulações, tanques e sistemas de bombeamento, onde há acúmulo de biofilmes microbianos, comunidades estruturadas de micro-organismos aderidos a superfícies, envoltos por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que conferem resistência a agentes químicos e físicos (Liu et al., 2023).

O principal grupo de microrganismos associados à CMI é o das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), microrganismos anaeróbios que utilizam o sulfato como aceptor final de elétrons em seu metabolismo. Durante esse processo, liberam sulfeto de hidrogênio (H_2S), um composto altamente tóxico e corrosivo que, ao reagir com o petróleo, provoca sua acidificação, reduzindo o valor comercial e aumentando os custos de refino (Liu et al., 2023). Além dos impactos econômicos, o H_2S representa um risco ocupacional grave, podendo causar intoxicações fatais em trabalhadores expostos em plataformas e refinarias (Tang et al., 2009; Cunha, 2021).

As BRS formam densos biofilmes sobre superfícies metálicas, compostos por exopolissacarídeos, proteínas e lipídios, que criam uma matriz protetora contra agentes externos e dificultam sua remoção. Essa estrutura favorece a estratificação microbiana, com microrganismos aeróbios na camada superficial e anaeróbios no interior, intensificando a produção de metabólitos corrosivos em contato direto com o metal (Liu et al., 2023). Além disso, o biofilme atua como uma barreira física que altera o potencial eletroquímico da superfície metálica, promovendo microambientes com pH reduzido e alta concentração de íons sulfeto, o que acelera a degradação do material (Papavinasam, 2014).

A CMI é um problema de difícil controle, pois envolve múltiplos fatores biológicos e físico-químicos. As estratégias convencionais de mitigação baseiam-se em métodos químicos e físicos. Os métodos químicos, como biocidas e inibidores de incrustação, apresentam eficácia limitada devido à baixa penetração dos compostos na matriz do biofilme. Já os métodos físicos, como o Pipeline Inspection Gauge (PIG), utilizado na limpeza de tubulações, são pouco eficientes na remoção completa dos biofilmes, pois estes apresentam alta resistência à abrasão mecânica (Papavinasam, 2014).

Diante dessas limitações, cresce o interesse por abordagens biotecnológicas inovadoras. Uma alternativa promissora é o uso de bacteriófagos, vírus que infectam e lisam células bacterianas específicas, como agentes biológicos para o controle de biofilmes

(Ashrsf, et al., 2014). Os bacteriófagos apresentam dois ciclos de replicação, o lítico, em que ocorre a lise da célula hospedeira e liberação de novos vírus, e o lisogênico, em que o genoma do fago é incorporado ao DNA bacteriano, permanecendo latente até sua ativação (Kutter e Sulakvelidze, 2004; Husain et al., 2025). Essa dualidade permite aos fagos atuar tanto como agentes de controle direto quanto como reservatórios genéticos ativáveis conforme as condições ambientais.

O uso de fagos na indústria petrolífera tem sido estudado como uma alternativa sustentável e direcionada, capaz de reduzir a formação e estabilidade dos biofilmes sem causar impactos ambientais significativos. Além disso, os fagos apresentam alta especificidade, infectando apenas determinadas cepas bacterianas, o que evita a eliminação de micro-organismos benéficos presentes no ambiente (Husain et al., 2025).

Apesar do potencial, a alta especificidade representa um desafio, visto a dificuldade de isolamento de bacteriófagos específicos para BRS, especialmente devido à complexidade de se obter amostras ambientais e do alto custo relacionado ao trabalho em anaerobiose (Zhang et al., 2025). Para contornar essas limitações, estudos recentes têm explorado o uso de enzimas derivadas de fagos, como depolimerases e endolisinas, capazes de degradar componentes da matriz extracelular dos biofilmes, promovendo sua desestruturação mesmo em bactérias não hospedeiras diretas (Husain et al., 2025). Essas enzimas atuam degradando componentes estruturais como polissacarídeos e proteínas, o que facilita a penetração de agentes antimicrobianos e reduz a aderência bacteriana (Husain et al., 2025). Em ambientes petrolíferos, essa abordagem pode ser aplicada tanto na limpeza preventiva de dutos quanto na recuperação de sistemas já comprometidos pela corrosão.

Tendo isso em vista, o presente trabalho objetiva analisar a eficiência de diferentes coquetéis fágicos no controle de biofilme e corrosão microbiologicamente induzida por bactérias redutoras de sulfato.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de coquetéis fágicos inespecíficos no controle de biofilme misto contendo bactérias redutoras de sulfato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar e selecionar, através de ensaio colorimétrico, coquetéis fágicos inespecíficos capazes de reduzir biofilme de culturas mistas contendo bactérias redutoras de sulfato

- Selecionar qual o melhor meio de cultura para avaliar a formação e redução do biofilme dessas culturas
- Testar a eficiência do coquetel selecionado em reduzir o biofilme de uma cultura mista de BRS em cupons de aço carbono
- Quantificar as células viáveis e a atividade metabólica das bactérias presentes na cultura mista de BRS, tanto na presença quanto na ausência de coquetel fágico
- Analisar a perfilometria do biofilme misto de BRS em de cupons de aço-carbono na presença e ausência de coquetel fágico
- Analisar a composição e estruturação do biofilme misto de BRS formado em cupons de aço-carbono na presença e ausência de coquetel fágico por microscopia eletrônica de varredura

3 METODOLOGIA

3.1 TESTE DE CONTROLE DE BIOFILME EM MICROPLACAS DE 96 POÇOS

3.1.1 CULTURAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As culturas aeróbias *E. coli* 30, *Staphylococcus aureus* O46, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 e *Shigella flexneri*, utilizadas para propagação e titulação viral, foram cultivadas em meio Luria-Bertani (10 g/L NaCl, 10 g/L peptona, 5 g/L extrato de levedura) a 37°C.

Para montagem do experimento em microplacas de 96 poços foram utilizadas três culturas mistas contendo BRS. A cultura SRB37, definida como padrão pelo grupo de pesquisa do laboratório de imunovirologia molecular (LIVM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), por ser representativa de um local de interesse, e as culturas SRB55 e SRB56 foram selecionadas por serem culturas com alta produção de biofilme.

O cultivo das culturas foi feito a 37°C em meio Postgate C (25 g/L NaCl, 0,5 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L NH_4Cl , 4,5 g/L Na_2SO_4 , 0,04 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,064 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L extrato de levedura, 0,3 g/L citrato de sódio, 9,4 mL/L lactato de sódio 50% m/v, 4 mL/L resazurina 0,025% m/v e 0,13 g/L tioglicolato de sódio) e foi realizada uma manutenção semanal que consistiu na troca de 10% do volume total do frasco por meio de cultura novo, para que o crescimento bacteriano permanecesse na fase exponencial.

3.1.2 PROPAGAÇÃO, TITULAÇÃO E MONTAGEM DOS COQUETÉIS FÁGICOS

Para a formulação dos coquetéis fágicos, foram utilizados os bacteriófagos *Escherichia* phage vB_EcoM-UFV09 (GenBank: MZ291552.2), *Escherichia* phage vB_EcoM-UFV13 (GenBank: KU867876.1), *Escherichia* phage EcoM1 (GenBank: PQ818760.1), *Citrobacter* phage CitS1 (GenBank: PQ818762.1), *Shigella* phage ShigP1 (GenBank: PQ818763.1), *Staphylococcus* phage CapO46 (GenBank: PV007823.1) e *Citrobacter* phage vB_CfrD-Cit2 (GenBank: OP745948.1), provenientes da coleção microbiológica do Laboratório de Imunovirologia Molecular da UFV. Os coquetéis foram preparados combinando-se três ou quatro fagos distintos em proporções variadas, como mostra a Tabela 1, e diluídos em tampão SM (5,8 g/L NaCL, 2,0 g/L MgSO₄·7H₂O, 6,057 g/L Tris e 0,1 g/L de gelatina) para a concentração final de 1x10⁷ UFP/mL cada, com exceção dos coquetéis 6 a 10, nos quais o fago ShigP1 foi utilizado na concentração 1x10⁸ UFP/mL.

Para a propagação e titulação das partículas virais, foram utilizadas as culturas *E. coli* 30 para os fagos UFV09, UFV13 e EcoM1, *Staphylococcus aureus* O46 para o fago CapO46, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 para o fago Cit2, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 para o fago CitS1 e *Shigella flexneri* para o fago ShigP1, seguindo o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001).

Tabela 1 - Coquetéis testados

Coquetel	Composição			Proporção
Coquetel 1	<i>Escherichia</i> phage EcoM1	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1	1:1:1
Coquetel 2	<i>Escherichia</i> phage EcoM1	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1	1:1:2
Coquetel 3	<i>Escherichia</i> phage EcoM1	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1	2:1:1
Coquetel 4	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV09	1:2:1
Coquetel 5	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV09	1:1:1

Coquetel 6	<i>Escherichia</i> phage EcoM1	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1		1:1:10
Coquetel 7	<i>Escherichia</i> phage EcoM1	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1		1:1:20
Coquetel 8	<i>Escherichia</i> phage EcoM1	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1		2:1:10
Coquetel 9	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV09		1:20:1
Coquetel 10	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV09		1:10:1
Coquetel 11	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV13	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV09		1:1:1
Coquetel 12	<i>Citrobacter</i> phage vB_CfrD-Cit 2	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV13	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV09		1:1:1
Coquetel 13	<i>Staphylococc us</i> phage CapO46	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV13	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV09		1:1:1
Coquetel 14	<i>Staphylococc us</i> phage CapO46	<i>Shigella</i> phage ShigP1	<i>Citrobacter</i> phage vB_CfrD-Cit 2	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	1:1:1:1
Coquetel 15	<i>Staphylococc us</i> phage CapO46	<i>Citrobacter</i> phage vB_CfrD-Cit 2	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV13	1:1:1:1
Coquetel 16	<i>Citrobacter</i> phage vB_CfrD-Cit 2	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1		1:1:1

Coquetel 17	<i>Staphylococcus</i> phage CapO46	<i>Shigella</i> phage ShigP1	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV09	1:1:1
Coquetel 18	<i>Staphylococcus</i> phage CapO46	<i>Citrobacter</i> phage vB_CfrD-Cit 2	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV09	1:1:1
Coquetel 19	<i>Staphylococcus</i> phage CapO46	<i>Citrobacter</i> phage CitS1	<i>Shigella</i> phage ShigP1	1:1:1
Coquetel 20	<i>Staphylococcus</i> phage CapO46	<i>Citrobacter</i> phage vB_CfrD-Cit 2	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-U FV13	1:1:1

Fonte: elaborado pelo autor (2026).

3.1.3 INÓCULOS E MONTAGEM DAS MICROPLACAS DE 96 POÇOS

As culturas foram ativadas por inoculação (10% v/v) em tubos Hungate contendo meio Postgate C e incubadas a 30 °C por 48 horas. Após esse período, a densidade óptica (DO) foi mensurada a 600 nm em espectrofotômetro. Em seguida, as culturas foram diluídas em meio Postgate E (1,83 g/L MgCl₂, 1,0 g/L NH₄C, 1,0 g/L Na₂SO₄, 0,67 g/L CaCl₂·2H₂O, 0,5 g/L KH₂PO₄, 1 g/L extrato de levedura, 0,1 g/L ácido ascórbico, 7,0 mL/L lactato de sódio 50% m/v, 4 mL/L resazurina 0,025% m/v e 0,13 g/L tioglicolato de sódio), feito em água do mar com ou sem adição de 0,5 g/L de sulfato de ferro (FeSO₄·7H₂O), até atingirem DO₆₀₀ de 0,1.

Para a formação de biofilmes, alíquotas de 200 µL da suspensão bacteriana (DO₆₀₀ = 0,1) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas por 5 dias. Decorrido este período, o sobrenadante foi removido e 180 µL de meio Postgate E com ou sem ferro foram adicionados. O grupo tratamento recebeu ainda 20 µL do coquetel fágico, enquanto o grupo controle recebeu um volume equivalente de meio LB mais tampão SM, conforme a composição residual do coquetel. As microplacas foram, então, incubadas por 24 horas adicionais antes dos procedimentos de quantificação. Todo o procedimento foi realizado em câmara de anaerobiose (Whitley A95) a 30 °C.

3.1.4 QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME POR CRISTAL VIOLETA

A quantificação da biomassa do biofilme foi realizada pelo método colorimétrico com cristal violeta. Após a incubação das microplacas, o sobrenadante foi descartado e os poços foram submetidos a duas lavagens com 250 μ L de tampão PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na_2HPO_4 e 0,24 g/L KH_2PO_4 ; pH 7,4). Posteriormente, as placas foram secas a 50 °C por 20 minutos e fixadas com 250 μ L de metanol durante 15 minutos. Após a secagem em temperatura ambiente, adicionou-se 250 μ L de cristal violeta (0,1% p/v) e incubou-se por 20 minutos. Em seguida, realizou-se três lavagens com 250 μ L de tampão PBS, para remoção do excesso de corante, e novamente secagem a 50°C por 20 minutos. Por fim, o corante retido foi solubilizado com 250 μ L de solução etanol:acetona (80:20) e a absorbância foi mensurada a 590 nm em espectrofotômetro de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific). Os resultados foram analisados através do software GraphPad Prism (version 8.3.0)

3.2 TESTE EM CUPONS DE AÇO-CARBONO

3.2.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO E DOS CUPONS DE AÇO CARBONO

Para o experimento com cupons de aço carbono, a cultura utilizada foi a SRB37. O inóculo foi feito a 10% em dois meios de cultura distintos: BAnHT (5 g/L glicose, 4 g/L peptona, 1 g/L extrato de levedura, 4 mL/L resazurina 0,025% m/v, 0,13 g/L tioglicolato de sódio; pH 7,6), que é um meio enriquecido para bactérias heterotróficas; e meio Postgate C, que é formulado especificamente para o cultivo de BRS. Os inóculos foram incubados por 48 horas a 30 °C.

Os cupons de aço-carbono utilizados para esse ensaio tinham formato cilíndrico com dimensão de 0,9 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura. Eles foram previamente jateados com areia para remoção de possíveis oxidações e incrustações e esterilizados por radiação ultravioleta por 30 minutos.

O coquetel selecionado para esse ensaio foi montado conforme descrito anteriormente.

3.2.2 MONTAGEM EXPERIMENTAL

O experimento foi montado em microplacas de 24 poços, na quais foi adicionado em cada poço um cupom, 1 mL de cultura crescida em meio BanHT e 1 mL de cultura crescida em Postgate C, sendo três poços para controle e três poços para tratamento para cada uma das análises a serem feitas: quantificação de ATP, qPCR, Número Mais Provável (NMP), perfilometria óptica e microscopia eletrônica de varredura. Foram montados dois

experimentos, um para testar a ação do coquetel com 24 horas de contato com o biofilme e outro para 48 horas de contato.

Além disso, outros três cupons foram separados para realização de NMP após o período de incubação para a formação do biofilme, de forma a garantir que o inóculo utilizado levou a adesão bacteriana sobre os cupons metálicos.

O tempo de incubação para formação de biofilme foi de 7 dias a 30 °C em anaerobiose. Após esse período, os cupons foram lavados por imersão três vezes em solução salina redutora desaerada (0,124 g/L tioglicolato de sódio, 0,1 g/L ácido ascórbico, 4 mL (m/v) resazurina 0,025%, pH 7,6, preparado em água do mar), para remoção de células não aderidas e inseridos em novas placas contendo 1,8 mL de água do mar estéril desaerada e 200 µl de coquetel fágico para o tratamento ou 200 µl de LB e SM residual para o grupo controle. Os cupons destinados a quantificação do biofilme inicial foram lavados em solução salina redutora e foi feito o NMP conforme descrito na próxima seção.

As placas foram mantidas em anaerobiose a 30°C por mais 24 ou 48 horas. Após o período do experimento, os cupons foram removidos e lavados por imersão em solução salina (para as análises de qPCR, quantificação de ATP e NMP), ou em tampão PBS desaerado (para as análises de perfilometria e MEV). Após lavados, cada cupom foi direcionado às análises específicas, conforme descrito a seguir.

3.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os cupons destinados a MEV, após a lavagem em PBS, foram imediatamente fixados em uma solução de fixação (0,35 g de ácido tânico; 10 mL de PBS; 7,0 mL de Alcian Blue a 1,5% (p/v); 47 mL de paraformaldeído (PFA) a 3,7% (v/v) e 3,5 mL de glutaraldeído 50% (v/v)). O volume final foi ajustado para 70 mL com PBS 1×, resultando em uma solução fixadora contendo 2,5% de PFA, 2,5% de glutaraldeído, 0,5% de ácido tânico e 0,15% de Alcian Blue. Os cupons foram totalmente imersos nessa solução e incubados overnight a 4 °C. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes em PBS 1× (5 minutos cada), seguidas de uma lavagem breve em água destilada (10–20 segundos). A desidratação foi conduzida por imersão sucessiva em etanol a 30%, 50%, 70%, 90%, 95% e 100% (10 minutos cada). Em seguida, procedeu-se à transição para solvente por meio de uma imersão em solução etanol:HMDS (1:1) por 10 minutos, seguida de uma imersão final em HMDS 100% por 10–15 minutos. Após essa etapa, os cupons foram deixados secar naturalmente na capela de exaustão por 30–45 minutos e, posteriormente, armazenados em desumidificador a vácuo contendo sílica até o momento da metalização e análise em MEV.

Para a metalização, os cupons foram montados em stubs utilizando fita dupla face e metalizados com ouro (Quorum® Q150R S). As imagens foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura FEG Jeol IT700 HRLA do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

3.2.4 NÚMERO MAIS PROVÁVEL

Os cupons destinados ao NMP, após lavados, foram colocados em um frasco contendo 13 mL de solução salina redutora desaerada, que foi levado a banho ultrassônico (50–60 Hz; Cristófoli, Brasil) por três ciclos de um minuto e vortexado por 30 segundos, para desprendimento do biofilme. Em seguida, foi realizada a diluição seriada das amostras de cada cupom diluindo 1 ml em frascos contendo 9 ml de solução salina redutora desaerada, até a diluição 10^{-8} . Em seguida, cada diluição foi inoculada em triplicatas de meio BanHT, para quantificação de células heterotróficas totais viáveis, e de meio Postgate E, para quantificação de células viáveis de bactérias redutoras de sulfato. Por fim, os frascos foram incubados por 28 dias a 30°C.

Os resultados foram interpretados de acordo com o método convencional de NMP padronizado para culturas anaeróbias (Petrobras, 2008). Para o cálculo de NMP/mL, considerou-se a maior diluição que apresentou três replicatas positivas, juntamente com as duas diluições subsequentes. O valor obtido foi multiplicado pelo volume de solução salina redutora empregado no processamento da amostra (13 mL). Em seguida, para determinar o NMP/cm², esse resultado foi multiplicado pela área do cupom em centímetros quadrados. Por fim, os dados foram submetidos à análise estatísticas utilizando o software Graphpad Prism (versão 8.0.2).

3.2.5 TESTE DE ATIVIDADE DE BRS

O teste de atividade de BRS foi realizado através da inoculação de 5 mL da amostra em solução salina redutora desaerada, preparada no experimento de NMP, em frascos contendo 45 mL de meio Postgate E. Os frascos foram incubados a 30 °C até a obtenção de resultado positivo, que consiste no escurecimento do meio devido a precipitação de ferro resultante do metabolismo de BRS. O valor de atividade é obtido através da equação:

$$Atividade = \frac{28}{Tempo\ de\ incubação\ (dias)}$$

3.2.6 QUANTIFICAÇÃO DE ATP

A quantificação de ATP presente no biofilme formado sobre os cupons foi realizada utilizando o kit LuminUltra Microbial Monitoring (LuminUltra). Após a lavagem com solução salina redutora desaerada, os cupons foram transferidos para tubos contendo o reagente de extração UltraLyse 7, sendo posteriormente vortexados e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL da mistura foi transferido para o tubo UltraLute, contendo 9 mL de solução, e o tubo foi invertido três vezes. Posteriormente, uma alíquota de 0,1 mL dessa solução foi adicionada a um novo tubo de ensaio contendo 0,1 mL da enzima luciferase, sendo imediatamente inserida no luminômetro PhotonMaster, que quantifica a luz emitida em Unidades Relativas de Luz (RLU).

Os valores de RLU foram convertidos em pg ATP/cm², conforme a equação:

$$tATP(pg\ ATP/cm^2) = \frac{RLU_{tATP}}{RLU_{ATP1}} \times 50,000\ pg\ ATP/A\ cm^2$$

Onde, o RLU_{tATP} é o valor de Unidades Relativas de Luz (RLU) medido pelo luminômetro para a amostra, o RLU_{ATP1} é o valor de RLU obtido a partir do padrão interno ATP1 fornecido pelo kit LuminUltra, 50.000 pg ATP/cm² é o fator de conversão fornecido pelo fabricante, correspondente à quantidade de ATP em picogramas, e A é área analisada em centímetros quadrados.

3.2.7 qPCR

Para a realização do qPCR, os cupons previamente lavados foram inseridos em tubos contendo 5 mL de tampão CTAB (20g g/L CTAB; 51,80 g/L NaCl 1,4M, 12,11 g/L Tus 0,1M; 7,4 g/L EDTA 20 mM) e destinados à extração de DNA conforme o protocolo descrito por Pospiech e Neumann (1995), com adaptações. Inicialmente, foram adicionados 50 µL de uma solução de lisozima (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 mg/mL, seguida de incubação em banho-maria a 37 °C por 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Após esse período, acrescentaram-se 50 µL de proteinase K (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 mg/mL e 500 µL de SDS 10%, mantendo-se a mistura em incubação a 55 °C por 1 hora, com agitação a cada 20 minutos.

Em seguida, foi adicionado um volume igual de fenol (Sigma-Aldrich), realizando-se homogeneização suave. Os cupons metálicos foram então descartados, e a solução centrifugada por 15 minutos a 8.000 × g. A fase orgânica obtida foi transferida para novos tubos contendo igual volume de clorofórmio, sendo novamente centrifugados a 8.000 × g por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para novo tubo, ao qual se adicionou NaCl 5M, seguida da adição de dois volumes de etanol absoluto gelado e centrifugação por 20

minutos a $10.000 \times g$. O precipitado resultante foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspensão em 50 μL de água ultrapura. A quantificação do DNA extraído foi realizada utilizando o Qubit 4 Fluorometer (Thermo-Fisher Scientific).

A quantificação de bactérias totais foi realizada utilizando os primers DSR-1-F-degPJdsr853-R-deg, direcionado ao gene *dsrA*, e 27F518R, para o gene *16S rRNA*. As curvas padrão utilizadas foram construídas a partir de seis pontos de diluição seriada em base 10 (3×10^7 a 3×10^3), preparadas em triplicata.

As reações de qPCR foram conduzidas com o kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), empregando 5 ng de DNA molde por reação, em volume total de 12 μL , e os primers mencionados anteriormente. O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 62 °C por 90 segundos. As análises foram realizadas no equipamento Eco Real-Time PCR (Illumina Inc.). Todas as análises foram realizadas em triplicata, tanto biológica, quanto técnica.

3.2.8 PERFILOMETRIA ÓPTICA

Para a análise de perfilometria óptica, após a lavagem com PBS, os cupons foram fixados em solução de paraformaldeído a 3,7%, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Após a fixação, os cupons foram lavados três vezes por imersão em PBS e deixados secar ao ar. Em seguida, foram armazenados em um desumidificador a vácuo contendo sílica, permanecendo nesse ambiente até o momento da análise.

A caracterização da superfície foi realizada utilizando um perfilômetro óptico 3D (Contour GTK, Bruker), no Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa. Para cada cupom, foram analisadas três regiões distintas e aleatórias da superfície, a fim de garantir representatividade dos resultados.

As imagens obtidas por perfilometria óptica foram analisadas pela média dos valores de R_q , através do software Graphpad Prism (versão 8.0.2).

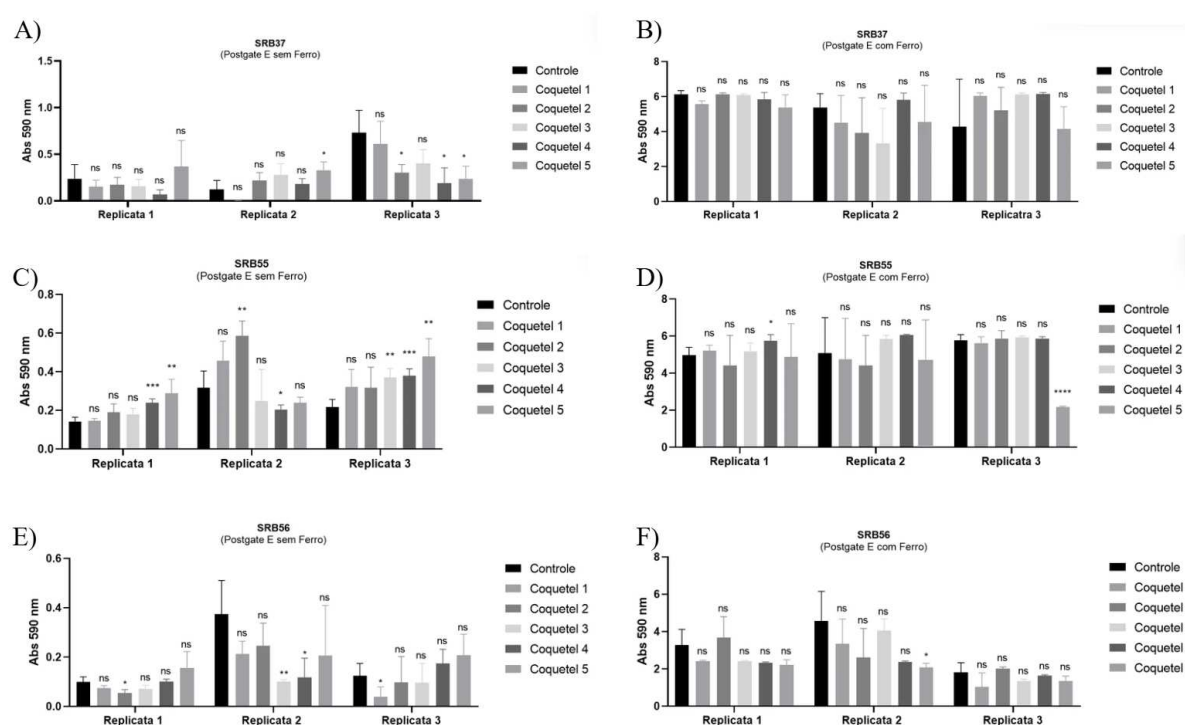
4 RESULTADOS

4.1 CONTROLE DE BIOFILME

O coquetel 1 apresentou redução em apenas uma das replicatas de SRB56 em meio Postgate E sem ferro (Figura 1E). O coquetel 2 promoveu redução do biofilme em uma das replicatas de SRB37 sem ferro (Figura 1A) e SRB56 sem ferro (Figura 1E), porém aumentou

a produção de biofilme em uma das replicatas de SRB55 sem ferro (Figura 1C). O coquetel 3 causou maior produção de biofilme em uma das replicatas de SRB55 sem ferro (Figura 1C) e diminuição para uma das replicatas de SRB56 sem ferro (Figura 1E). O coquetel 4 reduziu o biofilme de uma das replicatas de SRB37, SRB55 e SRB56 sem ferro (Figuras 1A, 1C e 1E, respectivamente), porém aumentou duas das replicatas de SRB55 sem ferro (Figura 1C) e uma das replicatas de SRB55 com ferro (Figura 1D). Por fim, o coquetel 5 reduziu uma das replicatas de SRB37, sem ferro e SRB55 e SRB56 com ferro (Figuras 1A, 1D e 1F, respectivamente), no entanto, aumentou a produção de biofilme de duas das replicatas de SRB55 sem ferro e uma replicata de SRB37 sem ferro (Figuras 1C e 1A, respectivamente).

Figura 1. Quantificação da biomassa total do biofilme de culturas mistas contendo BRS, na presença (coquetel) ou ausência (controle) dos coquetéis fágicos.



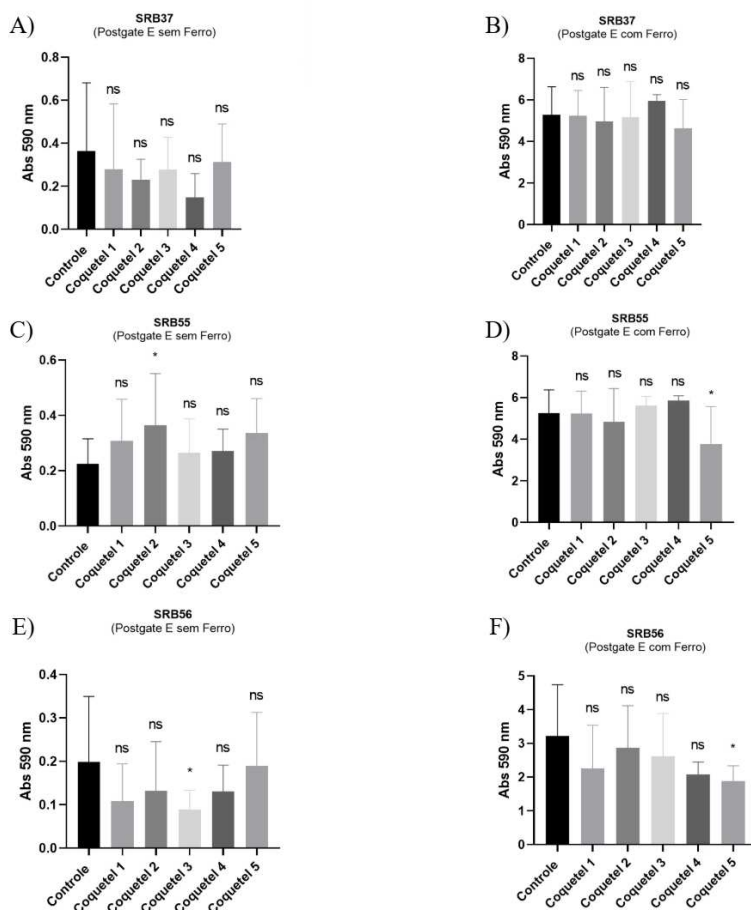
Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o valor em absorbância obtido na leitura do biofilme em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590nm e o eixo X representa cada coquetel nas três replicatas biológicas realizadas. A) Teste feito com a cultura SRB37 em meio sem ferro. B) Teste feito com a cultura SRB37 em meio com ferro. C) Teste feito com a cultura SRB55 em meio sem ferro. D) Teste feito com a cultura SRB55 em meio com ferro. E) Teste feito com a cultura SRB56 em meio sem ferro. F) Teste feito com a cultura SRB56 em meio com ferro. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas obtidas quando comparadas ao controle (ns = não significativo, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$, **** = $P < 0,0001$), (n=3).

A análise dos dados de todas as replicatas biológicas em conjunto (Figura 2), revelou redução no biofilme apenas para os coquetéis 3 e 5, sendo que o coquetel 3 reduziu a cultura

SRB56 em meio sem ferro (Figura 2E) e o coquetel 5 reduziu as culturas SRB55 e SRB56 em meio com ferro (Figuras 2D e 2F, respectivamente). Além disso, o coquetel 2 causou o aumento da produção de biofilme para a cultura SRB55 em meio sem ferro (Figura 2C).

Figura 2: Gráficos de Teste de Controle de Biofilme para os coquetéis 1, 2, 3, 4 e 5.



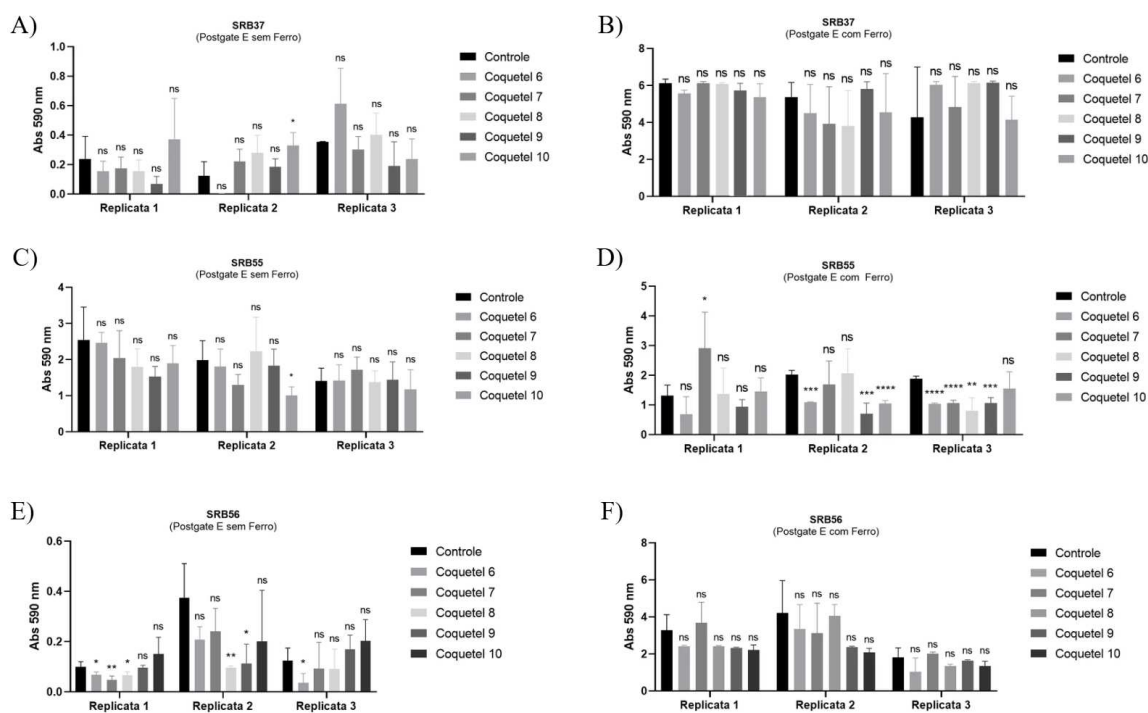
Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o valor em absorbância obtido na leitura do biofilme em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590nm e o eixo X representa a junção das replicatas biológicas de cada coquetel. A) Teste feito com a cultura SRB37 em meio sem ferro. B) Teste feito com a cultura SRB37 em meio com ferro. C) Teste feito com a cultura SRB55 em meio sem ferro. D) Teste feito com a cultura SRB55 em meio com ferro. E) Teste feito com a cultura SRB56 em meio sem ferro. F) Teste feito com a cultura SRB56 em meio com ferro. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas obtidas quando comparadas ao controle (ns = não significativo, * = $P < 0,05$), (n=3).

O coquetel 6 reduziu o biofilme de duas replicatas de SRB56 em meio Postgate E sem ferro e SRB55 com ferro (Figura 3E e 3D, respectivamente). Os coquetéis 7 e 9 reduziram uma das replicatas de SRB56 sem ferro (imagem 3E), porém o coquetel 7 reduziu uma e aumentou outra das replicatas de SRB55 sem ferro, enquanto o coquetel 9 reduziu duas replicatas (Figura 3D). Para o coquetel 8, foi identificada redução em duas replicatas de SRB56 sem ferro (Figura 3E) e uma de SRB55 com ferro (Figura 3D). Por fim, o coquetel 10 causou o

aumento da produção de biofilme em uma replicata de SRB37 sem ferro (Figura 3A) e redução em uma replicata de SRB55 sem ferro e com ferro (Figuras 3C e 3D, respectivamente).

Figura 3: Gráficos de Replicatas Biológicas de Teste de Controle de Biofilme para os coquetéis 6, 7, 8, 9 e 10.

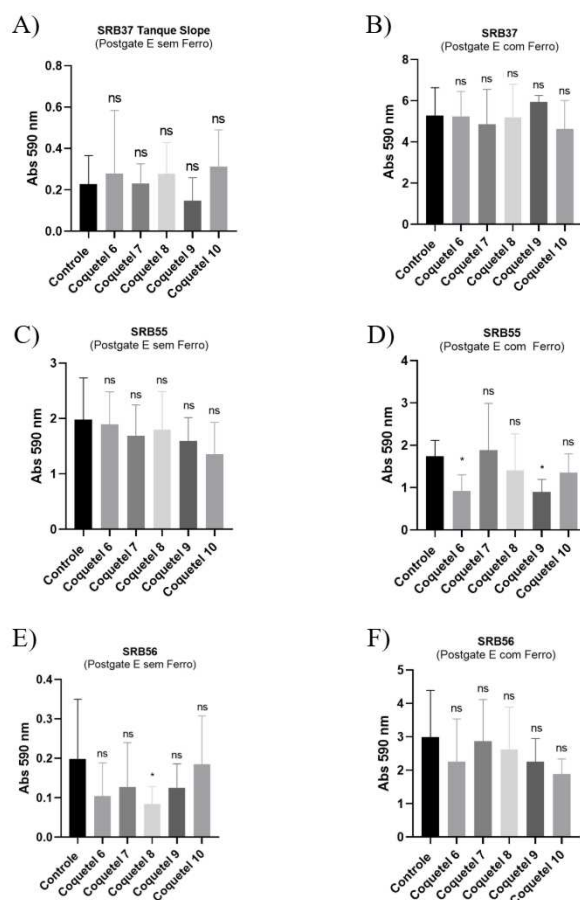


Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o valor em absorbância obtido na leitura do biofilme em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590nm e o eixo X representa cada coquetel nas três replicatas biológicas realizadas. A) Teste feito com a cultura SRB37 em meio sem ferro. B) Teste feito com a cultura SRB37 em meio com ferro. C) Teste feito com a cultura SRB55 em meio sem ferro. D) Teste feito com a cultura SRB55 em meio com ferro. E) Teste feito com a cultura SRB56 em meio sem ferro. F) Teste feito com a cultura SRB56 em meio com ferro. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas obtidas quando comparadas ao controle (ns = não significativo, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$, **** = $P < 0,0001$), (n=3).

A junção dos valores de todas as replicatas biológicas para os coquetéis 6, 7, 8, 9 e 10 (Figura 4), indicou que os coquetéis 6 e 9 tendem a diminuir o biofilme de SRB55 em meio com ferro (Figura 4D) e o coquetel 8 tende a diminuir o biofilme de SRB56 crescida em meio sem ferro (Figura 4E).

Figura 4: Gráficos de Teste de Controle de Biofilme para os coquetéis 6, 7, 8, 9 e 10.

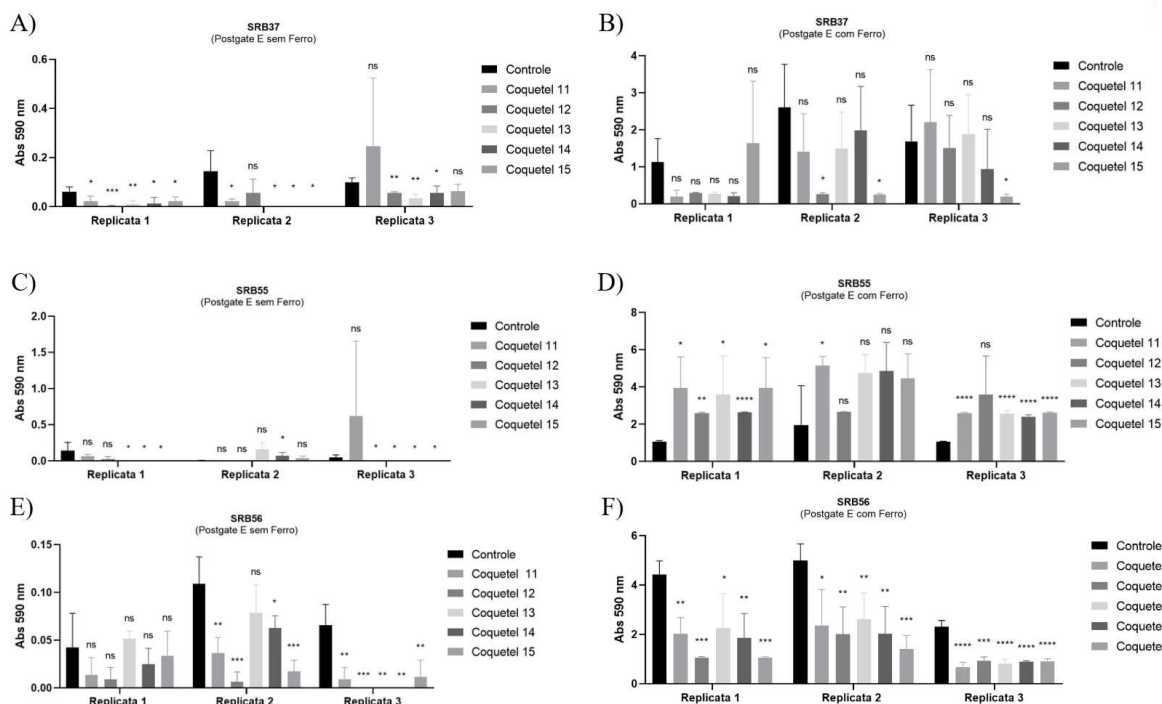


Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o valor em absorbância obtido na leitura do biofilme em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590nm e o eixo X representa a junção das replicatas biológicas de cada coquetel. A) Teste feito com a cultura SRB37 em meio sem ferro. B) Teste feito com a cultura SRB37 em meio com ferro. C) Teste feito com a cultura SRB55 em meio sem ferro. D) Teste feito com a cultura SRB55 em meio com ferro. E) Teste feito com a cultura SRB56 em meio sem ferro. F) Teste feito com a cultura SRB56 em meio com ferro. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas obtidas quando comparadas ao controle (ns = não significativo, * = $P < 0,05$), (n=3).

Os coquetéis 11, 12 e 15 reduziram duas das replicatas biológicas de SRB37 e SRB56 sem ferro (Figuras 5A e 5E, respectivamente). Além disso, o coquetel 12 reduziu uma replicata e o coquetel 15 duas de SRB55 sem ferro (Figura 5C) e SRB37 com ferro (Figura 5B). O coquetel 13 reduziu o biofilme de todas as replicatas de SRB37 sem ferro (Figura 5A), duas replicatas de SRB55 sem ferro (Figura 5C) e uma replicata de SRB56 sem ferro (Figura 5E). O coquetel 14, reduziu o biofilme de todas as replicatas de SRB37 e SRB55 sem ferro (Figuras 5A e 5C, respectivamente) e duas das replicatas de SRB56 sem ferro (Figura 5E). Além disso, todos os coquetéis (11, 12, 13, 14 e 15) reduziram todas as replicatas de SRB56 com ferro (Figura 5F) e aumentaram pelo menos uma das replicatas de SRB55 com ferro (Figura 5D).

Figura 5: Gráficos de Replicatas Biológicas de Teste de Controle de Biofilme para os coquetéis 11, 12, 13, 14 e 15.

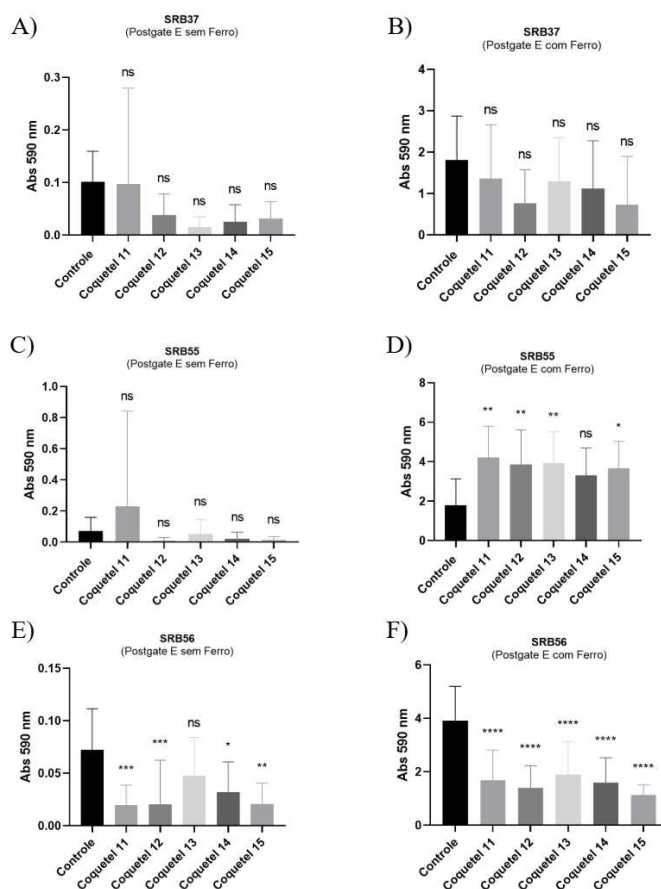


Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o valor em absorbância obtido na leitura do biofilme em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590nm e o eixo X representa cada coquetel nas três replicatas biológicas realizadas. A) Teste feito com a cultura SRB37 em meio sem ferro. B) Teste feito com a cultura SRB37 em meio com ferro. C) Teste feito com a cultura SRB55 em meio sem ferro. D) Teste feito com a cultura SRB55 em meio com ferro. E) Teste feito com a cultura SRB56 em meio sem ferro. F) Teste feito com a cultura SRB56 em meio com ferro. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas obtidas quando comparadas ao controle (ns = não significativo, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$, **** = $P < 0,0001$), (n=3).

O resultado da junção de todas as replicatas biológicas sugere que todos os coquetéis, exceto o 14, tendem a aumentar a produção de biofilme de SRB55 com ferro (Figura 6D). Por outro lado, todos os coquetéis reduziram o biofilme de SRB56 com ferro e sem ferro, com exceção do 13, que só reduziu na presença de ferro (Figuras 6F e 6E, respectivamente).

Figura 6: Gráficos de Teste de Controle de Biofilme para os coquetéis 11, 12, 13, 14 e 15.

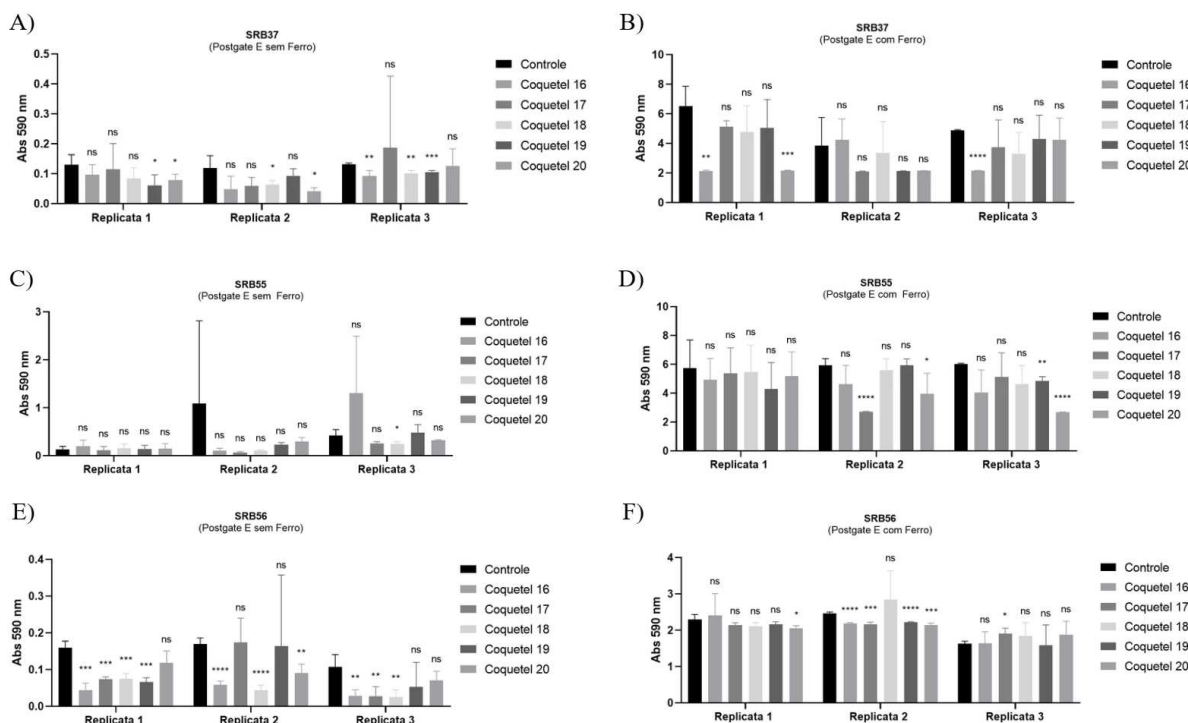


Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o valor em absorvância obtido na leitura do biofilme em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590nm e o eixo X representa a junção das replicatas biológicas de cada coquetel. A) Teste feito com a cultura SRB37 em meio sem ferro. B) Teste feito com a cultura SRB37 em meio com ferro. C) Teste feito com a cultura SRB55 em meio sem ferro. D) Teste feito com a cultura SRB55 em meio com ferro. E) Teste feito com a cultura SRB56 em meio sem ferro. F) Teste feito com a cultura SRB56 em meio com ferro. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas obtidas quando comparadas ao controle (ns = não significativo, * = $P < 0,05$), (n=3).

O resultado dos testes com os coquetéis 16, 17, 18, 19 e 20, resultou na redução do biofilme em uma das replicatas de SRB37 sem ferro, duas de SRB37 com ferro, três replicatas de SRB56 sem ferro e uma de SRB56 com ferro, para o coquetel 16 (Figuras 7A, 7B, 7E e 7F). O coquetel 17 reduziu o biofilme de duas replicatas de SRB56 com e sem ferro e uma replicata de SRB55 com ferro (Figuras 7F, 7E e 7D, respectivamente). Já o coquetel 18 reduziu duas replicatas de SRB37 sem ferro, uma replicata de SRB55 sem ferro e todas as replicatas de SRB56 sem ferro (Figuras 7A, 7C e 7E). O coquetel 19 reduziu duas replicatas de SRB37 sem ferro e uma replicata das culturas SRB56 com e sem ferro e SRB 55 com ferro (Figuras 7A, 7F e 7E, respectivamente). Por fim, o coquetel 20 reduziu duas replicatas dos testes feitos com SRB37 sem ferro e SRB55 e SRB56 com ferro, além de reduzir uma replicata de SRB56 sem ferro SRB 37 com ferro (Figura 1A, 1D, 1F e 1B, respectivamente).

Figura 7: Gráficos de Replicatas Biológicas de Teste de Controle de Biofilme para os coquetéis 16, 17, 18, 19 e 20.

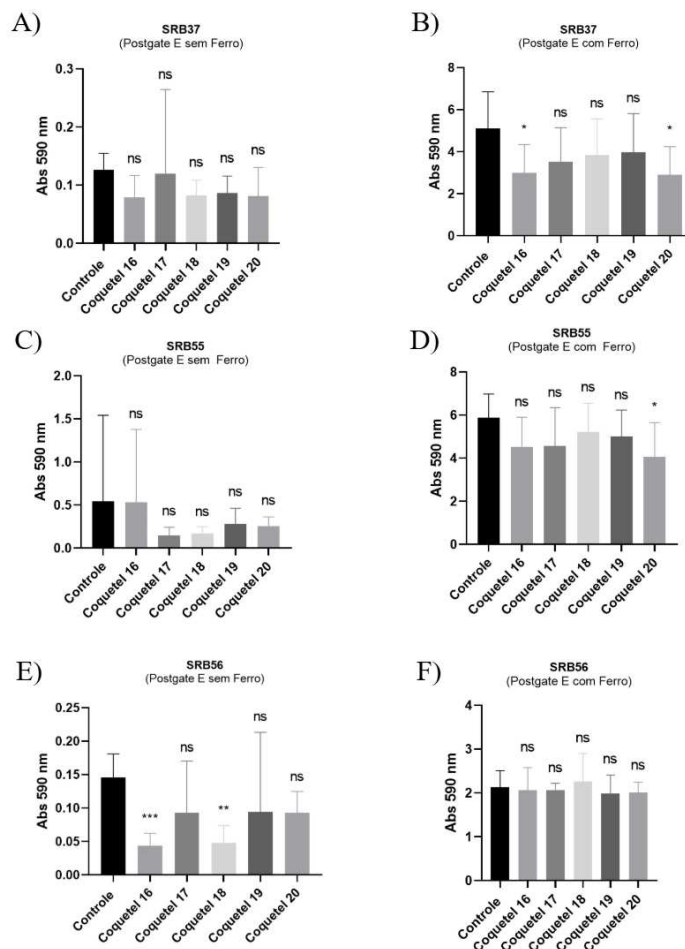


Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o valor em absorvância obtido na leitura do biofilme em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590nm e o eixo X representa cada coquetel nas três replicatas biológicas realizadas. A) Teste feito com a cultura SRB37 em meio sem ferro. B) Teste feito com a cultura SRB37 em meio com ferro. C) Teste feito com a cultura SRB55 em meio sem ferro. D) Teste feito com a cultura SRB55 em meio com ferro. E) Teste feito com a cultura SRB56 em meio sem ferro. F) Teste feito com a cultura SRB56 em meio com ferro. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas obtidas quando comparadas ao controle (ns = não significativo, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$, **** = $P < 0,0001$), (n=3).

A junção dos resultados das replicatas biológicas dos coquetéis 16, 17, 18, 19 e 20 está representada na figura 8. Os resultados sugerem que o coquetel 16 pode reduzir o biofilme de SRB56 sem ferro e SRB37 com ferro, o coquetel 20 pode reduzir o biofilme de SRB 37 e SRB55 com ferro e o coquetel 18 pode reduzir o biofilme de SRB56 sem ferro.

Figura 8: Gráficos de Teste de Controle de Biofilme para os coquetéis 16, 17, 18, 19 e 20.



Fonte: A autora (2026).

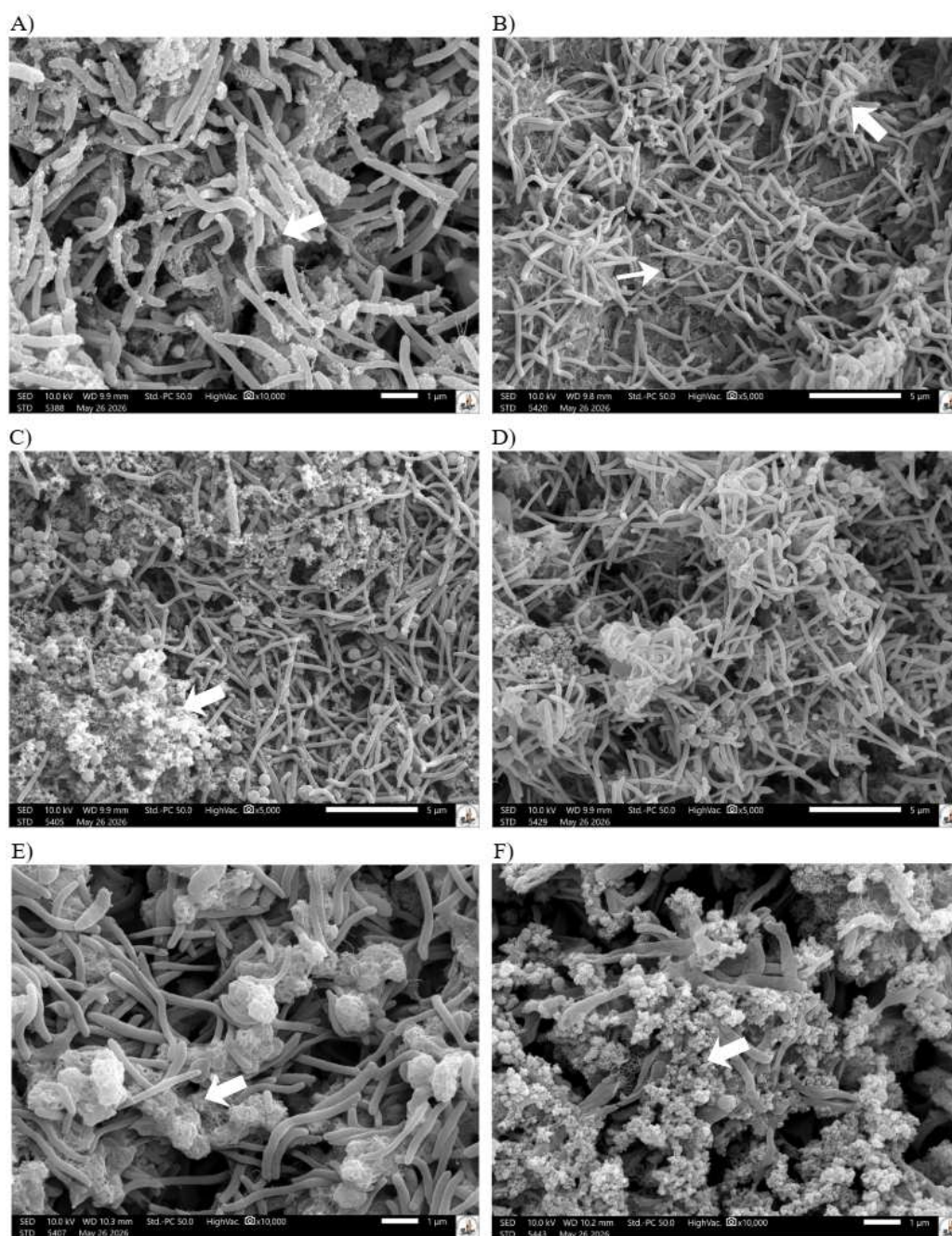
O eixo Y representa o valor em absorvância obtido na leitura do biofilme em espectrofotômetro no comprimento de onda de 590nm e o eixo X representa a junção das replicatas biológicas de cada coquetel. A) Teste feito com a cultura SRB37 em meio sem ferro. B) Teste feito com a cultura SRB37 em meio com ferro. C) Teste feito com a cultura SRB55 em meio sem ferro. D) Teste feito com a cultura SRB55 em meio com ferro. E) Teste feito com a cultura SRB56 em meio sem ferro. F) Teste feito com a cultura SRB56 em meio com ferro. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas obtidas quando comparadas ao controle (ns = não significativo, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$), (n=3).

4.2 TESTE EM CUPONS DE AÇO-CARBONO

4.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise por MEV revelou que a composição do biofilme foi semelhante entre controle e tratamento, com presença de células no formato de cocos, vibriões e bastonetes (Figura 14). Além disso, é possível observar grandes estruturas depositadas ao redor das células, que provavelmente são componentes da camada de EPS (Figura 12C, 12E e 12F).

Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura dos cupons tratados por 24 horas com o coquetel fágico



Fonte: A autora (2026).

A) Primeira replicata do controle, a seta aponta para estruturas filamentosas. B) Primeira replicata do tratamento, a seta maior aponta para estruturas filamentosas e a menor para rachaduras na superfície do cupom. C) Segunda replicata do controle, a seta aponta para prováveis depósitos de EPS. D) Segunda replicata do tratamento. E) Terceira replicata do controle, a seta aponta para prováveis depósitos de EPS. F) Terceira replicata do Tratamento, a seta aponta para prováveis depósitos de EPS.

O resultado da microscopia de 48 horas ainda está em análise.

4.2.2 NÚMERO MAIS PROVÁVEL

O NMP do inóculo em BanHT quantificou $1,40 \times 10^8$ NMP/mL células anaeróbias heterotróficas totais viáveis e o inóculo em Postgate E, $1,10 \times 10^9$ NMP/mL células viáveis de BRS.

O NMP realizado para quantificar as células viáveis do biofilme pré-tratamento está representada na Tabela 2.

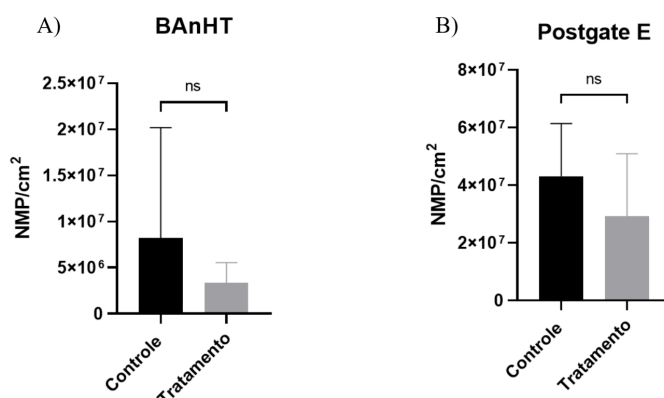
Tabela 2 – NMP/cm² do Biofilme Formado Pré-Tratamento

	BanHT	Postgate E
Replicata 1	$5,37 \times 10^6$	$7,32 \times 10^6$
Replicata 2	$2,10 \times 10^5$	$1,12 \times 10^5$
Replicata 3	$7,32 \times 10^6$	$2,20 \times 10^7$

Fonte: elaborado pelo autor (2026).

O resultado do NMP para o experimento de 24 horas não resultou em diferença significativa entre o controle e tratamento, tanto para bactérias anaeróbias heterotróficas totais (Figura 9A), quanto para bactérias redutoras de sulfato (Figura 9B), apesar de ambos os tratamentos demonstrarem uma tendência a reduzir o número de células viáveis.

Figura 9: Gráficos de NMP/cm² do Tratamento de 24 horas com Coquetel Fágico

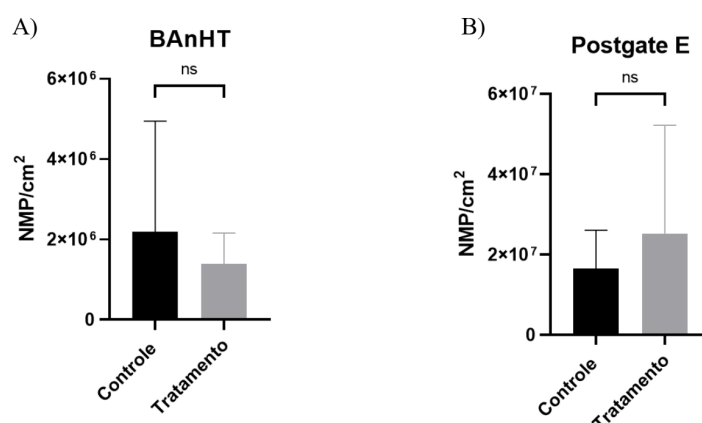


Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o valor, em NMP/cm², da quantificação de células heterotróficas Totais viáveis (A) e células viáveis de Bactérias Heterotróficas Totais (B). No eixo X é representado o controle e o tratamento. Sobre a barra é representada a significância estatística do tratamento quando comparado ao controle (ns = não significativo) (n=3).

O experimento de 48 horas também não resultou em diferença estatística significativa entre tratamento e controle para células anaeróbias heterotróficas totais (Figura 10A) e BRS viáveis (Figura 10B). Também é visível uma tendência em reduzir a quantificação nos tratamentos de 48 horas.

Figura 10: Gráficos de NMP/cm² do Tratamento de 48 horas com Coquetel Fágico



Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o valor, em NMP/cm², da quantificação de células heterotróficas Totais viáveis (A) e células viáveis de Bactérias Heterotróficas Totais (B). No eixo X é representado o controle e o tratamento. Sobre a barra é representada a significância estatística do tratamento quando comparado ao controle (ns = não significativo) (n=3).

4.2.3 ATIVIDADE DE BRS

O resultado do teste de atividade de BRS para o experimento de 24 horas está representado na tabela 3. O tempo, em dias, necessário para obtenção de resultado positivo foi maior em todos os tratamentos, mas o valor da atividade continuou sendo alto.

Tabela 3 – Atividade de BRS para o Tratamento de 24 horas

	C1	C2	C3	T1	T2	T3
Dias	1	1	1	2	2	2
Atividade	28,0	28,0	28,0	14,0	14,0	14,0
Status	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta

Fonte: A autora (2026).

O status é considerado alto se a atividade >4,00, média quando o valor da atividade está entre 1,34 e 4,00 e baixa quando o valor da atividade é ≤ 4,00.

Já no experimento de 48 horas, o tempo para obtenção de resultado positivo foi menor para todos os tratamentos e uma replicata do controle, gerando um valor de atividade mais alto. As replicatas 1 e 2 do controle, apesar de apresentarem um menor valor de atividade, este continuou sendo alto.

Tabela 4 – Atividade de BRS para o Tratamento de 48 horas

	C1	C2	C3	T1	T2	T3
Dias	2	2	1	1	1	1
Atividade	14,0	14,0	28,0	28,0	28,0	28,0
Status	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta

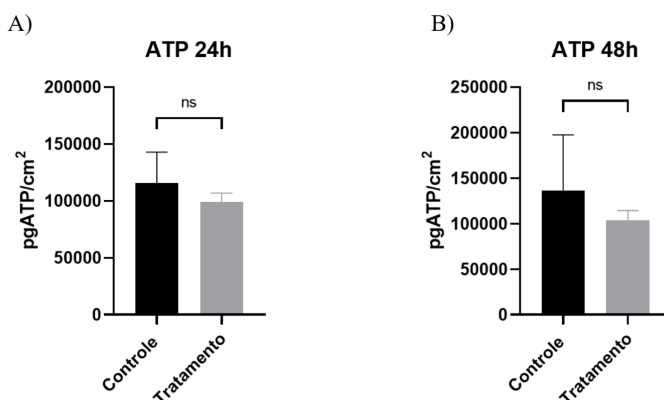
Fonte: A autora (2026).

O status é considerado alto se a atividade >4,00, média quando o valor da atividade está entre 1,34 e 4,00 e baixa quando o valor da atividade é ≤ 4,00.

4.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE ATP

Não houve diferença estatística significativa entre controle e tratamento para ambos os períodos testados (Figura 11). Entretanto, a quantificação de ATP foi menor para os tratamentos.

Figura 11: Gráficos de Quantificação de ATP



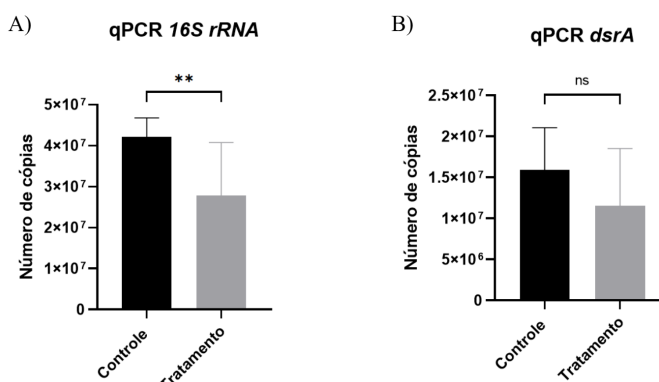
Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o valor, em pgATP/cm², da quantificação ATP para o tratamento com 24 horas de coquetel (A) e 48 horas de coquetel (B). No eixo X é representado o controle e o tratamento. Sobre a barra é representada a significância estatística do tratamento quando comparado ao controle (ns = não significativo) (n=3).

4.2.5 qPCR

O resultado do qPCR do tratamento de 24 horas resultou numa redução no número de cópias do gene *16S rRNA*, utilizado para quantificar bactérias totais (Figura 12A). Porém, não foi detectada significância estatística para a redução obtida no número de cópias do gene *dsrA* (Figura 12B).

Figura 12: qPCR dos genes *16S rRNA* e *dsrA* para o tratamento de 24 horas

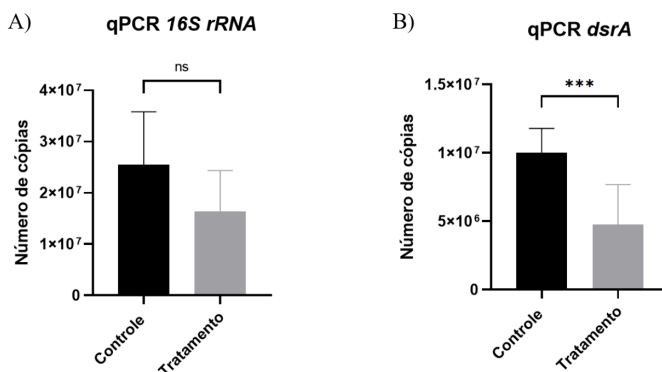


Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o número de cópias de cada gene e o eixo X representa o controle e o tratamento. A) Quantificação do gene 16S rRNA para o tratamento de 24 horas. B) Quantificação do gene dsrA para o tratamento de 24 horas. Sobre a barra é representada a significância estatística do tratamento quando comparado ao controle (ns = não significativo, ** = P < 0,01) (n=3).

Já no tratamento de 48 horas, foi observado o contrário. Não houve valor estatístico na redução obtida para o número de cópias do gene *16S rRNA* no tratamento (Figura 13A). Porém, o número de cópias do gene *dsrA* reduziu significativamente no tratamento (Figura 13B).

Figura 13: qPCR dos genes *16S rRNA* e *dsrA* para o tratamento de 48 horas



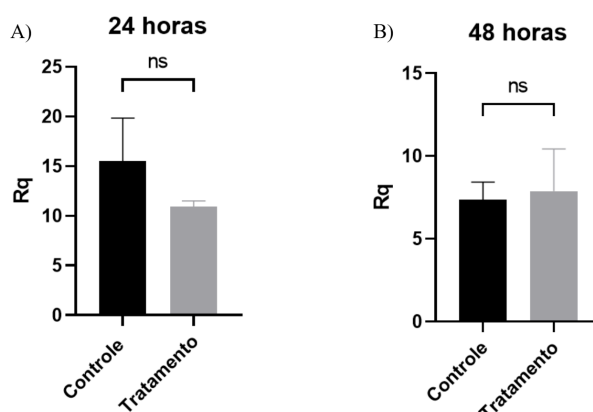
Fonte: A autora (2026).

O eixo Y representa o número de cópias de cada gene e o eixo X representa o controle e o tratamento. A) Quantificação do gene *16S rRNA* para o tratamento de 48 horas. B) Quantificação do gene dsrA para o tratamento de 48 horas. Sobre a barra é representada a significância estatística do tratamento quando comparado ao controle (ns = não significativo, *** = P < 0,001) (n=3).

4.2.6 PERFILOMETRIA ÓPTICA

O resultado da análise das médias dos valores de Rq não resultou em diferenças estatisticamente significativas entre controle e tratamento nos experimentos de 24 e 48 horas (Figura 14).

Figura 14: Valores de Rq obtidos por Perfilometria Óptica



Fonte: A autora (2026)

O eixo Y representa valor de Rq (rugosidade quadrática média) e o eixo X representa o controle e o tratamento. A) Tratamento de 24 horas com o coquetel. B) Tratamento de 48 horas com o coquetel.

5 DISCUSSÃO

5.1 CONTROLE DE BIOFILME

Este trabalho empregou o método de coloração por cristal violeta para quantificação de biofilmes, uma estratégia amplamente utilizada na área (Poniatovsky et al., 2025; Islam et al., 2019), embora apresente limitações conhecidas. A principal delas é o elevado desvio padrão dos resultados, decorrente do grande número de variáveis envolvidas no procedimento, o que dificulta interpretações mais precisas (Wilson et al., 2017). No presente estudo, observou-se que todas as análises apresentaram desvios padrão relativamente altos (Figuras 1 a 8). Ressalta-se, contudo, que outro fator potencial para essa variabilidade é o uso de culturas mistas, que tendem a formar biofilmes heterogêneos entre replicatas, devido às diferentes proporções de microrganismos presentes em cada inóculo.

Outro desafio associado ao trabalho com culturas de BRS é a compreensão limitada do processo de formação de biofilmes. Sabe-se que um fator que pode influenciar o estabelecimento de biofilmes é a presença de uma fonte de ferro, pois o ferro desempenha papel fundamental no metabolismo de BRS e microrganismos associados (Javed, Neil e Wade, 2024), mas outros compostos podem ter efeito semelhante, favorecendo ou inibindo a formação de biofilmes, dependendo da composição microbiana local. Considerando isso, a menor formação de biofilme no controle de alguns testes realizados sem a adição de ferro (Figuras 1A, 1B, 1C, 3A, 5A, 5C, 7A, 7C e 7E), pode ser explicada por essa dependência. Assim, confirma-se que a presença de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ contribui para o estabelecimento de biofilmes mais densos em culturas de BRS.

Além disso, as diferenças na composição dos biofilmes entre replicatas também podem ter influenciado os resultados, visto que a maioria dos coquetéis apresentou ação apenas em parte das replicatas (Figuras 1A, 1C, 1D, 1E, 1F, 3A, 3C, 3D, 3E, 5A, 5B, 5C, 5D, 7A, 7B, 7C, 7D, 7E e 7F). Uma explicação plausível é que as enzimas dos fagos presentes nesses coquetéis sejam eficazes contra o biofilme formado por determinadas combinações microbianas, mas não por outras. Para mitigar esse tipo de variabilidade, recomenda-se a realização de testes também com culturas isoladas de BRS. Assim, ao identificar quais bactérias são sensíveis a cada coquetel ou fago específico, torna-se possível direcionar tratamentos com base na composição do biofilme alvo.

Outro ponto relevante é que alguns coquetéis induziram aumento na formação de biofilme (Figuras 1A, 1C, 1D, 3A, 3D, 5D e 7F). Conforme discutido por Mgomi et al. (2022), a presença de fagos pode estimular a formação de determinados biofilmes, sendo essa interação ainda mais complexa em biofilmes mistos. Portanto, investigações adicionais são necessárias para elucidar como ocorre a interação entre fagos e os componentes desses biofilmes.

Tendo em vista a heterogeneidade dos resultados obtidos, foi considerada a junção de todas as replicatas biológicas para determinar se um coquetel tem ou não efeito na redução do biofilme das culturas testadas e selecionar o coquetel mais efetivo para prosseguimento com testes em cupons. A escolha levou em consideração coquetéis que foram capazes de reduzir o biofilme de SRB37 com ferro, visto que ela é a cultura padrão utilizada, e pelo menos uma das outras duas culturas com ferro. Portanto, o único coquetel que se enquadrava nessas condições, o coquetel 20 (Figura 8), foi o selecionado.

5.2 TESTE EM CUPONS DE AÇO-CARBONO

5.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise por microscopia eletrônica de varredura apresenta caráter qualitativo, não fornecendo dados quantitativos. Na comparação entre as amostras controle e tratamento, não foram observadas diferenças significativas na estrutura ou na composição celular do biofilme. Esse resultado difere do observado por Carmo (2019), que verificou redução visual do biofilme após tratamento com um bacteriófago inespecífico para BRS, em relação ao controle.

Além disso, foram identificados prováveis depósitos de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (Figuras 14C, 14E e 14F), estruturas fundamentais para a adesão e formação do biofilme sobre a superfície dos cupons (Dos Santos, 2022). A maioria das células

apresentou morfologia do tipo bastonete e vibrião, com alguns cocos, padrão característico de culturas de bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Dos Santos, 2022).

Também foi possível observar a presença de filamentos entre as células bacterianas (Figuras 14A e 14B). Segundo Vieira (2022), esses filamentos podem estar relacionados à resposta celular à presença do coquetel fágico. Entretanto, no presente trabalho, tais estruturas foram observadas tanto nas amostras controle (Figura 14A), quanto nas tratadas com coquetel (Figura 14B). Assim, é mais provável que a formação desses filamentos represente uma característica comum dos biofilmes, e não esteja associada à indução de resistência pelo coquetel.

Outro fenômeno observado foi a presença de rachaduras na superfície dos cupons (Imagem 14B). Segundo Vieira (2022), isso ocorre devido ao processo de desidratação alcoólica que o cupom é submetido para a análise microscópica. Por outro lado, Carmo (2019) sugere que tais formações podem estar relacionadas ao craqueamento decorrente da exposição do material a ambientes ácidos, provocados pelo excesso de H_2S .

5.2.2 NÚMERO MAIS PROVÁVEL

O método de Número Mais Provável (NMP) permitiu a estimativa da carga celular viável de BRS e heterotróficas totais presente nos biofilmes. A quantificação pré-tratamento (Tabela 2) confirmou a formação robusta de biofilme nos cupons de aço-carbono, validando a eficácia do protocolo experimental em estabelecer uma comunidade microbiana densa, com contagens na ordem de 10^6 a 10^7 NMP/cm².

Nos experimentos de 24 e 48 horas, embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa entre o controle e o tratamento (Figuras 9 e 10), verificou-se uma tendência de redução na contagem de células viáveis nos cupons submetidos ao coquetel fágico. Vieira (2022) observou redução pelo coquetel fágico apenas após 38 dias de ensaio, o que sugere que o tempo de exposição empregado neste estudo pode ter sido insuficiente para promover uma desestabilização completa do biofilme. Assim, é provável que o coquetel tenha atuado predominantemente sobre as camadas superficiais, sem desestabilizar completamente as populações bacterianas protegidas no interior da camada de EPS.

5.2.3 TESTE DE ATIVIDADE DE BRS

O teste de atividade de BRS, baseado no escurecimento do meio devido à produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), é um indicador qualitativo da atividade metabólica dessas bactérias. No experimento de 24 horas, observou-se que o tempo necessário para a detecção

de atividade positiva foi maior nas amostras tratadas (2 dias) em comparação ao controle (1 dia), indicando uma possível inibição metabólica inicial provocada pelo coquetel fágico. No entanto, apesar desse retardo, o índice de atividade foi classificado como alto para ambos os grupos. No experimento de 48 horas, não foi observada diferença no tempo de resposta, mantendo-se o status de atividade alta.

A persistência de alta atividade de BRS, mesmo no tratamento, provavelmente está relacionada à grande quantidade de H_2S produzida. Esse resultado corrobora a hipótese de que a grande quantidade de H_2S ajudou a causar as rachaduras observadas na superfície do cupom (Figura 14 B).

5.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE ATP

A quantificação de ATP é uma estratégia utilizada para avaliar a viabilidade metabólica em uma comunidade microbiana. No presente estudo, a análise de ATP nos cupons de aço-carbono revelou uma tendência de redução nos valores de pgATP/cm² após o tratamento com o coquetel fágico 20, tanto após 24 quanto 48 horas de exposição (Figura 11).

Embora a redução observada não tenha atingido significância estatística, o tratamento de 24 horas reduziu cerca de 14% e o de 48 horas, cerca de 24%. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Vieira (2022), em que o coquetel testado reduziu cerca de 25% do valor de pgATP/cm² em comparação com o controle. Vale ressaltar que o experimento de Vieira (2022) foi realizado em tanque pelo período de 38 dias, portanto, acredita-se que um maior período de tratamento gere maior redução do metabolismo microbiano.

5.2.5 qPCR

A técnica de qPCR foi empregada para avaliar o impacto do tratamento fágico sobre a carga gênica total (16S rRNA) e sobre a população específica de bactérias redutoras de sulfato (gene *dsrA*), que representam o alvo principal de interesse para o controle da corrosão.

No tratamento de 24 horas, observou-se uma redução nas cópias do gene 16S rRNA (Figura 12), indicando uma diminuição na carga microbiana total. Contudo, a redução no gene *dsrA* não apresentou significância estatística neste intervalo. Esse resultado sugere que, embora o coquetel fágico tenha iniciado a interação com a comunidade microbiana, reduzindo a carga total, o efeito específico de lise sobre as BRS ainda era incipiente. O tempo de 24 horas pode ter sido suficiente apenas para a adsorção inicial e infecção parcial, sem que houvesse tempo suficiente para penetração das partículas virais no interior do biofilme

Por outro lado, no tratamento de 48 horas, o cenário foi distinto. A redução significativa no gene *dsrA* (Figura 13) confirmou que o coquetel fágico foi efetivo em atingir o alvo específico. O fato de o gene 16S rRNA não ter mantido a mesma significância de redução pode indicar que, após 48 horas, a comunidade microbiana geral recuperou-se. A disparidade entre os tempos de 24 e 48 horas reforça a dependência temporal da eficácia dos fagos em biofilmes.

5.2.6 PERFILOMETRIA ÓPTICA

A análise de perfilometria óptica foi empregada com o objetivo de avaliar a rugosidade superficial do biofilme, fornecendo um indicativo da degradação da camada EPS pelo coquetel fágico. Os resultados obtidos após 24 e 48 horas de exposição ao coquetel fágico 20 não revelaram diferenças estatisticamente significativas nos valores de Rq entre o grupo controle e o tratamento (Figura 14).

A ausência de alteração na rugosidade pode ser atribuída, primordialmente, ao curto período de exposição aos fagos. Além disso, como observado nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a persistência de uma matriz de biofilme sobre os cupons, mesmo no tratamento, corrobora essa hipótese.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade de considerar que o tratamento fágico, isoladamente, pode não ser suficiente para a erradicação total de biofilme mistos de BRS, especialmente em períodos curtos de exposição. Abordagens combinadas como o uso de fagos em conjunto com agentes químicos ou físicos poderiam ser mais eficazes para redução do biofilme e, consequentemente, mitigar o risco de corrosão em ambientes operacionais.

REFERÊNCIAS

- AMENDOLA, Roberta; ACHARJEE, Amit. Microbiologically influenced corrosion of copper and its alloys in anaerobic aqueous environments: a review. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 806688, 2022.
- ASHRAF, Muhammad Aqeel et al. Green biocides, a promising technology: current and future applications to industry and industrial processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 94, n. 3, p. 388-403, 2014.

CARMO, Adrielle Jéssica do. Influência do fago vB_EcoM-UFV13 no biofilme formado pelo consórcio P48SEP. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Dias. Tese (mestrado em microbiologia agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2019.

CUNHA, Paloma Cavalcante. Proposição de um coquetel fágico para controle de biofilmes de bactérias redutoras de sulfato em ambientes relacionados à indústria de óleo e gás. Orientador: Roberto Sousa Dias. Tese (mestrado em microbiologia agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2021.

DOS SANTOS, Josenilda Carlos et al. Characterization of the biofilm structure and microbial diversity of sulfate-reducing bacteria from petroleum produced water supplemented by different carbon sources. *Journal of environmental management*, v. 304, p. 114189, 2022.

ETIM, Ini-Ibehe N. et al. Microbiologically influenced corrosion: a concern for oil and gas sector in Africa. *Chemistry Africa*, v. 6, n. 2, p. 779-804, 2023.

HALLBECK, Lotta; PEDERSEN, Karsten. Bacteriophage Lytic to Desulfovibrio aespoensis Isolated from Deep Groundwater. *The ISME Journal*, v. 3, n. 10, p. 1139–1147, 2009. DOI: 10.1038/ismej.2009.63.

HUSAIN, Fohad Mabood et al. Bacteriophages and Their Enzymes: Allies Against Microbial Biofilms. *Pharmaceuticals*, v. 18, n. 12, p. 1771, 2025. DOI: 10.3390/ph18121771.

INSTITUTO BRASILEIRO DE PETRÓLEO E GÁS. Relatório Anual de Desempenho da Indústria de Petróleo e Gás. Rio de Janeiro: IBP, 2025.

ISLAM, Md Sharifull et al. Application of a phage cocktail for control of Salmonella in foods and reducing biofilms. *Viruses*, v. 11, n. 9, p. 841, 2019.

JAVAHERDASHTI, Reza. Microbiologically Influenced Corrosion (MIC). In: *Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies*. Amsterdam: Elsevier, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-44306-5

JAVED, M. A.; NEIL, W. C.; WADE, S. A. Effect of ferrous sulfate treatment on microbially influenced corrosion of CuNi 70/30 marine pipeline alloy by sulfate reducing bacteria. *Environmental Science: Water Research & Technology*, v. 10, n. 10, p. 2597-2614, 2024.

KUTTER, Elizabeth; SULAKVELIDZE, Alexander. Bacteriophages: biology and applications. Crc press, 2004.

LI, Yuansong et al. Efficacy of a bacteriophage cocktail targeting pathogenic bacteria associated with gastrointestinal dysfunction. *bioRxiv*, p. 2025.10. 03.680221, 2025. DOI: 10.1101/2025.10.03.680221.

LIU, Pan et al. Microbially influenced corrosion of steel in marine environments: a review from mechanisms to prevention. *Microorganisms*, v. 11, n. 9, p. 2299, 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11092299.

MGOMI, Fedrick C. et al. Bacteriophages: A weapon against mixed-species biofilms in the food processing environment. *Journal of Applied Microbiology*, v. 133, n. 4, p. 2107-2121, 2022.

NATIONAL ASSOCIATION OF CORROSION ENGINEERS. Cost of corrosion in mining industry: collect quality data for effective decision-making. Houston: NACE International, 2025.

ORGANIZAÇÃO DOS PAÍSES EXPORTADORES DE PETRÓLEO (OPEP). World Oil Outlook 2026. Viena: OPEC Secretariat, 2026.

PAPAVINASAM, Sankara. Corrosion control in the oil and gas industry. Elsevier, 2013.

PROCÓPIO, L. Bacteriófagos como Alternativa Biotecnológica para Controle de Biofilmes. Anais do CONIC-Semesp, São Paulo, 2022.

PETROBRAS. Regras e planilhas para o cálculo do Número Mais Provável (NMP). CT BTA 007/2008. CENPES/PDEDS/BTA. Rio de Janeiro, 2008.

PONIATOVSKYI, Vadym et al. Efficacy of Phage Cocktails Against Biofilms Formed by Antibiotic-Resistant Bacteria. *Infection and Drug Resistance*, p. 5789-5799, 2025.

TANG, Kimberley; BASKARAN, Vikrama; NEMATI, Mehdi. Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, n. 1, p. 73-94, 2009.

VIEIRA, Marcella Silva. 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. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Dias. Tese (mestrado em microbiologia agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2022.

WILSON, Christina et al. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: a mini-review. Research & reviews. *Journal of engineering and technology*, v. 6, n. 4, p. <http://www.royj.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-mini-review-.pdf>, 2017

ZHANG, Guangming et al. Bacteriophage application in inhibiting corrosion-producing bacteria. *BMC microbiology*, v. 25, n. 1, p. 241, 2025.