

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Desenvolvimento de coquetéis fágicos inespecíficos para o controle de
biofilme produzido por bactérias redutoras de sulfato**

Diana Layla Lemos Santos
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

DIANA LAYLA LEMOS SANTOS

**Desenvolvimento de coquetéis fágicos inespecíficos para o controle de
biofilme produzido por bactérias redutoras de sulfato**

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

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

T

S237d
2026

Santos, Diana Layla Lemos, 2000-

Desenvolvimento de coquetéis fágicos inespecíficos para o controle de biofilme produzido por bactérias redutora de sulfato / Diana Layla Lemos Santos. – Viçosa, MG, 2026.

1 dissertação eletrônica (70 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2026.

Referências bibliográficas: f. 65-70.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.444>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bacteriófagos. 2. Biofilmes - Controle biológico.
3. Indústria petrolífera. I. Paula, Sérgio Oliveira de, 1976-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.
III. Título.

CDD 22. ed. 579.26

DIANA LAYLA LEMOS SANTOS

**Desenvolvimento de coquetéis fágicos inespecíficos para o controle de
biofilme produzido por bactérias redutoras de sulfato**

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: 8 de maio de 2026.

Assentimento:

Diana Layla Lemos Santos
Autora

Sergio Oliveira de Paula
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 30/07/2026 às 19:33:37 e pelo orientador em 30/07/2026 às 19:42:53. 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 **5IO9.MKF9.P9PL** e clique no botão 'Validar documento'.

A Deus, meus pais, irmãos, amor e amigos que me mantiveram forte até aqui.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todos, agradeço a Deus, que me sustentou, capacitou e guiou durante toda esta caminhada. Sem Ele, nada eu seria. Sou grata pela sabedoria concedida, pela força nos momentos difíceis e por ter me segurado quando pensei que não conseguiria continuar.

Aos meus pais, Débora e Ronaldo, agradeço de todo o coração por todo amor, apoio e cuidado. Obrigada por ouvirem meus choros, minhas inseguranças e meus desabafos, e por sempre me lembrarem de que eu sou capaz de muito mais do que imagino. Vocês sempre mantiveram minha autoestima lá no alto e foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Amo muito vocês. Ao meu irmão Rhyann, obrigada por sempre me apoiar e por estar disposto a me ajudar sempre que precisei, bebezinho. Ao meu irmão Diego, agradeço por abrir caminhos e me fazer acreditar que somos capazes de realizar aquilo que desejamos. Obrigada tia Lili por todas as orações. Minha família, esta conquista não é só minha, é por todos vocês.

Às minhas amigas Thaina e Maria Eduarda, agradeço por estarem sempre ao meu lado, mesmo à distância, me apoiando, aconselhando e ouvindo tudo o que eu tinha a dizer. Vocês são presentes de Deus na minha vida, meninas super poderosas. A José, Charles e Maria Vitória, obrigada por compartilharem comigo tantas experiências em Viçosa e por tornarem essa caminhada mais leve, divertida e, às vezes, caótica, mas de um jeito bom. Nada teria a mesma graça sem vocês. Agradeço também a todos os amigos que estiveram presentes nessa jornada, em especial Ayeska e Maria Cecília, minhas divas inspiradoras. Obrigada, meus amigos, vocês são incrivelmente especiais.

Ao meu amor, Victor, que desde o comecinho me acompanhou durante todo esse caminho, agradeço por suportar meus dias ruins, que não foram poucos, e por comemorar comigo cada pequena vitória. Obrigada por estar ao meu lado, por me dar forças e por me ajudar a aguentar cada momento. Ufa, conseguimos, amor. Esta conquista é nossa.

Ao meu orientador, professor Sérgio Oliveira de Paula, agradeço pela oportunidade e o convite de fazer parte do seu laboratório e por me apresentar ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. Você foi essencial para hoje eu pudesse escrever esta dissertação.

Aos meus colegas de laboratório, agradeço pela ajuda. Em especial, à Adrielle, por ter me ensinado tanto durante o mestrado e por todo o suporte oferecido. Agradeço também à Luciana e à Paloma, pelos conselhos, apoio e disponibilidade quando precisei. Ao Igor, minha gratidão por toda ajuda em diversos momentos e por ter sido essencial

para que este trabalho saísse do papel.

Sou grata à Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade e pela honra de fazer parte desta instituição. Agradeço também ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela disponibilidade, suporte técnico e contribuição fundamental para a realização das análises de microscopia eletrônica desenvolvidas neste trabalho. E ao professor Sukarno Olavo Ferreira, do Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da UFV, pela colaboração, auxílio durante as análises, que foram essenciais para a obtenção dos resultados apresentados nesta dissertação. Expresso minha sincera gratidão a todos os profissionais envolvidos, que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste estudo.

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).

“Ver um sonho realizado só depende de você”.
(Walt Disney)

RESUMO

SANTOS, Diana Layla Lemos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2026. **Desenvolvimento de coquetéis fágicos inespecíficos para o controle de biofilme produzido por bactérias redutoras de sulfato**. Orientador: Sergio Oliveira de Paula.

A corrosão influenciada por microrganismos (CIM) representa um problema relevante na indústria do petróleo, estando diretamente associada à atividade de bactérias redutoras de sulfato (BRS), que formam biofilmes e produzem sulfeto de hidrogênio (HS), um composto tóxico e corrosivo. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar coquetéis fágicos inespecíficos como estratégia alternativa aos métodos convencionais para o controle de biofilmes formados por culturas mistas de BRS, como o uso de biocidas químicos. Inicialmente, bacteriófagos com alta performance lítica, previamente isolados, foram selecionados e utilizados na formulação de três coquetéis distintos, os quais foram avaliados em ensaios de prevenção e degradação de biofilmes em placas de 96 poços por meio da quantificação da biomassa utilizando a técnica cristal violeta. Com base nesses resultados, o coquetel mais eficiente foi selecionado para ensaios em sistema de tanques piloto, simulando condições industriais. Nessa etapa, o delineamento experimental foi direcionado exclusivamente para o controle de biofilmes previamente estabelecido, uma vez que, em ambientes industriais, essas estruturas já se encontram formadas. O experimento foi conduzido em tanques pilotos, ao longo de 28 dias, com aplicação do coquetel fágico nos dias 7, 14 e 21, após período inicial destinado à formação do biofilme em cupons de aço carbono. A eficácia do tratamento foi avaliada por meio do monitoramento do crescimento microbiano por densidade óptica medida a 600 nm (DO), produção de HS, quantificação de células viáveis por Número Mais Provável (NMP), análise molecular por Quantitative Real-Time (qPCR), atividade metabólica do biofilme (ATP), além de análises estruturais por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e perfilometria óptica, e avaliação da corrosão por perda de massa e taxa de corrosão dos cupons metálicos. Os resultados indicaram redução na biomassa do biofilme em placas de 96 poços, na atividade metabólica microbiana e na produção de HS nos sistemas tratados, além de menor intensidade de corrosão em comparação ao controle. As análises estruturais evidenciaram desorganização do biofilme no sistema tratado. Embora algumas variáveis não tenham apresentado diferença estatística significativa, os dados demonstram o potencial biotecnológico do uso de coquetéis fágicos inespecíficos como estratégia

complementar no controle da CIM em sistemas industriais.

Palavras-chave: sulfeto de hidrogênio; bacteriófagos; tanques pilotos; culturas mistas; biomassa aderida; corrosão influenciada por microrganismos

ABSTRACT

SANTOS, Diana Layla Lemos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2026.
Development of non-specific phage cocktails for the control of biofilms produced by sulfate-reducing bacteria
. Adviser: Sergio Oliveira de Paula.

Microbiologically influenced corrosion (MIC) represents a significant problem in the oil industry and is directly associated with the activity of sulfate-reducing bacteria (SRB), which form biofilms and produce hydrogen sulfide (HS), a toxic and corrosive compound. In this context, the present study aimed to develop and evaluate non-specific phage cocktails as an alternative strategy to conventional methods, such as the use of chemical biocides, for the control of biofilms formed by mixed cultures of SRB. Initially, bacteriophages with high lytic performance, previously isolated, were selected and used to formulate three distinct cocktails, which were evaluated in prevention and degradation assays of biofilms in 96-well plates by quantifying biomass using the crystal violet staining method. Based on these results, the most effective cocktail was selected for experiments in a pilot-scale tank system simulating industrial conditions. At this stage, the experimental design focused exclusively on the control of pre-established biofilms, since in industrial environments these structures are already formed. The experiment was conducted over 28 days, with application of the phage cocktail on days 7, 14, and 21, following an initial period for biofilm formation. Treatment efficacy was assessed through monitoring microbial growth by optical density at 600 nm (OD), HS production, quantification of viable cells by the most probable number (MPN) method, molecular analysis by qPCR, biofilm metabolic activity (ATP), as well as structural analyses by scanning electron microscopy (SEM) and optical profilometry, and corrosion evaluation through mass loss and corrosion rate of metal coupons. The results indicated a reduction in biofilm biomass, microbial metabolic activity, and HS production in treated systems, in addition to a lower corrosion intensity compared to the control. Structural analyses revealed biofilm disorganization in the treated system. Although some variables did not show statistically significant differences, the data demonstrate the biotechnological potential of non-specific phage cocktails as a complementary strategy for the control of MIC in industrial systems.

Keywords: sulfate-reducing bacteria; biofilm.; bacteriophages;

microbiologically influenced corrosion; pilot-scale tanks

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática das etapas de formação e desenvolvimento do biofilme bacteriano, incluindo a adesão inicial reversível, adesão irreversível, maturação com produção de matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e dispersão celular.....	23
Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental adotado neste estudo, indicando as etapas de ensaios em bancada e em tanques piloto, bem como a organização dos grupos controle e tratamento com aplicação do coquetel fágico.....	27
Figura 3. Placa de 96 poços utilizada para a quantificação da biomassa de biofilme por coloração com cristal violeta.....	31
Figura 4. Sistema de tanques piloto e equipamentos auxiliares utilizados no experimento. (A) Estrutura geral do sistema de tanque piloto ; (B) detalhe da inserção dos corpos de prova na parede interna do tanque; (C) bomba peristáltica responsável pela circulação contínua do meio líquido em circuito fechado, promovendo a homogeneização do sistema, evitando a sedimentação de partículas e simulando condições hidrodinâmicas semelhantes às encontradas em ambientes industriais; (D) torneira de três vias (triway) acoplada às mangueiras, permitindo a coleta de amostras de forma prática, controlada e sem a necessidade de interromper o fluxo do sistema.....	32
Figura 5. Cupons metálicos montados em stubs e recobertos com ouro para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
Figura 6. Avaliação do efeito do Coquetel 1 sobre a biomassa de biofilme em três culturas bacterianas mistas distintas de BRS. Cada gráfico representa uma cultura mista independente (Cultura A, B e C), selecionadas dentre as 16 culturas avaliadas. Os valores correspondem à média de triplicatas experimentais, com barras de erro indicando o desvio padrão.....	43
Figura 7. Curva DO600nm pela cultura mista de bactérias redutoras de sulfato em sistema de tanques na ausência (controle) e presença (tratamento) do coquetel fágico.....	44
Figura 8. Curva de produção de H ₂ S pela cultura mista de bactérias redutoras de sulfato que ocorreu durante 28 dias em sistema de tanques na ausência (controle) e presença (tratamento) do coquetel fágico, adicionado em intervalo de tempos o qual a seta indica.....	46
Figura 12. Quantificação de bactérias totais e bactérias redutoras de sulfato (BRS) nos tanques controle e tratamento, determinada por qPCR....	49
Figura 13. Quantificação de ATP (pg ATP/cm ²) em biofilmes formados sobre cupons metálicos após 28 dias em sistema de tanques.....	51
Figura 14. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de cupons metálicos após 28 dias de experimento. (A, C, E, G) Tanque controle; (B, D, F, H) Tanque tratamento. As imagens correspondem a diferentes ampliações: 200× (A, B), 1.000× (C, D), 5.000× (E, F) e 10.000× (G, H).....	52

Figura 15. Análise da topografia superficial dos cupons metálicos por perfilometria óptica após 21 dias de exposição. (A) Mapa de superfície do cupom do tanque controle. (B) Mapa de superfície do cupom do tanque tratamento. (C) Perfis de rugosidade ao longo dos eixos X e Y para o controle. (D) Perfis de rugosidade ao longo dos eixos X e Y para o tratamento. A escala de cores representa a variação de altura da superfície, em que os tons de azul indicam as regiões mais baixas (vales) e os tons de vermelho representam as regiões mais elevadas (picos), enquanto as cores intermediárias correspondem a alturas intermediárias.... 54

Figura 16. Perda de massa (g) e taxa de corrosão (mm/ano) em cupons metálicos após 28 dias de experimento em tanques..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bacteriófagos utilizados no estudo, seus respectivos hospedeiros bacterianos e a composição dos coquetéis fágicos empregados nos ensaios experimentais..... 41

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de rugosidade superficial (μm) dos cupons metálicos dos tanques controle e tratamento após 28 dias de exposição..... 54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ATP – Adenosina trifosfato

BRS – Bactérias redutoras de sulfato

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CIM – Corrosão influenciada por microrganismos

DO₆₀₀ – Densidade óptica a 600 nm

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dsrA – Gene associado à redução de sulfato

EPS – Substâncias poliméricas extracelulares

FeS – Sulfeto de ferro

H₂S – Sulfeto de hidrogênio

HMDS – Hexametildisilazano

ISO – *International Organization for Standardization*

LB – Luria-Bertani

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NaCl – Cloreto de sódio

NH₄OH – Hidróxido de amônio

NMP – Número mais provável

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salino)

pH – Potencial hidrogeniônico

PVC – Policloreto de vinila

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

SSC – *Sulfide Stress Cracking*

UFP – Unidades formadoras de placa

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem
°C – Grau Celsius
× – Multiplicação
cm – Centímetro
cm² – Centímetro quadrado
g – Grama
h – Hora
L – Litro
m – Metro
min – Minuto
Min – Minuto
mL – Mililitro
μL – Microlitro
μm – Micrômetro
nm – Nanômetro
ppm – Partes por milhão
RLU – Unidades relativas de luminescência
rpm – Rotações por minuto
Rq – Rugosidade média quadrática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Bactérias redutoras de sulfato (BRS).....	19
2.2 Biofilmes microbianos e suas implicações em sistemas industriais.....	22
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Delineamento Experimental.....	26
4.2 Seleção dos bacteriófagos com alta performance lítica.....	27
4.3. Propagação dos fagos.....	27
4.4 Titulação de bacteriófagos.....	28
4.5 Formulação dos coquetéis fágicos.....	29
4.6 Ensaio de prevenção e degradação de biofilmes de BRS com coquetéis fágicos.....	29
4.6.1 Quantificação da biomassa de biofilme por coloração com cristal violeta.	30
4.7 TESTES EM TANQUE PILOTO.....	31
4.7.1 Estrutura do sistema de tanques piloto.....	31
4.7.2 Sistema experimental em tanques piloto.....	32
4.8 Monitoramento microbiológico do sistema.....	34
4.8.1 Crescimento microbiano e Quantificação de sulfeto (H ₂ S).....	34
4.8.2 Estimativa de células viáveis planctônicas.....	35
4.9 Caracterização do biofilme nos cupons.....	35
4.9.2 Concentração de ATP no biofilme.....	36
4.9.3 Quantificação dos microrganismos por qPCR.....	37
4.9.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
4.9.5 Perfilometria óptica.....	39
4.9.6 Perda de massa e taxa de corrosão.....	40
4.10 Análises estatísticas.....	40
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Seleção dos bacteriófagos e composição dos coquetéis fágicos.....	40
5.2 Ensaio preliminares de biofilme em placa.....	42
5.3 Crescimento microbiano no sistema de tanques.....	44
5.4 Produção de H ₂ S.....	45
5.5 Quantificação microbiológica (NMP).....	46
5.6 Quantificação molecular (qPCR).....	49
5.7 Atividade metabólica do biofilme (ATP).....	50
5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
5.9 Perfilometria.....	52

5.10 Perda de massa e taxa de corrosão.....	54
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÕES.....	62
8 PERSPECTIVAS.....	63
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) desempenham um papel essencial no ciclo do enxofre e na biorremediação de metais pesados (LI et al., 2018). Essas bactérias realizam respiração anaeróbia, utilizando o sulfato como aceptor final de elétrons na via de redução dissimilatória do sulfato. Nesse processo, os elétrons são provenientes da oxidação de compostos orgânicos ou inorgânicos, como lactato, acetato e hidrogênio molecular, resultando na produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), um composto altamente tóxico e corrosivo. O H_2S representa sérios riscos à saúde humana em ambientes industriais, podendo causar irritação nas vias respiratórias e, em concentrações elevadas, levar à perda de consciência e morte. Além disso, esse gás promove a corrosão acelerada de superfícies metálicas por meio da formação de sulfeto de ferro (FeS), e pode induzir fissuras em materiais submetidos a tensão, fenômeno conhecido como "*sulfide stress cracking*" (SSC) (ENNING; GARRELF, 2014; MUYZER; STAMS, 2008). Portanto, a presença e atividade das BRS em ambientes industriais constitui uma ameaça significativa à integridade de equipamentos, à segurança ocupacional e ao equilíbrio ambiental (DIAS, 2022).

O setor de Petróleo e Gás possui uma importância fundamental para a economia global. Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o Brasil movimentou mais de 106 milhões de barris de petróleo em operações de importação ao longo do ano de 2023 (ANP, 2024). No setor petrolífero, as BRS representam um grande desafio, uma vez que um dos principais fatores que dificultam seu controle é a formação de biofilmes, que atuam como uma barreira protetora, tornando essas bactérias mais resistentes aos biocidas convencionais (PEREIRA et al., 2017). Como consequência, a corrosão influenciada por microrganismos (CIM), também conhecida como biocorrosão, torna-se um problema ainda mais grave, afetando diretamente a integridade de estruturas metálicas (SILVA et al., 2020). Além disso, a produção de H_2S pelas BRS contribui para a redução da qualidade do petróleo, aumentando sua acidez, viscosidade e densidade, o que impacta negativamente seu valor de mercado (ARGÔLO, 2017).

Diante desses desafios, novas estratégias vêm sendo estudadas para mitigar os impactos das BRS na indústria petrolífera. Uma alternativa promissora é o uso de bacteriófagos, vírus capazes de infectar e destruir bactérias-alvo. Os fagos possuem a capacidade de penetrar e degradar biofilmes bacterianos por meio de diferentes

mecanismos, destacando-se a produção de enzimas depolimerases, capazes de degradar componentes da matriz extracelular, como exopolissacarídeos, alterando sua estrutura tridimensional e reduzindo a proteção conferida às células aderidas (PARASION *et al.*, 2014).

Neste contexto, estratégias inovadoras baseadas no uso de bacteriófagos têm sido investigadas como alternativas promissoras para o controle de biofilmes microbianos em ambientes industriais. Estudos recentes reforçam essa estratégia ao demonstrarem que bacteriófagos e seus derivados como enzimas, podem atuar no controle de biofilmes complexos, incluindo biofilmes polimicrobianos, por meio da lise bacteriana, da penetração na matriz extracelular e da ação de enzimas associadas aos fagos, como depolimerases (CHANG *et al.*, 2022; GLIŻNIEWICZ *et al.*, 2024). Assim, ainda que os fagos utilizados não atuem diretamente sobre as BRS, sua ação sobre outras bactérias presentes no biofilme pode promover a desestruturação da matriz extracelular e facilitar o acesso de biocidas convencionais às células protegidas. Essa estratégia combinada visa ampliar a eficácia do controle da CIM em ambientes industriais de difícil manejo.

Diante da necessidade de novas estratégias para o controle da corrosão microbiologicamente influenciada associada à atividade de bactérias redutoras de sulfato, este trabalho propõe o desenvolvimento e a avaliação de coquetéis fágicos inespecíficos como alternativa complementar aos métodos convencionais de controle. A eficácia dessa abordagem será investigada por meio de parâmetros relacionados à formação de biofilmes, à produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e outros métodos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bactérias redutoras de sulfato (BRS)

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são procariotos anaeróbios amplamente distribuídos em ambientes naturais e industriais. Esse grupo não corresponde a uma única classificação taxonômica, estando distribuído em diferentes linhagens bacterianas, principalmente nas classes Desulfobacteria e Desulfovibrionia. Entre os gêneros mais estudados destacam-se Desulfovibrio, Desulfotomaculum, Desulfobacter, Desulfobulbus e Desulfococcus, frequentemente associados à produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e à corrosão

microbiologicamente influenciada. Essas bactérias estão presentes em ambientes anóxicos com disponibilidade de matéria orgânica, que é utilizada como doadora de elétrons em seu metabolismo, resultando na redução de sulfato e na produção de H_2S (MUYZER; STAMS, 2008; RABUS; HANSEN; WIDDEL, 2013).

Esses grupos de procariotos podem ser encontrados em ambientes aquáticos ou terrestres, como águas marinhas, sedimentos e corpos d'água com elevada salinidade, também já foram identificados em ambientes de altas temperaturas, como sedimentos hidrotermais. Observou-se atividade de redução de sulfato por esses microrganismos termofílicos em temperaturas de até 80 °C (ELSGAARD *et al.*, 1994), além de ambientes associados à extração de petróleo (SINGH *et al.*, 2023).

Nas indústrias petrolíferas, a injeção de água do mar em reservatórios *offshore* é uma prática comum utilizada para aumentar a recuperação de petróleo. No entanto, como o sulfato (SO_4^{2-}) está presente em alta concentração nessa água, essa prática acaba favorecendo o desenvolvimento de BRS em diversos contextos operacionais. Esses microrganismos anaeróbios prosperam em ambientes anóxicos, onde utilizam compostos sulfurados, como sulfato, tiosulfato ou enxofre elementar, como receptores de elétrons durante a respiração anaeróbia para obtenção de energia (JOHNSON *et al.*, 2017; VIDELA, 1996). Como consequência, ocorre o fenômeno conhecido como *souring* biogênico em sistemas de produção de petróleo, no qual BRS utilizam o sulfato como aceptor final de elétrons, resultando na formação de H_2S . Esse composto é altamente tóxico, inflamável e corrosivo, representando sérios riscos à saúde ocupacional, à integridade das instalações e ao meio ambiente (GIEG; JACK; FOGHT, 2011), de acordo com o Anexo 11 da Norma Regulamentadora N° 15 (NR-15) do Ministério do Trabalho e Emprego, o limite máximo de tolerância para a exposição ocupacional ao gás H_2S é de 8 ppm para jornadas de trabalho de até 48 horas semanais. Esse gás também causa outros efeitos sobre os metais das tubulações, como a ocorrência de depósitos de sulfeto de ferro, que podem causar entupimento das tubulações.

Outro problema intimamente relacionado é a CIM, também chamada de biocorrosão, que corresponde à degradação de materiais, especialmente metais, causada ou intensificada pela atividade metabólica microbiana (YEMASHOVA *et al.*, 2007). Além das BRS, outros grupos, como bactérias formadoras de biofilme, redutoras de ferro e oxidantes de enxofre, também participam desse processo,

promovendo alterações no ambiente local, como variações de pH, gradientes de íons e acúmulo de metabólitos corrosivos. Esses microrganismos aderem às superfícies metálicas e formam biofilmes que geram modificações eletroquímicas, favorecendo reações que levam à corrosão. A produção de compostos como ácidos orgânicos e H_2S , bem como a remoção de oxigênio por processos respiratórios anaeróbios, são exemplos de mecanismos que contribuem para o avanço da CIM. Como consequência, há comprometimento da integridade estrutural, aumento nos custos operacionais e riscos à segurança e à continuidade das atividades industriais. Estudos recentes destacam que a CIM é responsável por uma parcela significativa das falhas em poços de petróleo e corrosão interna de dutos, sendo um foco crescente de pesquisa para o desenvolvimento de estratégias eficazes de monitoramento e controle (KHAN; HUSSAIN; DJAVANROODI, 2021).

Além disso, a formação do biofilme por culturas mistas de BRS atua como uma barreira protetora, dificultando a ação de agentes antimicrobianos tradicionais, como os biocidas. Essa resistência estrutural dificulta a eliminação eficaz dos microrganismos e contribui para a produção de H_2S e da corrosão. Diante desse cenário, estratégias alternativas como o uso de coquetéis inespecíficos de bacteriófagos tem sido analisadas por seu potencial na prevenção da formação e na remoção de biofilmes, além de seu possível efeito indireto na redução da produção de H_2S em sistemas industriais (DO CARMO SANTOS et al., 2024).

Em estudos que investigam BRS, frequentemente são utilizadas culturas mistas para representar de forma mais realista a complexidade dos biofilmes formados em ambientes anóxicos. Em sistemas naturais ou industriais, como dutos e tanques da indústria de petróleo, as BRS normalmente não ocorrem isoladamente, mas sim em consórcios microbianos. Esses consórcios formam biofilmes estruturalmente mais complexos e resistentes, nos quais as BRS tendem a se concentrar nas camadas mais profundas, em zonas com menor disponibilidade de oxigênio (JIA *et al.*, 2019). Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, também utilizaram culturas mistas, reconhecendo sua relevância para simular de forma mais fiel às condições encontradas no ambiente real (CARMO, 2019; CUNHA, 2021). Dessa forma, o uso de culturas mistas é considerado fundamental para proporcionar uma avaliação representativa da eficácia dos tratamentos propostos para o controle de biofilmes de BRS.

2.2 Biofilmes microbianos e suas implicações em sistemas industriais

Os biofilmes correspondem a estruturas altamente organizadas, formadas por comunidades microbianas aderidas a superfícies e envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (FLEMMING et al., 2023). Esses sistemas podem ser definidos como ecossistemas microbianos complexos, nos quais os microrganismos apresentam elevada capacidade de crescimento, adaptação e sobrevivência em ambientes hostis, conforme descrito por Oliveira (2008). A matriz, composta predominantemente por polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA extracelular, desempenha papel central na arquitetura e estabilidade do biofilme, contribuindo para a adesão celular, retenção de água e nutrientes e proteção contra condições adversas, incluindo a ação de agentes antimicrobianos (Shree et al., 2023).

A formação de biofilmes está intimamente associada a uma transição no estilo de vida bacteriano, na qual as células passam do estado planctônico para um modo de crescimento sésil. Esse processo ocorre de forma dinâmica e sequencial, compreendendo etapas como a adesão inicial reversível à superfície, seguida pela adesão irreversível, formação de microcolônias e maturação do biofilme (Hall-Stoodley et al., 2004), Como demonstrado na **figura x**. Durante essas fases, os microrganismos sofrem alterações fisiológicas e metabólicas que contribuem para a organização e estabilidade da comunidade microbiana. A regulação desse processo é influenciada por fatores ambientais, como a disponibilidade de nutrientes, e por sistemas de comunicação celular, destacam-se mecanismos regulatórios como o quorum sensing, um sistema de comunicação dependente da densidade celular baseado na produção e detecção de moléculas sinalizadoras, e a sinalização intracelular mediada por c-di-GMP, um mensageiro secundário que regula a transição entre os estados planctônico e sésil. Esses sistemas desempenham papel fundamental na formação, maturação e manutenção de biofilmes bacterianos. (Forsythe, 2013).

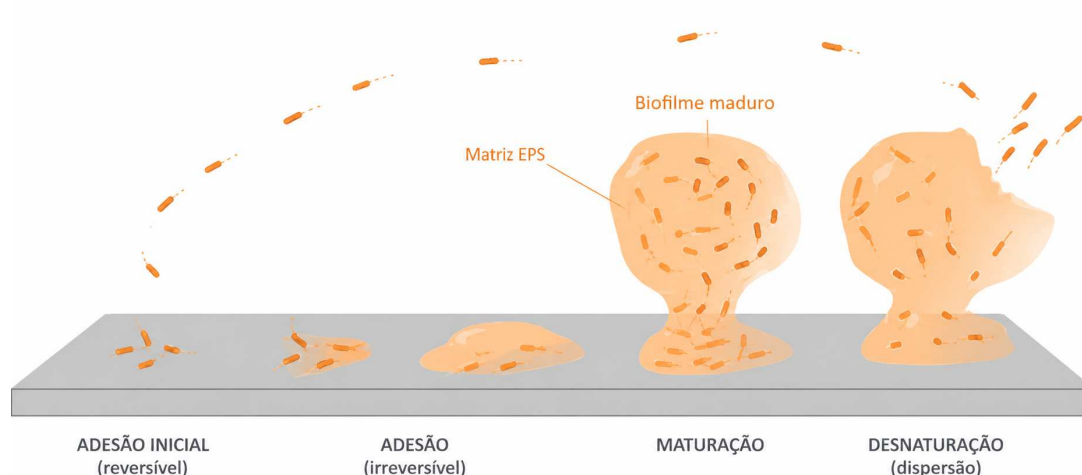


Figura 1. Representação esquemática das etapas de formação e desenvolvimento do biofilme bacteriano, incluindo a adesão inicial reversível, adesão irreversível, maturação com produção de matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e dispersão celular.

Os biofilmes representam um importante desafio, uma vez que as células associadas a essas estruturas apresentam maior tolerância a agentes antimicrobianos quando comparadas às células em estado planctônico (Flemming et al., 2016). Essa tolerância está relacionada a múltiplos fatores, incluindo a limitação na difusão de compostos químicos pela matriz de EPS e a presença de subpopulações celulares em estado metabólico reduzido ou dormente. Como consequência, os tratamentos convencionais frequentemente não são capazes de promover a completa erradicação do biofilme, favorecendo a recorrência do crescimento microbiano. Esse cenário resulta no aumento da aplicação de biocidas, especialmente do tetrakis(hidroximetil)fosfônio sulfato, um dos compostos mais utilizados atualmente pela indústria petrolífera para o controle de bactérias redutoras de sulfato e biofilmes. Consequentemente, há uma elevação dos custos operacionais, sendo estimado que a indústria do petróleo despenda aproximadamente 2 bilhões de dólares anuais com o uso desses compostos (BALDWIN; SUMMER, 2012).

As BRS são frequentemente associadas a biofilmes em ambientes anóxicos, ocupando preferencialmente camadas mais profundas em comunidades microbianas mistas (Jia et al., 2019). Os microrganismos aeróbios e facultativos presentes nas camadas superficiais consomem oxigênio, favorecendo a formação de microambientes anaeróbios que permitem o crescimento das BRS. Durante seu

metabolismo, essas bactérias produzem sulfeto de hidrogênio (H_2S), contribuindo para a manutenção das condições redutoras.

Diversas estratégias têm sido propostas para o controle de biofilmes, incluindo abordagens físicas, químicas e biológicas. Nesse contexto, alternativas biológicas vêm sendo exploradas, com destaque para o uso de bacteriófagos como agentes de controle microbiano.

2.3 Bacteriófagos

Os bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam exclusivamente bactérias e, como os demais vírus, são considerados parasitas intracelulares obrigatórios (CLOKIE et al., 2009). Esses vírus estão amplamente distribuídos em diversos ambientes, como solos, oceanos, efluentes e regiões com condições extremas. Estima-se que os fagos sejam os organismos mais abundantes da biosfera, superando até mesmo a quantidade de células bacterianas (SUTTLE, 2005; WEINBAUER, 2004).

Os bacteriófagos são classificados, principalmente, em dois grupos: os lisogênicos, que inserem seu material genético no DNA da célula hospedeira, onde pode permanecer replicando-se juntamente com o genoma bacteriano sem causar sua destruição imediata; e os líticos, que utilizam a maquinaria celular da bactéria para replicar seu material genético e produzir novas partículas virais, culminando na lise da célula hospedeira e liberação dos novos vírus (CLOKIE; KROPINSKI, 2009; BRÜSSOW et al., 2004).

Os bacteriófagos apresentam alta especificidade, identificando alvos bacterianos por meio de receptores moleculares presentes na superfície celular, o que confere seletividade e eficácia à sua ação infecciosa. No entanto, alguns fagos demonstram um espectro de atuação mais amplo, sendo capazes de infectar diferentes espécies e até gêneros bacterianos, característica que os torna ferramentas promissoras para o controle de comunidades microbianas complexas (HYMAN; ABEDON, 2010; SULAKVELIDZE et al., 2001).

Apesar dessa capacidade, fagos individuais geralmente apresentam alcance restrito, atuando de forma eficaz apenas sobre determinadas cepas bacterianas. Essa limitação pode favorecer o surgimento de resistência bacteriana. Nesse contexto, a utilização de coquetéis fágicos contendo múltiplos tipos de vírus permite ampliar o espectro de ação e reduzir a probabilidade de seleção de cepas

resistentes, uma vez que diferentes fagos podem reconhecer receptores distintos em um mesmo hospedeiro (ALTAMIRANO; BARR, 2019).

Além da capacidade infecciosa, os bacteriófagos produzem enzimas que potencializam sua ação contra microrganismos, especialmente em ambientes com presença de biofilmes (ABEDON, 2011; PIRES et al., 2016). Entre essas enzimas destacam-se as endolisinas, responsáveis pela degradação da parede celular bacteriana, as holinas, que promovem a formação de poros na membrana plasmática, e as depolimerases, capazes de degradar estruturas extracelulares como cápsulas polissacarídicas, lipopolissacarídeos e a matriz de exopolissacarídeos que compõe o biofilme (FISCHETTI, 2005; YOUNG, 2014; LATKA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020).

A ação dessas enzimas facilita o acesso dos fagos às bactérias-alvo e contribui para a desestruturação da matriz do biofilme, frequentemente associada à resistência a antibióticos e biocidas (CHAN; ABEDON, 2015; TKHILAISHVILI et al., 2021). Dessa forma, coquetéis fágicos compostos por diferentes vírus podem combinar distintos espectros de ação e perfis enzimáticos, aumentando a eficiência do tratamento contra biofilmes formados por comunidades bacterianas complexas. Essa estratégia apresenta potencial para o controle da corrosão microbiologicamente influenciada em ambientes industriais, por associar especificidade microbiológica, capacidade de desestruturação de biofilmes e menor impacto ambiental (TKHILAISHVILI et al., 2021; LU; COLLINS, 2007)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar coquetéis fágicos inespecíficos como estratégia alternativa aos métodos convencionais para o controle de biofilme formados por culturas mistas contendo BRS.

3.2 Objetivos Específicos

- Selecionar bacteriófagos inespecíficos para a formulação de diferentes coquetéis;
- Avaliar a eficácia de coquetéis fágicos inespecíficos no controle de biofilmes formados por culturas mistas de BRS em cupons de aço carbono em sistema de tanque piloto

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

Este trabalho consistiu em um estudo experimental *in vitro*, desenvolvido inicialmente em escala de bancada e posteriormente ampliado para um sistema de tanques piloto, permitindo uma melhor aproximação do tratamento alternativo proposto às condições encontradas em ambientes industriais.

No sistema de tanques, o delineamento experimental incluiu grupos controle, sem aplicação de tratamento, e grupos tratados, nos quais foi avaliado o efeito do coquetel fágico. A cultura mista bacteriana utilizada foi selecionada por ser proveniente de ambientes associados à exploração e produção de petróleo, apresentando uma comunidade microbiana representativa das condições encontradas em sistemas industriais suscetíveis à CIM.

A eficácia dos tratamentos foi determinada por meio da comparação entre os grupos controle e tratados, considerando os parâmetros microbiológicos e químicos monitorados ao longo dos ensaios.

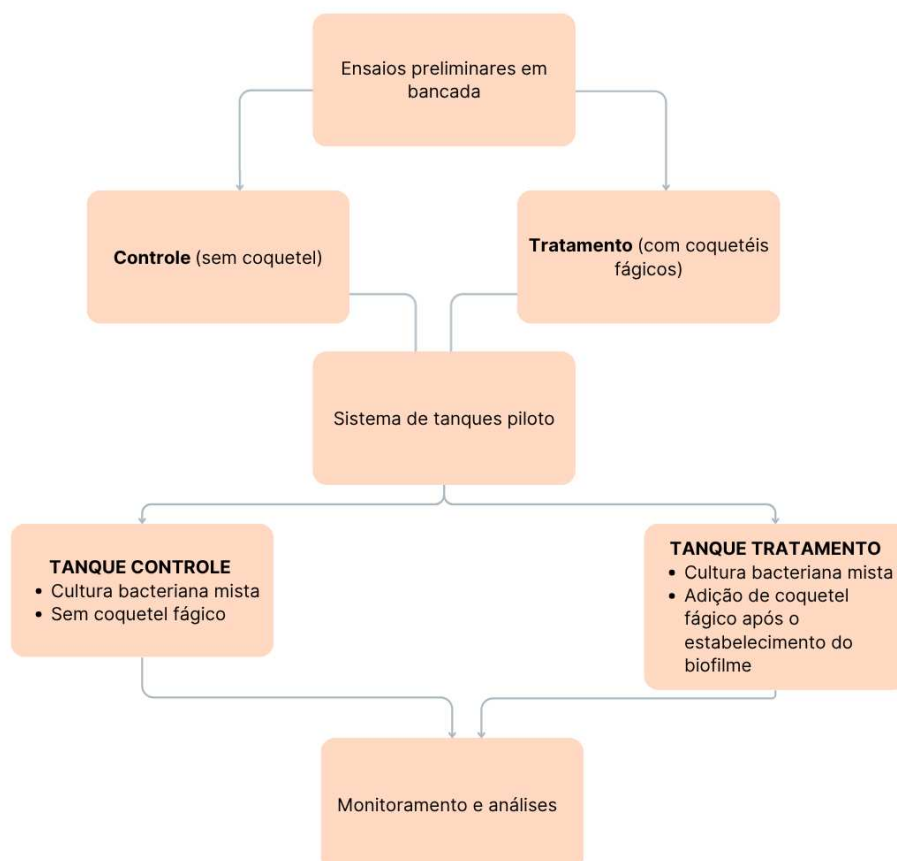


Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental adotado neste estudo, indicando as etapas de ensaios em bancada e em tanques piloto, bem como a organização dos grupos controle e tratamento com aplicação do coquetel fágico.

4.2 Seleção dos bacteriófagos com alta performance lítica

Fagos previamente isolados e armazenados na fagoteca do Laboratório de Imunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, foram selecionados para os ensaios. A escolha destes fagos baseia-se em características como a formação de extensas placas de lise nas cepas originais e/ou em dados de sequenciamento que evidenciaram a presença de genes codificadores de enzimas depolimerases, indicadores de forte atividade lítica e potencial capacidade de degradação da matriz exopolimérica de biofilmes.

4.3. Propagação dos fagos

Tabela X. Bacteriófagos utilizados e suas respectivas bactérias hospedeiras para propagação.

Fago	Hospedeiro bacteriano	Fago	Hospedeiro bacteriano
K01	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	KP7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 58B
K02	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	KP8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5B
KV3	<i>Klebsiella variicola</i> (26E)	KP9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5B
KP4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13 (KP13)	CIT1	<i>Citrobacter freundii</i>
KP6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (58B)	SHIG	<i>Shigella flexneri</i>

Para os pré-inóculos bacterianos, colônias isoladas das bactérias hospedeiras foram inicialmente cultivadas em caldo Luria-Bertani (LB), contendo peptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e cloreto de sódio, NaCl (10 g/L), com pH ajustado para 7,0. e incubadas overnight a 37 °C. Após o período de incubação, a densidade

óptica da cultura foi aferida em 600 nm (DO_{600}). Em seguida, os pré-inóculos foram transferidos para 300 mL de caldo LB, de modo que a cultura inicial apresentasse DO_{600} ajustada para 0,1, em frascos Erlenmeyer.

Após o ajuste da densidade celular, 100 μ L da suspensão viral correspondente foram adicionados a cada frasco contendo a respectiva cultura bacteriana hospedeira. As culturas foram mantidas a 37 °C, sob agitação de 100 rpm, por aproximadamente overnight, visando a propagação dos bacteriófagos.

Decorrido esse período, as culturas foram transferidas para tubos de 50 mL e submetidas à centrifugação a 8000 $\times$ g, a 4 °C, por 15 minutos, para a sedimentação dos restos celulares e a separação de fases. A fase aquosa foi removida, e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μ m (Millipore, Billerica, MA, USA), transferida para tubos esterilizados e armazenada a 4 °C. Todo o procedimento foi conduzido individualmente para cada fago selecionado.

4.4 Titulação de bacteriófagos

Com o objetivo de verificar a eficiência da propagação e a viabilidade dos bacteriófagos, foi realizada a titulação das suspensões virais por meio de diluições seriadas em tampão SM, contendo cloreto de sódio – NaCl (5,8 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2,0 g/L), Tris-HCl (50 mM) e gelatina (0,01%), com pH ajustado para 7,4. Esse tampão foi utilizado por apresentar composição capaz de estabilizar as partículas virais, protegendo os bacteriófagos contra processos de degradação e contribuindo para a manutenção de sua infectividade.

As diluições obtidas foram plaqueadas em meio LB sólido (contendo ágar) pelo método da dupla camada, utilizando a respectiva bactéria hospedeira. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Após a incubação, foram consideradas para contagem apenas as placas de Petri que apresentavam entre 30 e 300 placas de lise. O título viral foi determinado e expresso em unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL), utilizando a seguinte fórmula:

$$UFP/mL = \frac{\text{média do número de placas de lise} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume da alíquota plaqueada (mL)}} \quad \text{Equação 1}$$

4.5 Formulação dos coquetéis fágicos

Os coquetéis fágicos foram formulados a partir de combinações previamente selecionadas de bacteriófagos, resultando em três formulações distintas, denominadas Coquetel 1, Coquetel 2 e Coquetel 3, cada uma composta por quatro fagos. Os coquetéis foram preparados de modo que o título final em cada poço das placas de 96 poços atingisse 10^8 unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

Posteriormente, as três formulações foram avaliadas frente a diferentes culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato (BRS), tanto quanto à prevenção da formação de biofilmes, quanto ao controle de biofilmes previamente estabelecidos, por meio da quantificação da biomassa aderida. Com base nos resultados obtidos, um dos coquetéis foi selecionado para a realização dos ensaios subsequentes, os quais foram conduzidos em triplicata biológica e, posteriormente, em experimentos em escala de tanque.

4.6 Ensaios de prevenção e degradação de biofilmes de BRS com coquetéis fágicos

A avaliação da ação dos coquetéis fágicos quanto à sua eficácia na prevenção e no controle da formação de biofilmes produzidos por culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato (BRS) foi conduzida em placas de 96 poços.

Para os ensaios, utilizou-se o meio Postgate E modificado sem ferro, preparado com água do mar, contendo KH_2PO_4 (0,5 g/L), NH_4Cl (1,0 g/L), Na_2SO_4 (4,5 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,06 g/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L), lactato de sódio a 50% (7,0 mL/L), tioglicolato de sódio (0,13 g/L) e resazurina a 0,025% (4,0 mL/L), com pH ajustado para 7,4.

Os ensaios foram realizados utilizando culturas mistas previamente ajustadas para densidade óptica (DO_{600}) de 0,1. Todos os procedimentos foram conduzidos em placas de 96 poços, em câmara de anaerobiose (Whitley A95), a 30 °C, sob atmosfera composta por 10% de hidrogênio (H_2), 10% de dióxido de carbono (CO_2) e 80% de nitrogênio (N_2), garantindo condições adequadas para o crescimento das bactérias redutoras de sulfato. Os coquetéis fágicos foram aplicados de modo a atingir concentração final de 10^7 UFP/mL. Cada condição experimental foi realizada em triplicata. Como controle negativo, foram utilizados poços contendo apenas a cultura bacteriana, sem adição de fagos, enquanto o branco experimental consistiu

de poços contendo apenas meio de cultura e o coquetel fágico, sem a presença de bactérias.

No ensaio de prevenção da formação de biofilme, foram adicionados 180 μL da suspensão bacteriana e 20 μL do coquetel fágico, totalizando 200 μL por poço. Nos controles, foram adicionados 200 μL da suspensão bacteriana. As placas foram incubadas por cinco dias sob condições anaeróbias.

No ensaio de controle de biofilme pré-formado, foram inicialmente adicionados 200 μL da suspensão bacteriana em cada poço, e as placas foram incubadas por cinco dias para permitir a formação do biofilme. Após esse período, o conteúdo dos poços foi removido cuidadosamente e substituído por 180 μL de meio Postgate E fresco e 20 μL do respectivo coquetel fágico. As placas foram então incubadas por mais 24 horas para avaliação da ação dos fagos sobre o biofilme previamente estabelecido.

4.6.1 Quantificação da biomassa de biofilme por coloração com cristal violeta

Após as etapas de incubação em ambos os ensaios, os sobrenadantes foram descartados e os poços lavados três vezes com 250 μL de PBS 1X com pH 7,4 para remoção das células não aderidas. Após cada lavagem, as placas foram mantidas em estufa a 50 °C por 15 minutos, para secagem completa.

Para a fixação do biofilme, foram adicionados 250 μL de metanol a 99% em cada poço, permanecendo por 15 minutos. Após a remoção e a evaporação completa do metanol, os biofilmes foram corados com 250 μL de solução de cristal violeta a 1% (m/v) por 20 minutos (Figura 2). Em seguida, o excesso de corante foi removido por três lavagens sucessivas com 250 μL de tampão PBS 1X, contendo NaCl (8,0 g/L), KCl (0,2 g/L) Na_2HPO_4 (1,44 g/L) e KH_2PO_4 (0,24 g/L), e as placas foram novamente submetidas à secagem. O corante retido pelo biofilme foi então solubilizado com uma solução de acetona e etanol na proporção de 20:80 (v/v). A absorbância foi determinada a 590 nm em leitor de microplacas, de acordo com o método descrito por Weiss-Muszkat et al. (2010). Os valores de absorbância obtidos foram utilizados como medida da biomassa total do biofilme. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0.2).

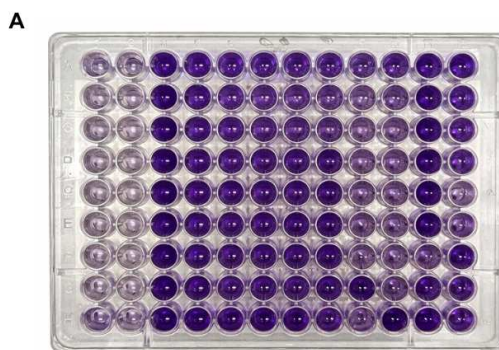


Figura 3. Placa de 96 poços utilizada para a quantificação da biomassa de biofilme por coloração com cristal violeta.

4.7 TESTES EM TANQUE PILOTO

4.7.1 Estrutura do sistema de tanques piloto

Os tanques piloto (FIGURA 3A) utilizados apresentam volume útil de 8 L, sendo constituídos por um corpo principal em material plástico e extensões laterais (“braços”) confeccionadas em policloreto de vinila (PVC) transparente, o que permite a visualização do volume interno do sistema. A parte superior é composta por uma tampa contendo quatro conexões rosqueáveis e um sistema de vedação em borracha, garantindo maior estanqueidade e condições de anaerobiose, na parede do tanque foram inseridos os corpos de prova (Figura 3B) utilizando fita dupla face para a fixação, enquanto a região inferior possui uma válvula responsável pelo escoamento e controle do volume do sistema .

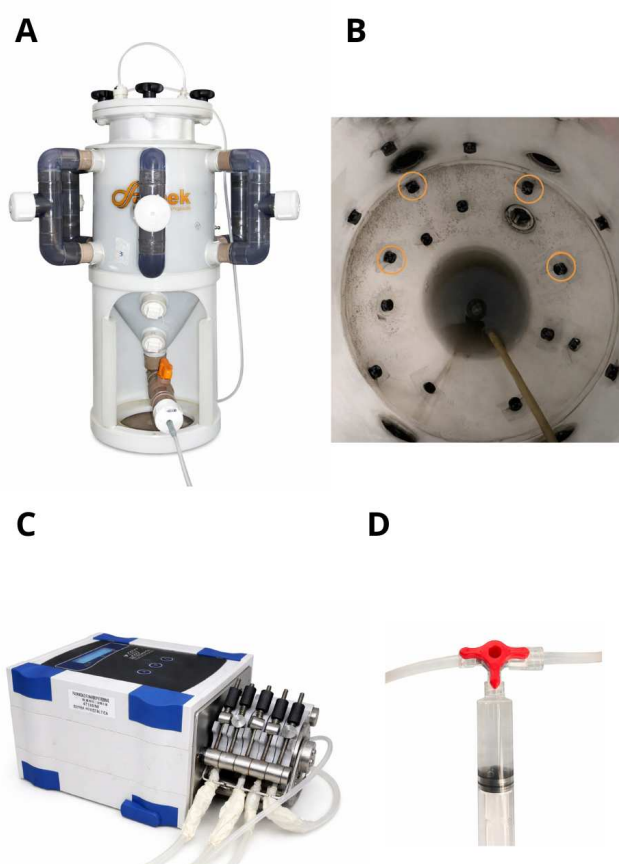


Figura 4. Sistema de tanques piloto e equipamentos auxiliares utilizados no experimento. (A) Estrutura geral do sistema de tanque piloto; (B) detalhe da inserção dos corpos de prova na parede interna do tanque; (C) bomba peristáltica responsável pela circulação contínua do meio líquido em circuito fechado, promovendo a homogeneização do sistema, evitando a sedimentação de partículas e simulando condições hidrodinâmicas semelhantes às encontradas em ambientes industriais; (D) torneira de três vias (triway) acoplada às mangueiras, permitindo a coleta de amostras de forma prática, controlada e sem a necessidade de interromper o fluxo do sistema.

4.7.2 Sistema experimental em tanques piloto

Visando aproximar as condições experimentais às encontradas em ambientes industriais, foi desenvolvido um sistema de tanques piloto com capacidade para replicar, em maior escala, os testes previamente conduzidos em bancada.

O experimento ocorreu em tanques piloto com o objetivo de avaliar o efeito de um coquetel de bacteriófagos sobre uma comunidade microbiana mista, que em sua

composição estava presente bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias anaeróbicas heterotróficas totais (BAnHT). O ensaio teve duração total de 28 dias e foi conduzido utilizando quatro tanques, sendo dois tanques controle e dois tanques submetidos ao tratamento com o coquetel fágico.

Inicialmente, no dia 0 do experimento, os tanques foram inoculados com a cultura bacteriana mista de BRS, com o objetivo de permitir o estabelecimento e a formação de biofilme nos cupons metálicos presentes no sistema.

Após um período inicial de 7 dias, destinado à formação do biofilme, iniciou-se a aplicação de 80 mL do coquetel fágico nos tanques de tratamento. O coquetel foi adicionado em três momentos distintos do experimento: no 7º, 14º e 21º dia, atingindo concentração final de 10^7 UFP/mL.

O experimento foi composto por quatro tanques piloto independentes, sendo dois tanques controle, contendo apenas a comunidade microbiana sem adição de bacteriófagos, e dois tanques de tratamento, nos quais o coquetel fágico foi aplicado conforme o cronograma experimental. O ensaio teve duração de 28 dias e, para cada tanque, foram coletadas três amostras destinadas às análises microbiológicas e físico-químicas. A comparação entre os sistemas controle e tratamento permitiu avaliar o efeito da aplicação do coquetel fágico sobre a densidade microbiana, a formação de biofilme e a produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) ao longo do período experimental.

Para o preparo do meio de cultivo nos tanques, a água do mar sintética (CENPES/PDEDS/BIO), composta por NaF 0,003 g/L, $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,02 g/L, H_3BO_3 0,03 g/L, KBr 0,10 g/L, KCl 0,70 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,11 g/L, Na_2SO_4 4,00 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10,78 g/L, NaCl 23,50 g/L, $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ 0,02 g/L, Na_4EDTA 0,001 g/L e $NaHCO_3$ 0,20 g/L, preparada em água destilada, foi previamente aquecida em cerca de 65 °C e submetida à purga com nitrogênio por 30 minutos, a fim de estabelecer um ambiente anaeróbio adequado. Somente após esse período foi realizada a suplementação com a solução nutritiva 10X (extrato de levedura 10 g/L, glicose 2,5 g/L, lactato de sódio 40 mL/L), correspondente a 10% do volume total do tanque que é de 8 litros. Essa solução também foi previamente aquecida e purgada com nitrogênio, visando manter as condições anaeróbias ideais para o crescimento das bactérias.

Três dias antes da inoculação dos tanques, foi realizado o preparo dos pré-inóculos da cultura microbiana mista de bactérias redutoras de sulfato (BRS).

Para isso, a cultura foi cultivada separadamente em dois meios de crescimento distintos: meio Postgate E (POSTGATE, 1984) modificado (KH_2PO_4 0,5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, Na_2SO_4 1 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,83 g/L, extrato de levedura 1 g/L, ácido ascórbico 0,1 g/L, lactato de sódio 50% (m/v) 7,0 mL, resazurina 0,025% (m/v) 4,0 mL, pH 7,6) com água do mar sintética. E o meio BANHT (CENPES/PEDES/BIO) modificado (glicose 5,0 g/L, peptona universal 4,0 g/L, extrato de levedura 1,0 g/L, resazurina 0,025% (m/v) 4,0 mL, pH 7,6), preparado em água do mar sintética, com posterior adição de tioglicolato de sódio 1,24 g/L. As culturas foram mantidas em incubação a 30 °C, condições de anaerobiose.

Após o período de cultivo, as duas culturas foram utilizadas para a preparação do inóculo final destinado aos tanques experimentais. Para cada tanque, foram combinados 200 mL da cultura cultivada em meio Postgate E e 200 mL da cultura cultivada em meio BANHT, totalizando 400 mL de inóculo, correspondente a 5% do volume total do tanque.

A inoculação foi realizada por meio da transferência desse volume para cada tanque experimental utilizando bombas peristálticas. Além da introdução do inóculo, o sistema de bombeamento também foi utilizado para promover a circulação do fluido no interior dos tanques, permitindo o controle do fluxo. Essa configuração experimental possibilitou a simulação de condições hidrodinâmicas semelhantes às observadas em tanques industriais de armazenamento.

4.8 Monitoramento microbiológico do sistema

4.8.1 Crescimento microbiano e Quantificação de sulfeto (H_2S)

Durante o período experimental, o crescimento bacteriano foi monitorado diariamente por meio de medições da densidade óptica a 600 nm (DO_{600}). Para isso, três alíquotas das amostras foram coletadas diretamente dos tubos Hungate, previamente esterilizados e purgados com nitrogênio, e utilizadas para a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (Hach®). As coletas foram realizadas 1 hora após o acionamento das bombas peristálticas, de modo a garantir a homogeneização do sistema. Paralelamente, a produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) também foi determinada diariamente por titulação potenciométrica utilizando titulador automático (Mettler Toledo®). Para a análise, alíquotas de 1 mL das amostras foram adicionadas a uma solução sequestrante composta por 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) e 5 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH). Em seguida, as

amostras foram analisadas no titulador automático, utilizando solução de nitrato de prata (AgNO_3) como titulante. Durante a titulação, a variação do potencial foi monitorada automaticamente pelo equipamento, permitindo a determinação da concentração de H_2S presente nas amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.8.2 Estimativa de células viáveis planctônicas

A estimativa de células viáveis no fluido foi determinada pelo método dos tubos múltiplos, expresso como número mais provável (NMP). As análises foram realizadas em três momentos do experimento: no primeiro dia após a inoculação, no décimo quarto dia e no último dia antes da finalização do ensaio. Para isso, 1 mL da amostra líquida (controle e tratamento) foi submetido a diluições seriadas em salina redutora (NaCl 3,5% m/v) até 10^{-7} . Em seguida, alíquotas de 1 mL de cada diluição foram inoculadas em triplicata em frascos contendo 9 mL de meio de cultura anaeróbio. Foram utilizados os meios Postgate E, suplementado com FeSO_4 (0,5 g/L), específico para detecção de bactérias redutoras de sulfato (BRS), e BANHT, utilizado para estimativa de bactérias anaeróbias heterotróficas totais presentes na comunidade microbiana. A formação de precipitado preto no meio Postgate E, decorrente da formação de sulfeto de ferro (FeS), foi considerada indicativa de crescimento positivo de BRS, enquanto a turvação do meio BANHT foi considerada indicativa de crescimento bacteriano. A estimativa do Número Mais Provável (NMP) foi realizada com base na tabela de Harrigan, utilizando o padrão de tubos positivos obtidos em cada série de diluição.

4.9 Caracterização do biofilme nos cupons

4.9.1 Cupons de aço carbono para formação de biofilmes

Serão utilizados cupons de aço carbono AISI 1020 com 10 x 10 mm como base para a formação dos biofilmes. A etapa de limpeza dos cupons foi feita por jateamento com areia, utilizando o equipamento Trijato Protecni®, e colocados sobre luz UV 15 min cada lado. Após a limpeza, os cupons foram pesados em balança analítica para registro da massa. Até o início dos testes, permanecerão armazenados em um dessecador para evitar oxidação.

4.9.2 Concentração de ATP no biofilme

A atividade metabólica do biofilme formado sobre os cupons metálicos foi avaliada por meio da quantificação de ATP total (tATP), utilizando o kit LuminUltra® ATP Testing Kit (Deposit & Surface Analysis – DSA). Para essa análise, foi empregado o método denominado *Biofilm Collector*, no qual o ATP é extraído diretamente da superfície contendo biofilme.

Após a remoção dos cupons do sistema experimental, o excesso de fluido foi cuidadosamente removido e cada cupom foi lavado em PBS 1x e foi inserido em um tubo contendo solução de extração UltraLyse® 7. Os tubos foram então agitados vigorosamente para promover a dispersão do biofilme no fluido de extração, permanecendo em incubação por aproximadamente 5 minutos para permitir a liberação do ATP presente nas células.

Em seguida, foi realizada a diluição da amostra, transferindo-se 1 mL da solução de extração para um tubo contendo 9 mL da solução de diluição UltraLute®, seguido de homogeneização por inversão. Para a leitura no luminômetro, 100 µL da solução de Luminase® foram adicionados a um tubo de ensaio, seguidos da adição de 100 µL da amostra diluída. Após homogeneização suave, a emissão de luz foi registrada em luminômetro, sendo o resultado expresso em unidades relativas de luminescência (RLU).

A concentração de ATP total presente no biofilme foi calculada de acordo com a Equação 2, considerando a área superficial do cupom analisado.

$$tATP (pg \text{ ATP} / cm^2) = \frac{RLU_{tATP} \times 50000}{RLU_{ATP1} \times \text{área} (cm^2)} \quad \text{Equação 2}$$

Em que RLU_{tATP} corresponde ao valor de luminescência obtido para a amostra analisada, RLU_{ATP1} representa o valor de referência obtido durante a calibração da enzima no luminômetro, e a área corresponde à área superficial do cupom utilizado na análise.

4.9.3. Estimativa de células planctônicas e aderidas por NMP

A estimativa de células viáveis aderidas ao biofilme formado sobre os cupons metálicos foi realizada também pelo método do número mais provável (NMP). Para o desprendimento das células aderidas, cupons em triplicata foram inicialmente

lavados rapidamente três vezes em salina redutora, com pH ajustado para $7,6 \pm 0,2$. A solução foi preparada em água do mar contendo 0,124 g de tioglicolato de sódio, 0,1 g de ácido ascórbico e 4 mL de resazurina a 0,025%. com o objetivo de remover células não aderidas. Em seguida, os cupons foram transferidos para frascos de penicilina contendo 10 mL de salina redutora anaeróbia. Os frascos foram imediatamente vedados para evitar a entrada de oxigênio e preservar as condições anaeróbias da amostra. Posteriormente, os frascos foram submetidos à sonicação em banho de ultrassom (Cristófoli®), utilizando três ciclos de 1 minuto, com o objetivo de promover o desprendimento das células presentes no biofilme.

Após a sonicação, alíquotas de 1 mL da suspensão obtida foram submetidas a diluições seriadas em salina redutora. Em seguida, 1 mL de cada diluição foi inoculado em triplicata em frascos contendo 9 mL de meio de cultura anaeróbio Postgate E, bem como em frascos contendo meio BANHT, ambos suplementados com tioglicolato de sódio.

4.9.3 Quantificação dos microrganismos por qPCR

Inicialmente, foi realizada a padronização das reações de qPCR utilizando o SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad). As reações foram preparadas em volume final de 12 μ L, contendo 1X do supermix EvaGreen, primers forward e reverse na concentração final de 200 nM e 2 μ L de DNA molde.

Para a quantificação dos microrganismos, foram utilizados primers específicos para o gene 16S rRNA, empregado como marcador de bactérias totais, e para o gene *dsrA*, utilizado como marcador de bactérias redutoras de sulfato (BRS).

A quantificação absoluta foi realizada por meio da construção de curvas padrão para cada gene alvo, estabelecendo a relação entre os valores de Ct e o número de cópias dos genes. Para isso, foram utilizadas diluições seriadas em base 10, abrangendo uma faixa de concentração de $3,0 \times 10^7$ a $3,0 \times 10^3$ cópias/ μ L.

As reações foram conduzidas em equipamento de PCR em tempo real (Eco Real-Time PCR, Illumina Inc.), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 62 °C por 90 segundos.

As reações foram organizadas em placas independentes para cada conjunto de primers, com volumes ajustados de acordo com o número de amostras analisadas em cada ensaio. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os

valores de Ct obtidos foram utilizados para a determinação do número de cópias dos genes alvo nas amostras, com base nas respectivas curvas padrão.

4.9.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para a avaliação dos biofilmes bacterianos, permitindo a visualização em alta resolução da estrutura tridimensional e da organização espacial dessas comunidades microbianas. Para a realização das análises por MEV, foi empregada uma adaptação do protocolo descrito por Ribeiro et al. (2018).

Os cupons contendo biofilmes foram imediatamente lavados em PBS 1X e submetidos ao processo de fixação química. A solução fixadora foi preparada inicialmente pela dissolução de 0,35 g de ácido tânico em 10 mL de PBS 1X, sob aquecimento (35–40 °C). Após completa dissolução, foram adicionados 7,0 mL da solução estoque de Alcian Blue a 1,5% (p/v). Em seguida, foram incorporados 47 mL de paraformaldeído (PFA) a 3,7% (v/v) e 3,5 mL de glutaraldeído a 50% (v/v). O volume final da solução foi ajustado para 70 mL com PBS 1×, obtendo-se 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 submersos nessa solução e mantidos sob refrigeração a 4 °C durante 24 horas, garantindo a preservação estrutural do biofilme. Posteriormente, as amostras foram submetidas a três lavagens consecutivas com PBS 1x (5 minutos cada), seguidas de uma rápida lavagem em água destilada (10–20 segundos). Após essa etapa, o excesso de líquido foi removido cuidadosamente por contato da borda do cupom com papel absorvente.

A desidratação das amostras foram realizadas por meio de uma série crescente de concentrações de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 95% e 100%), permanecendo 10 min em cada solução. Em seguida, realizou-se a substituição do solvente por meio da imersão das amostras em solução de hexametildisilazano:etanol (1:1) por 10 minutos, seguida de uma etapa final em HMDS 100% por 10 minutos. Após esse procedimento, os cupons foram deixados para secagem ao ar em capela de exaustão por aproximadamente 30–45 minutos e, posteriormente, mantidos em desumidificador a vácuo contendo sílica até a realização da metalização.

Para a etapa de metalização, os cupons foram montados em suportes metálicos (stubs) utilizando fita dupla face e posteriormente recobertos com uma fina

camada de ouro em metalizador (Quorum® Q150R S) como demonstra a figura 4. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura FEG Jeol IT700 HRLA, localizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).



Figura 5. Cupons metálicos montados em *stubs* e recobertos com ouro para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.9.5 Perfilometria óptica

A análise por perfilometria óptica foi realizada com o objetivo de avaliar a topografia superficial dos biofilmes formados sobre os cupons metálicos, bem como quantificar parâmetros de rugosidade da superfície. Para essa etapa, os cupons previamente lavados em PBS 1x foram fixados em solução de paraformaldeído a 3,7% por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes por imersão em PBS 1x e posteriormente deixadas para secagem ao ar. Uma vez secos, os cupons foram mantidos em desumidificador a vácuo contendo sílica até o momento das análises.

A caracterização da superfície foi realizada utilizando um perfilômetro óptico 3D (Contour GTK, Bruker), baseado no princípio de interferometria de luz, que permite a obtenção de mapas topográficos tridimensionais da superfície analisada. A partir das diferenças nos caminhos ópticos da luz refletida pela amostra, o equipamento reconstrói a morfologia da superfície, possibilitando a avaliação detalhada das irregularidades associadas à presença do biofilme. As análises foram conduzidas no Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para cada cupom, três regiões distintas e selecionadas aleatoriamente da superfície foram analisadas.

4.9.6 Perda de massa e taxa de corrosão

A perda de massa dos cupons metálicos foi determinada pela diferença entre a massa inicial e a massa final dos cupons após o período de exposição ao experimento. Para a remoção dos produtos de corrosão aderidos à superfície, os cupons foram submetidos a um procedimento de limpeza química conforme a norma ISO 8407:2009, utilizando solução específica para aço carbono composta por ácido clorídrico (HCl) a 50% (v/v) contendo 3,5 g de hexametenotetramina como inibidor de corrosão.

Os cupons foram submersos nessa solução por um período de 10 a 20 minutos, dependendo do grau de corrosão observado na superfície. Após a limpeza, os cupons foram removidos da solução, lavados com água destilada, secos à temperatura ambiente e posteriormente pesados em balança analítica para determinação da massa final.

A taxa de corrosão foi calculada de acordo com a norma ASTM G1-03, utilizando a Equação 3:

$$\frac{K \times W}{A \times T \times D} \text{ Equação 3}$$

Em que K é uma constante de conversão ($8,74 \times 10^4$), W corresponde à perda de massa do cupom (g), A representa a área exposta do metal (cm²), T corresponde ao tempo de exposição (h) e D representa a densidade do material (g/cm³).

4.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® 8, com o uso do teste t não pareado para comparar o grupo controle e o tratamento, considerando significativo um valor de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção dos bacteriófagos e composição dos coquetéis fágicos

Os bacteriófagos utilizados neste estudo foram selecionados com base em seus respectivos hospedeiros bacterianos e potencial de aplicação no controle de comunidades microbianas complexas. A composição dos coquetéis fágicos foi

definida visando a combinação de vírus com diferentes espectros de infecção, buscando ampliar a atuação sobre diferentes grupos bacterianos presentes no biofilme.

No total, foram utilizados bacteriófagos previamente isolados a partir de diferentes hospedeiros, incluindo *Klebsiella variicola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* e *Citrobacter freundii*. A distribuição dos fagos entre os coquetéis foi realizada de forma estratégica, permitindo tanto a diversidade de hospedeiros quanto a sobreposição parcial de fagos entre os diferentes coquetéis.

A composição dos coquetéis fágicos e seus respectivos hospedeiros bacterianos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Bacteriófagos utilizados no estudo, seus respectivos hospedeiros bacterianos e a composição dos coquetéis fágicos empregados nos ensaios experimentais.

Fago	Hospedeiro bacteriano	Coquetel 1	Coquetel 2	Coquetel 3
KV3	<i>Klebsiella variicola</i> (26E)	x		x
KP6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (58B)		x	x
KP7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (58B)	x		
KP8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (58B)	x	x	
KP9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (58B)		x	
SHIG	<i>Shigella flexneri</i>	x		x
CIT1	<i>Citrobacter freundii</i>		x	x

5.2 Ensaios preliminares de biofilme em placa

A avaliação comparativa dos coquetéis fágicos evidenciou diferenças no desempenho das formulações frente às culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato (BRS). Foram analisadas 16 culturas mistas provenientes de amostras coletadas em uma plataforma de exploração de petróleo, as quais foram identificadas por letras, de A a P, para facilitar a apresentação e discussão dos resultados. Para parte dessas culturas, havia informações adicionais referentes ao local específico de coleta e outras características da amostra, enquanto para as demais essas informações não estavam disponíveis. Essa abordagem permitiu uma avaliação abrangente da eficácia dos coquetéis fágicos em diferentes composições microbianas

Dentre as formulações testadas, o Coquetel 1 destacou-se por apresentar o melhor desempenho global, promovendo as maiores reduções na biomassa de biofilme para o ensaio de controle. Em grande parte das culturas avaliadas, observou-se diferença estatisticamente significativa em relação aos demais tratamentos, indicando maior eficiência desta formulação.

A Figura 5 apresenta o desempenho do Coquetel 1 em três culturas mistas representativas, selecionadas dentre as 16 avaliadas, evidenciando seu impacto expressivo na redução da biomassa aderida. Cada gráfico corresponde a uma cultura independente (Cultura A, B e C), escolhidas por representarem diferentes perfis de resposta ao tratamento.

Com base nos resultados obtidos do controle, o Coquetel 1 foi selecionado para a condução dos ensaios em escala de tanque, utilizando uma cultura mista padrão. Essa escolha foi fundamentada em sua maior eficiência e consistência de resposta frente à diversidade microbiana avaliada, sugerindo elevado potencial de aplicação em sistemas mais complexos.

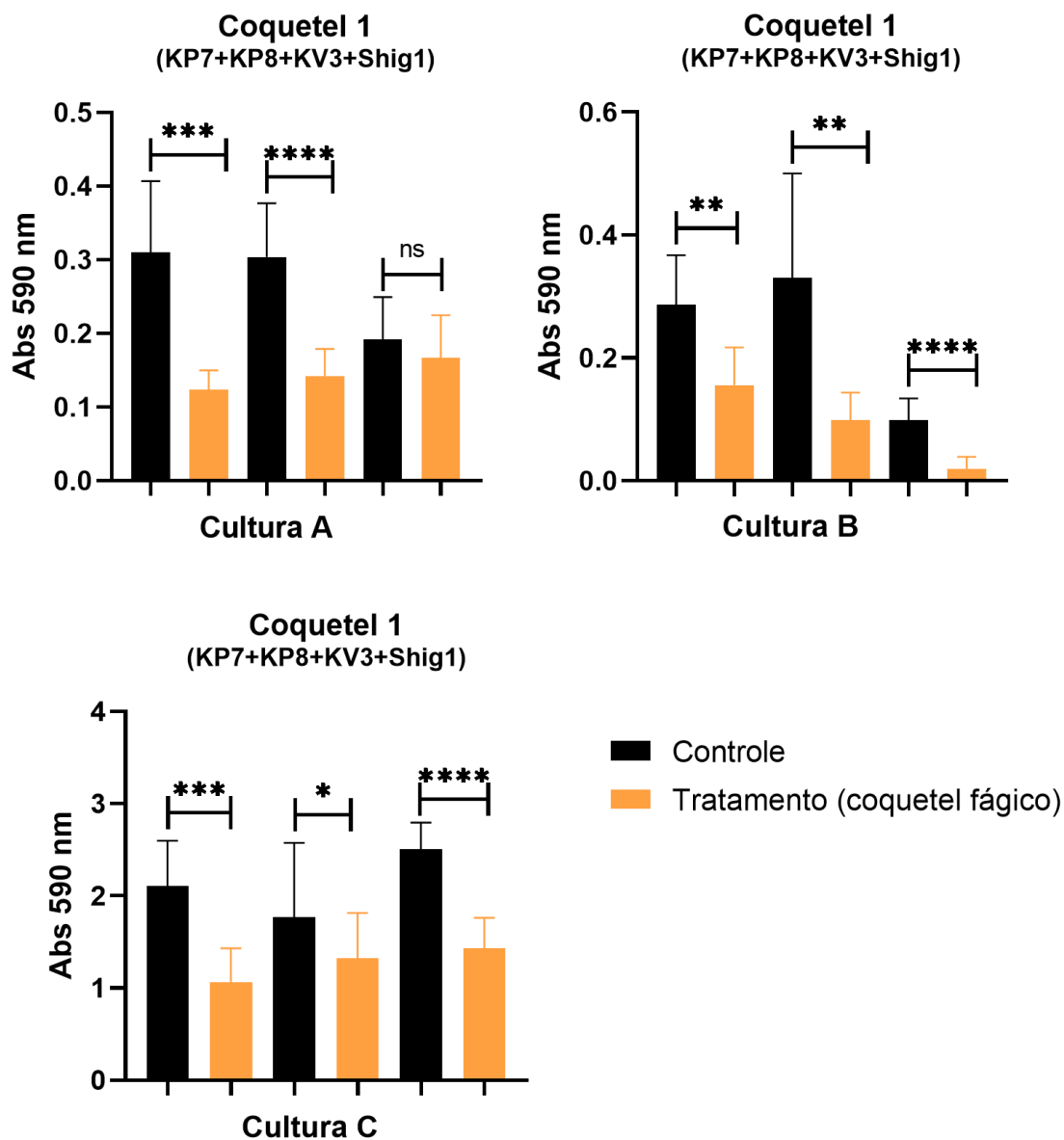
A

Figura 6. Avaliação do efeito do Coquetel 1 sobre a biomassa de biofilme em três culturas bacterianas mistas distintas de BRS. Cada gráfico representa uma cultura mista independente (Cultura A, B e C), selecionadas dentre as 16 culturas avaliadas. Os valores correspondem à média de triplicatas experimentais, com barras de erro indicando o desvio padrão.

5.3 Crescimento microbiano no sistema de tanques

A leitura de (DO_{600}) foi utilizada para o monitoramento da dinâmica de crescimento microbiano ao longo do experimento, permitindo a avaliação comparativa entre os tanques controle e tratamento.

Nos estágios iniciais do experimento, ambos os sistemas apresentaram aumento progressivo da densidade celular, indicando o estabelecimento e adaptação da comunidade microbiana às condições do meio (Figura 6). Esse comportamento era o esperado, refletindo a atividade metabólica inicial e a disponibilidade de substratos.

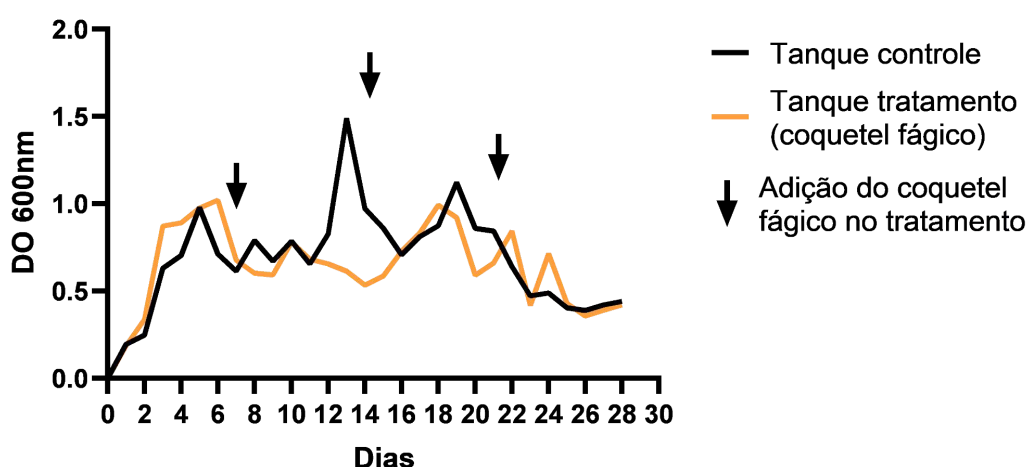


Figura 7. Curva DO_{600nm} pela cultura mista de bactérias redutoras de sulfato em sistema de tanques na ausência (controle) e presença (tratamento) do coquetel fágico.

Durante os primeiros dias, até o 7º dia, ambos os sistemas apresentaram comportamento semelhante, com aumento progressivo da densidade óptica. Esse crescimento inicial pode estar associado, em parte, à atividade de microrganismos aeróbios ou facultativos presentes na cultura mista, que contribuem para o consumo de oxigênio e favorecem o estabelecimento de condições mais anaeróbias no sistema.

O coquetel fágico 1 foi aplicado no 7º, 14º e 21º dia, e observou-se que seu efeito ocorreu de forma progressiva ao longo do experimento. Após a primeira aplicação, no 7º dia, não foi observada uma redução imediata acentuada da DO_{600nm} . No entanto, entre o 10º e o 14º dias, verificou-se uma diminuição mais pronunciada da densidade óptica no tanque tratamento em relação ao controle,

indicando um efeito tardio do coquetel sobre a comunidade microbiana. Após a segunda aplicação, realizada no 14º dia, observou-se um novo aumento nos valores de DO_{600} nm no sistema tratado. Esse comportamento pode estar relacionado à natureza complexa da cultura mista, na qual microrganismos não suscetíveis aos fagos podem ter se beneficiado da redução de competidores, retomando o crescimento.

Apesar desse aumento pontual, os valores de DO_{600} nm no tanque tratamento permaneceram inferiores aos do controle na maior parte do experimento. Após a terceira aplicação, no 21º dia, observa-se novamente uma tendência de redução e estabilização da densidade óptica, sugerindo um efeito acumulativo do coquetel fágico ao longo do tempo.

De modo geral, a aplicação do coquetel fágico promoveu uma redução discreta no crescimento microbiano ao longo do experimento. Considerando todo o período experimental, a densidade óptica média (DO_{600}) do sistema tratado foi 4,2% inferior à observada no controle.

5.4 Produção de H_2S

A Figura 7 apresenta a variação da concentração de sulfeto de hidrogênio (H_2S) ao longo de 28 dias nos tanques controle e tratamento.

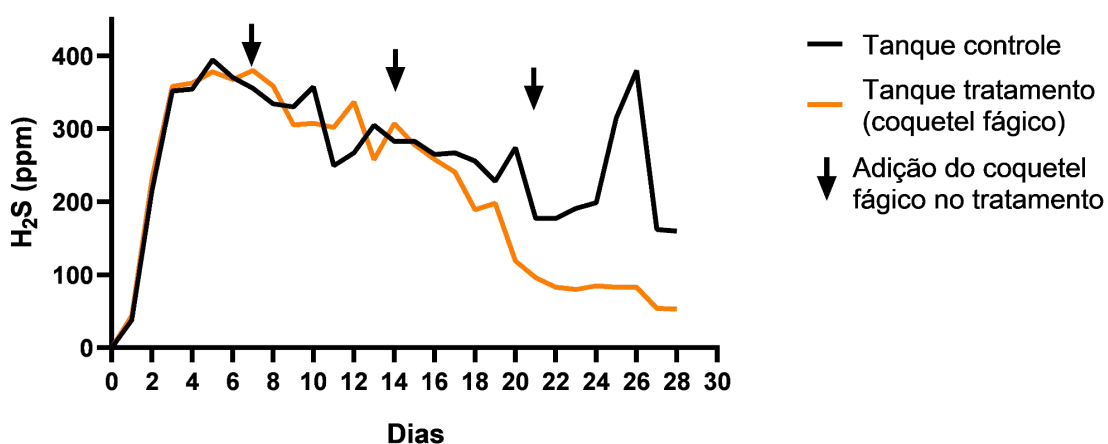


Figura 8. Curva de produção de H₂S pela cultura mista de bactérias redutoras de sulfato que ocorreu durante 28 dias em sistema de tanques na ausência (controle) e presença (tratamento) do coquetel fágico, adicionado em intervalo de tempos o qual a seta indica.

Nos primeiros dias do experimento, observou-se um aumento acentuado na concentração de H₂S em ambos os sistemas, indicando o estabelecimento da atividade das bactérias redutoras de sulfato (BRS). A partir do 3º dia, os níveis de H₂S já atingiam valores superiores a 300 ppm, mantendo-se elevados até aproximadamente o 7º dia, quando foram observados os maiores valores ao longo do experimento.

Após esse período inicial de crescimento, verificou-se uma tendência geral de redução gradual na concentração de H₂S ao longo do tempo. Essa diminuição ocorreu de forma contínua, com pequenas oscilações ao longo dos dias subsequentes.

O coquetel fágico foi aplicado no 7º, 14º e 21º dias, e, a partir dessas aplicações, observou-se a tendência de queda nos níveis de H₂S no sistema, principalmente nos tanques de tratamento. A diferença entre os tratamentos tornou-se mais evidente após o 14º dia, quando o tanque controle apresentou aumento nos valores, enquanto o tanque de tratamento manteve-se relativamente constante.

Considerando todo o período experimental, a concentração média de H₂S foi de 260,08 ppm no controle e 213,76 ppm no tratamento, correspondendo a uma redução média de 17,8% promovida pela aplicação do coquetel fágico. Ao final do experimento, ambos os sistemas apresentaram concentrações inferiores às observadas na fase inicial; entretanto, o tratamento atingiu valores finais de aproximadamente 53 ppm, enquanto o controle permaneceu em torno de 160 ppm, representando uma redução de 66,9% na concentração de H₂S em relação ao controle no 28º dia.

5.5 Quantificação microbiológica (NMP)

As células planctônicas viáveis foram quantificadas ao longo de três períodos experimentais, correspondentes ao momento da inoculação inicial (tempo 0), aos 14 dias e aos 28 dias de experimento (Figura 9 A–C).

No tempo 0, da cultura (Figura 9 A), os valores de NMP foram elevados e semelhantes entre os sistemas controle e tratamento, indicando condições iniciais equivalentes para o estabelecimento da comunidade microbiana.

A presença de resultados positivos no ensaio de NMP foi evidenciada pela formação de precipitado escuro nos frascos, característica associada à atividade de bactérias redutoras de sulfato (Figura 8).



Figura 9. Exemplo de frasco do ensaio de Número Mais Provável (NMP) com resultado positivo para bactérias redutoras de sulfato (BRS), evidenciado pela formação de precipitado escuro no meio de cultura.

Aos 14 dias (Figura 9 B), os valores de NMP permaneceram próximos entre os grupos, com discretas variações entre os tanques avaliados.

Ao final de 28 dias (Figura 9 C), observou-se uma leve redução na densidade de células planctônicas, mais evidente no sistema tratado com o coquetel fágico quando comparado ao controle.

Apesar dessa tendência de redução, a análise estatística não indicou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

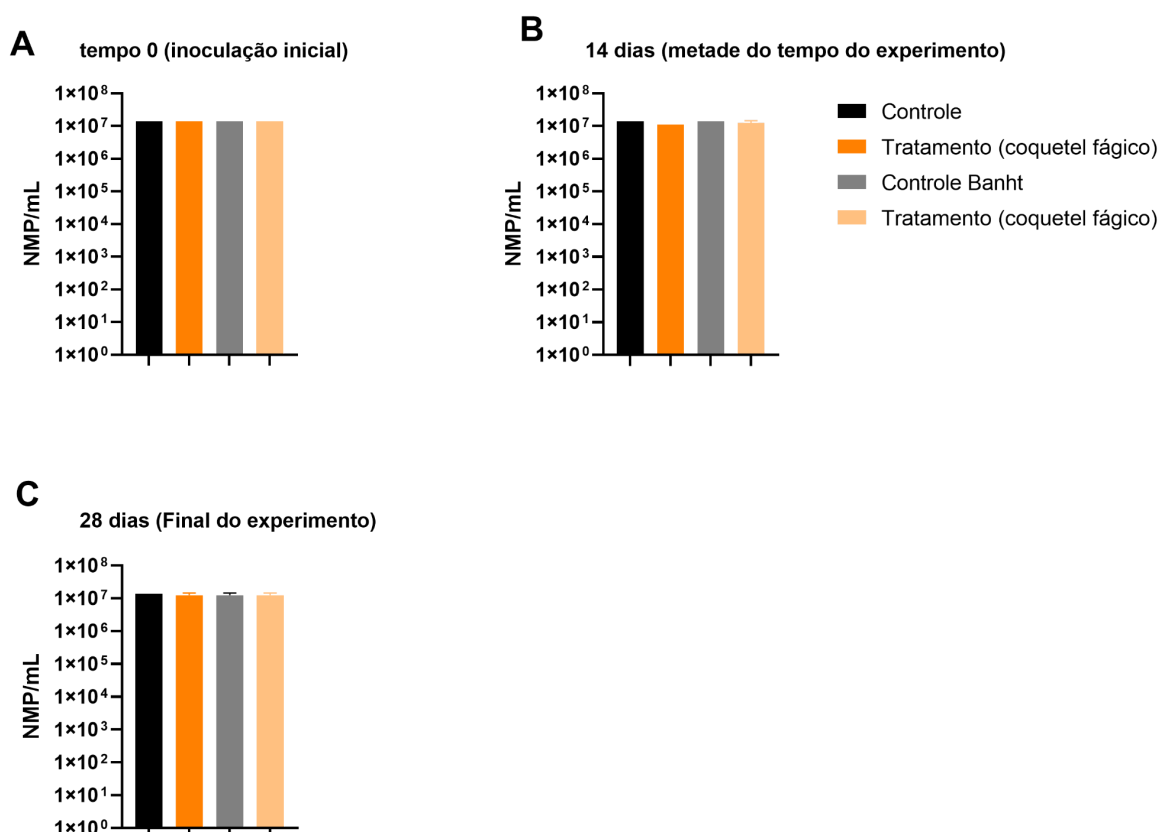


Figura 10. Quantificação de células planctônicas viáveis por meio do método do Número Mais Provável (NMP) em sistema de tanques inoculados com cultura mista. Avaliação realizada em três períodos experimentais: (A) tempo 0 (inoculação inicial), (B) 14 dias e (C) 28 dias, na ausência (controle) e na presença de coquetel fágico. Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

De modo geral, os valores de NMP obtidos para as células aderidas ao cupom (Figura 10) foram inferiores aos observados para as células planctônicas. Além disso, observou-se uma tendência de redução no sistema tratado com o coquetel fágico em comparação ao controle, especialmente para as bactérias quantificadas em meio BaNHT.

Apesar dessa redução aparente, a análise estatística por teste t não indicou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), tanto para as BRS quanto para as demais bactérias da cultura mista.

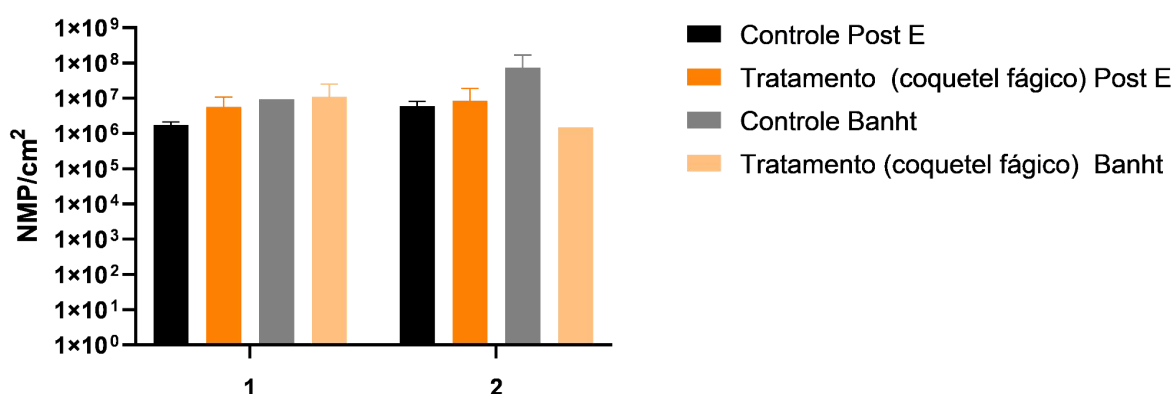


Figura 11. Quantificação de células viáveis por NMP no biofilme aderido aos cupons metálicos após 28 dias de experimento. As células foram recuperadas por sonicação em 10 mL de solução. A quantificação foi realizada em meio Postgate E, para bactérias redutoras de sulfato (BRS), e em meio BaNHT, para as demais bactérias da cultura mista, na ausência (controle) e presença de coquetel fágico. Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

5.6 Quantificação molecular (qPCR)

A quantificação por qPCR evidenciou diferenças na abundância bacteriana entre os tanques controle e os submetidos ao tratamento com o coquetel fágico (Figura 11).

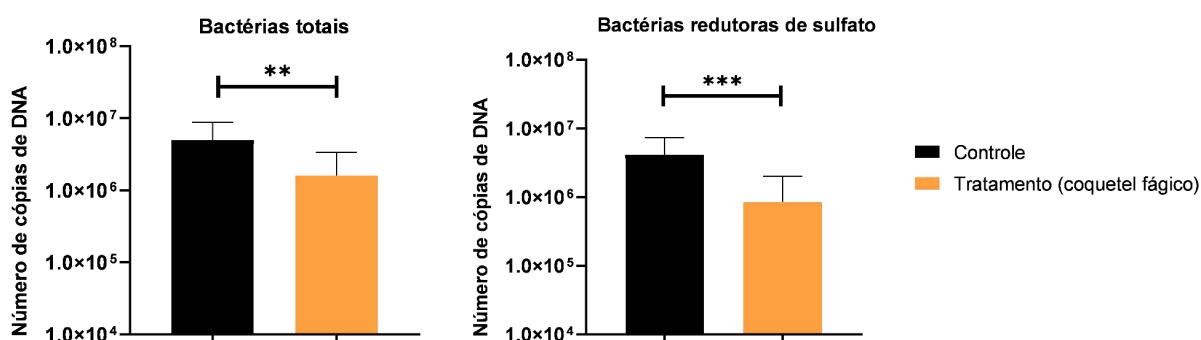


Figura 12. Quantificação de bactérias totais e bactérias redutoras de sulfato (BRS) nos tanques controle e tratamento, determinada por qPCR.

Para as bactérias totais, os valores médios observados foram de $4,94 \times 10^6$ cópias no grupo controle e $1,59 \times 10^6$ cópias no grupo tratado, correspondendo a

uma redução aproximada de 67,8%. Essa diferença foi estatisticamente significativa (teste t não pareado, $p = 0,0020$).

De forma semelhante, observou-se redução na abundância de bactérias redutoras de sulfato (BRS), com valores médios de $4,10 \times 10^6$ cópias no controle e $8,48 \times 10^5$ cópias no tratamento, representando uma diminuição de aproximadamente 79,3%. Essa diferença também foi estatisticamente significativa (teste t não pareado, $p = 0,0003$).

Em conjunto, os resultados indicam que o tratamento com o coquetel fágico promoveu redução significativa tanto da abundância bacteriana total quanto da população de BRS no sistema avaliado

5.7 Atividade metabólica do biofilme (ATP)

O ATP total reflete a atividade metabólica global da comunidade microbiana presente no sistema, abrangendo microrganismos aeróbios e anaeróbios. Para a quantificação do ATP associado ao biofilme. A figura 12 mostra a quantificação de ATP no biofilme formado em cupons após 28 dias.

O biofilme do tanque controle apresentou valores médios de aproximadamente 3330 pg ATP/cm², enquanto o sistema tratado com o coquetel fágico apresentou cerca de 2378 pg ATP/cm², correspondendo a uma redução de aproximadamente 30% (Figura 12). No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa

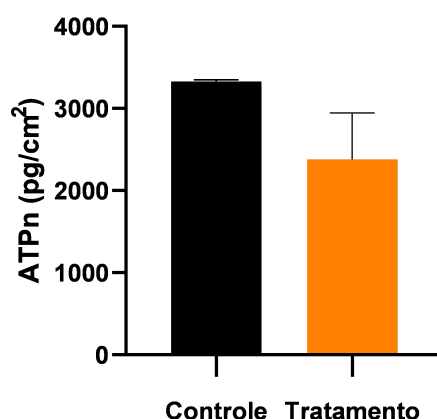


Figura 13. Quantificação de ATP (pg ATP/cm²) em biofilmes formados sobre cupons metálicos após 28 dias em sistema de tanques

5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar o biofilme formado nos cupons metálicos após 28 dias de experimento, permitindo observar diferenças na morfologia superficial e na organização estrutural entre os tanques controle e tratamento (Figura 13).

Nos cupons do tanque controle (Figura 13A, C, E e G), observa-se uma cobertura mais densa e contínua da superfície. Em menor aumento (Figura 13A), é evidente a presença de uma camada espessa de biofilme recobrindo o material metálico. Em aumento intermediário (Figura 14C), destacam-se estruturas tridimensionais bem definidas. Em maior ampliação (Figura 14E), observa-se a presença de estruturas com morfologia complexa, sugestivas de matriz extracelular organizada. No maior aumento avaliado (Figura 13G), essas estruturas apresentam alto grau de organização, com arranjos compactos e interconectados, característicos de biofilmes maduros.

Em contraste, os cupons do tanque tratamento (Figura 13B, D, F e H) apresentam menor cobertura e organização estrutural reduzida. Em menor aumento (Figura 13B), observa-se uma distribuição mais heterogênea e descontínua do biofilme. Em aumento intermediário (Figura 13D), há predominância de pequenos agrupamentos celulares, com menor formação de estruturas tridimensionais. Na ampliação de 5.000× (Figura 13F), observa-se a presença de células mais dispersas e com menor integração à matriz, sendo possível identificar estruturas menos organizadas, como destacado pela seta. No maior aumento (Figura 13H), predominam células isoladas ou em pequenos agrupamentos, com ausência de arranjos estruturais complexos.

As descontinuidades e fissuras observadas na superfície dos cupons que podem ser observadas na figura 13E apontada pela seta, estão associadas ao processo de preparação das amostras, especialmente à etapa de desidratação, não sendo necessariamente decorrentes da atividade microbiana.

De modo geral, os resultados evidenciam diferenças na estrutura e densidade do biofilme entre os sistemas avaliados, sendo observada uma formação mais densa, organizada e estruturalmente complexa no tanque controle, em comparação ao sistema submetido ao coquetel fágico.

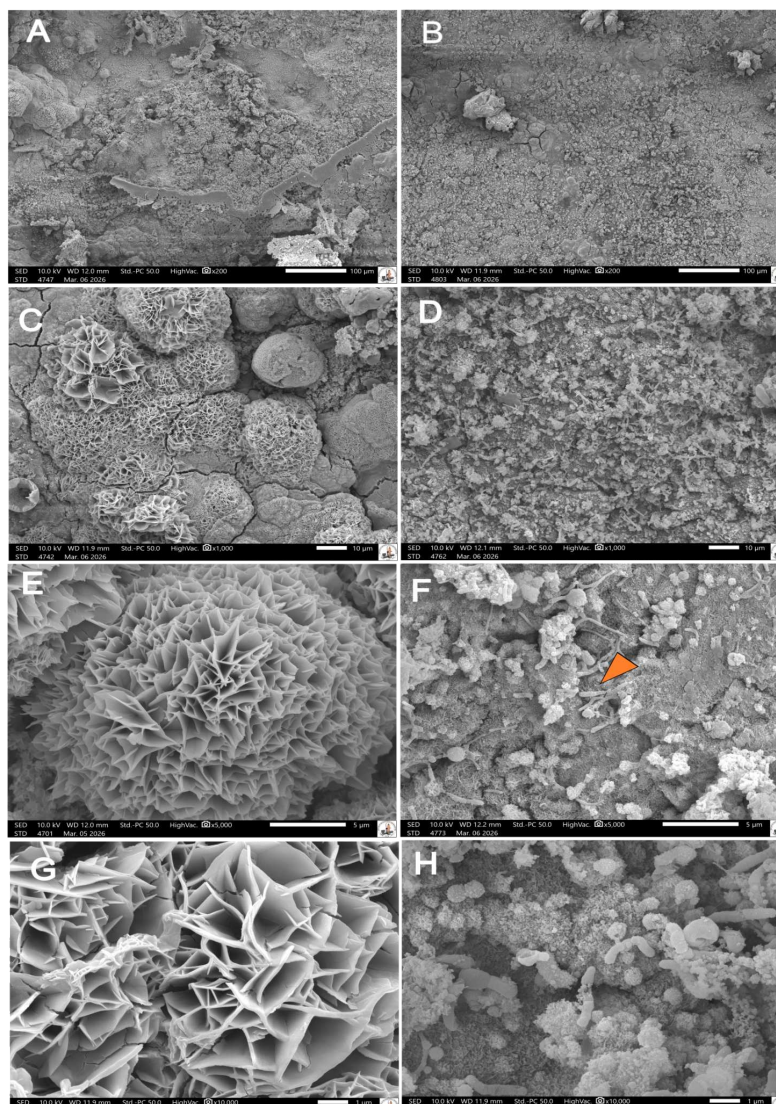


Figura 14. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de cupons metálicos após 28 dias de experimento. (A, C, E, G) Tanque controle; (B, D, F, H) Tanque tratamento. As imagens correspondem a diferentes ampliações: 200× (A, B), 1.000× (C, D), 5.000× (E, F) e 10.000× (G, H).

5.9 Perfilometria

A topografia dos cupons foi avaliada por perfilometria óptica (Figura 14). Nesta análise, o parâmetro de rugosidade quadrática média (R_q) foi escolhido para a avaliação dos resultados, por apresentar maior sensibilidade a picos e vales acentuados em comparação à rugosidade média (R_a), uma vez que o cálculo ao quadrado amplifica desvios mais elevados.

As imagens evidenciam uma distribuição heterogênea de irregularidades na superfície, com regiões de picos e vales representadas por variações de cor. De

modo geral, não foram observadas diferenças visuais marcantes entre os cupons dos tanques controle e tratamento, indicando comportamento superficial semelhante entre os sistemas.

Os perfis lineares obtidos ao longo dos eixos X e Y (Figura 14, C e D) corroboram essa observação, apresentando variações de altura comparáveis entre as amostras. Os valores dos parâmetros de rugosidade também refletiram essa tendência (Tabela 2), com resultados próximos entre controle e tratamento após 28 dias de exposição.

Apesar das pequenas variações numéricas nos parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, indicando que o tratamento com coquetel fágico não promoveu alterações relevantes na topografia superficial dos cupons nas condições analisadas.

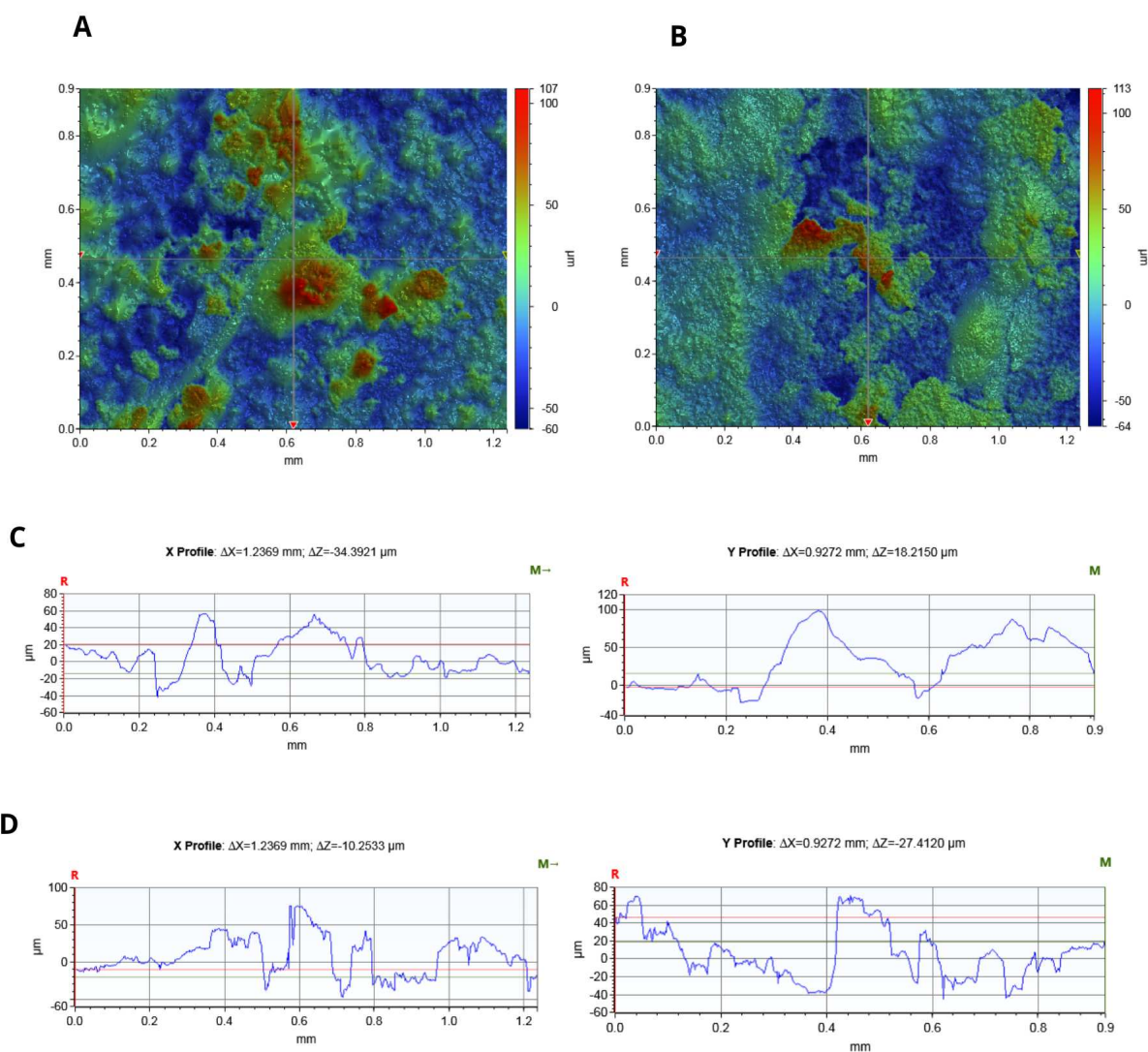


Figura 15. Análise da topografia superficial dos cupons metálicos por perfilometria óptica após 21 dias de exposição. (A) Mapa de superfície do cupom do tanque controle. (B) Mapa de superfície do cupom do tanque tratamento. (C) Perfis de rugosidade ao longo dos eixos X e Y para o controle. (D) Perfis de rugosidade ao longo dos eixos X e Y para o tratamento. A escala de cores representa a variação de altura da superfície, em que os tons de azul indicam as regiões mais baixas (vales) e os tons de vermelho representam as regiões mais elevadas (picos), enquanto as cores intermediárias correspondem a alturas intermediárias.

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de rugosidade superficial (μm) dos cupons metálicos dos tanques controle e tratamento após 28 dias de exposição.

Rugosidade da superfície (μm)	Tanque – Controle	Tanque – Tratamento
Rugosidade média (R_a)	15,52	14,87
Altura máxima do pico (R_p)	112,74	106,35
Raiz quadrada média (R_q)	23,03	22,06
Total (pico + vale) (R_t)	176,28	198,01
Profundidade média do vale (R_v)	-52,91	-54,90

5.10 Perda de massa e taxa de corrosão

Os gráficos de perda de massa e taxa de corrosão dos cupons metálicos após 28 dias de experimento demonstraram uma leve diferença entre os tanques controle e tratamento (Figura 15). A perda de massa no tanque controle apresentou valor médio de aproximadamente 0,06 g, enquanto no tanque tratado com coquetel fágico observou-se redução para cerca de 0,03 g.

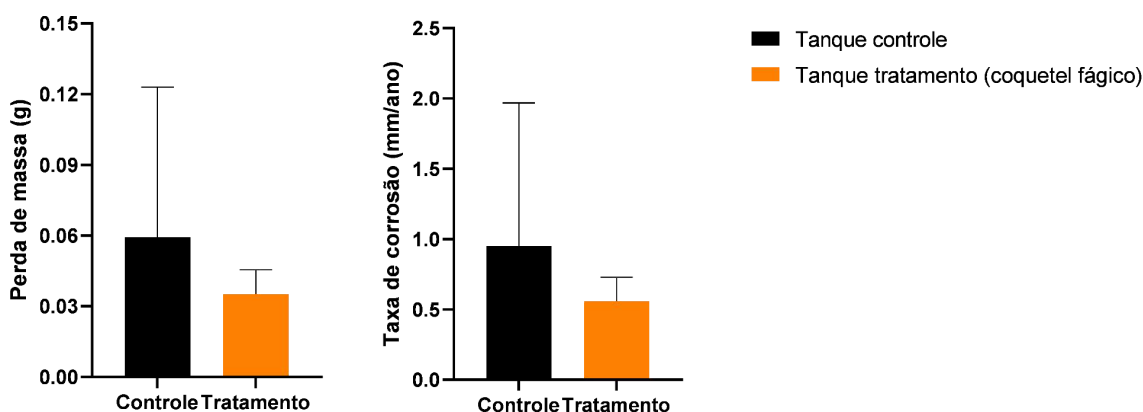


Figura 16. Perda de massa (g) e taxa de corrosão (mm/ano) em cupons metálicos após 28 dias de experimento em tanques.

De forma semelhante, a taxa de corrosão também apresentou valores mais elevados no controle, atingindo aproximadamente 0,95 mm/ano, enquanto o tratamento apresentou taxa reduzida, em torno de 0,55 mm/ano. Esses resultados indicam uma tendência de menor intensidade de corrosão no sistema submetido ao coquetel fágico. No entanto, apesar da redução observada no sistema tratado, a análise estatística não indicou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A redução da biomassa do biofilme, inicialmente observada nos ensaios em placas sob condições de anaerobiose, foi determinante para a progressão deste estudo para experimentos em maior escala, evidenciando o potencial do coquetel fágico no controle de comunidades microbianas complexas. Esse efeito pode estar relacionado à ação indireta dos bacteriófagos sobre a estrutura do biofilme, uma vez que a lise de bactérias suscetíveis pode alterar a organização da comunidade microbiana e comprometer a integridade do EPS, favorecendo a dispersão do biofilme mesmo quando nem todos os microrganismos presentes são diretamente infectados pelos fagos (Sutherland et al., 2004; Harper et al., 2014; Chan & Abedon, 2013).

Além disso, muitos bacteriófagos codificam enzimas, como depolimerases, capazes de degradar componentes da matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), promovendo a desorganização estrutural do biofilme e expondo as células a condições ambientais adversas (Guo et al., 2023;

Mayorga-Ramos et al., 2024). Esse mecanismo tem sido amplamente descrito na literatura como uma das principais vias de atuação de bacteriófagos em biofilmes, contribuindo não apenas para a redução da biomassa aderida, mas também para o aumento da suscetibilidade microbiana a outros agentes de controle, especialmente em decorrência da degradação da matriz de substâncias poliméricas extracelulares e da desestruturação da estrutura do biofilme (Min et al., 2024; Chen et al., 2022; Chang et al., 2022). Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que o coquetel fágico atuou predominantemente na desestruturação do biofilme, ao invés de promover exclusivamente a eliminação direta das células bacterianas, como evidenciado nos ensaios iniciais.

O crescimento microbiano observado nos tanques, avaliado por meio da densidade óptica (DO_{600}), apresentou um comportamento esperado durante as etapas iniciais do experimento. Até o quarto dia, a semelhança entre os sistemas controle e tratamento indica que o estabelecimento da comunidade microbiana ocorreu de forma equivalente, sendo influenciado principalmente pela disponibilidade de nutrientes e pelas condições físico-químicas do meio. Esse comportamento é característico de comunidades mistas em fase inicial de colonização, nas quais microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos consomem o oxigênio dissolvido e promovem a formação de gradientes redox, favorecendo o estabelecimento de microambientes anaeróbios que possibilitam o desenvolvimento e a atividade metabólica das bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Lackner et al., 2020)

A ausência de uma redução imediata da DO_{600} após a primeira aplicação do coquetel fágico que ocorreu no sétimo dia, seguida por uma diminuição mais pronunciada entre o 10º e o 14º dias, sugere um efeito tardio da ação viral sobre a comunidade microbiana. Esse comportamento pode estar relacionado ao tempo necessário para que os bacteriófagos se propaguem, caso infectem alguma célula dessa cultura mista e atinjam densidades suficientes para impactar a população bacteriana.

A manutenção de valores de DO_{600} inferiores no sistema tratado ao longo da maior parte do experimento, associada à tendência de estabilização após aplicações sucessivas, sugere um efeito cumulativo do coquetel fágico sobre a dinâmica microbiana. Em conjunto, esses resultados indicam que o tratamento não promoveu uma eliminação imediata da população bacteriana, mas atuou na modulação da estrutura e das interações da comunidade, reforçando a hipótese de que a principal

ação do coquetel esteja relacionada à reorganização do sistema microbiano, mais do que à ação bactericida direta.

A produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), utilizada como indicador da atividade metabólica das bactérias redutoras de sulfato (BRS), a qual foi acompanhada por meio da titulação, apresentou um comportamento “dinâmico” ao longo do experimento, refletindo tanto o estabelecimento inicial da comunidade quanto a influência do tratamento aplicado. O aumento acentuado observado nos primeiros dias, com valores superiores a 300 ppm já a partir do 3º dia e pico próximo ao 7º dia, indica a rápida ativação do metabolismo redutor de sulfato, favorecida pelas condições anaeróbias e pela disponibilidade de substratos no sistema. Esse padrão inicial é esperado em culturas mistas, nas quais a atividade das BRS se intensifica após a adaptação ao ambiente e a consolidação de microambientes anaeróbios (Rabus *et al.*, 2015; Enning; Garrelfs, 2014).

A partir desse período, observou-se uma tendência gradual de redução nos níveis de H_2S , que se tornou mais evidente após as aplicações do coquetel fágico, especialmente a partir do 14º dia. Esse comportamento sugere um efeito progressivo do tratamento sobre a atividade metabólica das bactérias redutoras de sulfato (BRS). Em sistemas de corrosão microbiologicamente influenciada, as BRS estão distribuídas tanto na fase planctônica quanto em biofilmes aderidos às superfícies, sendo ambas as populações capazes de contribuir para a produção de sulfeto. Assim, alterações na estrutura e na composição da comunidade microbiana podem refletir diretamente na produção de H_2S , mesmo quando a biomassa aderida não representa a maior fração da comunidade microbiana. Esse comportamento foi observado por Dutta *et al.* (2021), que verificaram que modificações na comunidade planctônica acompanharam a mitigação da produção de sulfeto e a dissociação de BRS de biofilmes em biorreatores industriais. Nesse contexto, a lise de bactérias suscetíveis promovida pelo coquetel fágico pode ter alterado as interações ecológicas da comunidade e reduzido indiretamente a atividade sulfetogênica das BRS, contribuindo para a diminuição da produção de H_2S .

Além disso, a redução observada ao longo do tempo pode estar associada à interferência nas interações microbianas estabelecidas na cultura mista. Em comunidades microbianas complexas, a atividade das bactérias redutoras de sulfato (BRS) depende das relações ecológicas e metabólicas com outros microrganismos, que influenciam a disponibilidade de nutrientes, a transferência de metabólitos e a

manutenção de condições favoráveis ao metabolismo sulfetogênico. Nesse contexto, a ação dos bacteriófagos sobre bactérias suscetíveis pode modificar a estrutura da comunidade e impactar indiretamente a atividade das BRS. Esse comportamento é consistente com os resultados obtidos por Santos et al. (2024), que demonstraram que a eficiência da infecção fágica em um consórcio contendo BRS depende das interações entre diferentes membros da comunidade microbiana, evidenciando que alterações em populações não diretamente infectadas podem repercutir sobre a dinâmica e a funcionalidade do consórcio. Dessa forma, a redução gradual dos níveis de H_2S ao longo do experimento sugere que o coquetel fágico promoveu uma diminuição da atividade sulfetogênica da comunidade microbiana. Embora as concentrações finais tenham sido inferiores a 100 ppm, esse valor ainda se encontra acima dos limites de exposição ocupacional adotados na indústria do petróleo e próximo à concentração considerada imediatamente perigosa à vida e à saúde (IDLH = 100 ppm), indicando que, nas condições avaliadas, o tratamento não foi suficiente para atingir níveis considerados seguros para os trabalhadores. Ainda assim, a redução observada demonstra o potencial do coquetel fágico como uma estratégia complementar para a mitigação da produção de H_2S e da corrosão microbiologicamente influenciada, sendo necessários estudos adicionais para otimizar sua eficiência e ampliar sua aplicabilidade em condições industriais.

A quantificação microbiológica por NMP e a análise molecular por qPCR permitiram uma avaliação complementar do comportamento da comunidade microbiana, evidenciando diferenças importantes. Os resultados de NMP indicaram que, embora tenha sido observada uma tendência de redução tanto nas células planctônicas quanto nas aderidas no sistema tratado, essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Esse comportamento pode estar relacionado à natureza do método, que estima apenas a fração de microrganismos viáveis capazes de crescer nas condições de cultivo empregadas, podendo subestimar a diversidade microbiana presente em culturas mistas complexas, especialmente em condições anaeróbias (Lee et al., 2021). Em contraste, a qPCR possibilita uma detecção mais sensível dos microrganismos-alvo, independentemente de sua cultivabilidade, sendo amplamente utilizada como ferramenta complementar para a caracterização de comunidades microbianas complexas (Zhang et al., 2021).

Por outro lado, a quantificação por qPCR revelou uma redução significativa tanto na abundância bacteriana total quanto na população de bactérias redutoras de

sulfato (BRS) no sistema tratado, indicando que o coquetel fágico foi capaz de impactar a densidade microbiana do sistema. A divergência entre os resultados obtidos por NMP e qPCR pode ser atribuída às diferenças inerentes às metodologias empregadas. Enquanto o NMP é um método dependente de cultivo e quantifica apenas a fração de microrganismos capaz de crescer nas condições experimentais, a qPCR apresenta maior sensibilidade para detectar variações na abundância dos grupos microbianos-alvo por meio da quantificação de DNA, permitindo evidenciar diferenças que podem não ser detectadas por métodos microbiológicos convencionais (Lee et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Em conjunto, esses resultados indicam que o coquetel fágico promoveu alterações relevantes na composição e na atividade da comunidade microbiana, mesmo que nem todas as diferenças tenham sido detectadas por métodos dependentes de cultivo. Dessa forma, a integração entre abordagens microbiológicas e moleculares se mostra essencial para uma compreensão mais abrangente dos efeitos do tratamento em sistemas complexos, como os avaliados neste estudo (Flemming et al., 2016; Mayorg et al., 2024).

A avaliação da atividade metabólica do biofilme, por meio da quantificação de ATP, demonstrou uma redução nos valores observados no sistema tratado em comparação ao controle, embora sem diferença estatisticamente significativa. Esse resultado sugere que, apesar da presença de células viáveis e metabolicamente ativas, houve uma tendência de diminuição da atividade global da comunidade microbiana aderida aos cupons. Ainda assim, quando analisados em conjunto com os demais parâmetros obtidos nos tanques, como a redução da abundância bacteriana e de BRS por qPCR, a diminuição da produção de H_2S e a menor taxa de corrosão observada no sistema tratado, os resultados de ATP reforçam a hipótese de que o coquetel fágico interferiu na atividade metabólica da comunidade microbiana. Embora a redução do ATP não tenha sido estatisticamente significativa de forma isolada, a concordância entre os diferentes parâmetros microbiológicos e físico-químicos indica um efeito global do tratamento sobre a funcionalidade do biofilme e sobre os processos associados à corrosão microbiologicamente influenciada.

As alterações morfológicas observadas nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), caracterizadas pela menor cobertura superficial e pela presença de uma estrutura de biofilme menos densa no sistema tratado,

reforçam os resultados obtidos nos ensaios de biomassa e sugerem que o coquetel fágico interferiu na organização do biofilme, comprometendo sua integridade estrutural. Esse efeito pode estar relacionado à ação de enzimas fágicas, como depolimerases, capazes de degradar componentes da matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), responsáveis pela coesão e proteção das células no biofilme. A degradação dessa matriz favorece a exposição das células às condições ambientais e dificulta a manutenção da estrutura tridimensional característica de biofilmes maduros (Pires et al., 2022; Mayorga et al., 2024).

Além disso, a redução na organização estrutural observada no sistema tratado pode estar associada à interferência nas interações microbianas que sustentam a formação do biofilme, especialmente em culturas mistas, nas quais diferentes espécies contribuem de forma sinérgica para a produção e manutenção da matriz extracelular. Dessa forma, a ação do coquetel fágico pode ter impactado não apenas a integridade física do biofilme, mas também sua organização estrutural, resultando em uma arquitetura mais dispersa e menos estável. Esse comportamento está de acordo com os resultados obtidos por Cunha (2021), que, ao desenvolver e avaliar diferentes coquetéis fágicos para o controle de biofilmes de bactérias redutoras de sulfato, observou redução de até 44% na formação do biofilme e destacou que os bacteriófagos podem degradar componentes poliméricos da matriz extracelular, favorecendo a desestruturação do biofilme e a exposição das células bacterianas à infecção por novas partículas virais.

Em conjunto, as evidências obtidas por MEV corroboram os demais resultados do estudo, e foi essencial na indicação de que o coquetel fágico promoveu a desestruturação do biofilme, reforçando seu potencial como estratégia para o controle de biofilmes em sistemas complexos.

A análise da topografia superficial dos cupons por perfilometria óptica não evidenciou diferenças significativas entre os sistemas controle e tratamento, tanto do ponto de vista visual quanto nos parâmetros quantitativos de rugosidade avaliados. Os valores semelhantes de R_q , R_a e demais parâmetros indicam que, nas condições experimentais adotadas, o tratamento com coquetel fágico não promoveu alterações expressivas na morfologia superficial do material. Esse resultado pode estar relacionado ao tempo de exposição e à natureza do processo corrosivo, que tende a ocorrer de forma gradual e cumulativa, especialmente em sistemas complexos contendo culturas mistas, nos quais a estrutura e a atividade do biofilme

evoluem ao longo do tempo, podendo influenciar progressivamente a morfologia da superfície metálica (Wikieł et al., 2014)

Além disso, considerando que o coquetel fágico foi aplicado após o estabelecimento inicial da comunidade microbiana, é possível que os efeitos do tratamento tenham sido mais evidentes na modulação biológica do sistema do que na alteração direta da superfície metálica. Dessa forma, a ausência de diferenças significativas na perfilometria não invalida os efeitos observados nos demais parâmetros, mas sugere que a modificação da topografia superficial pode demandar maior tempo experimental ou condições mais intensas de corrosão para que diferenças mais pronunciadas sejam detectadas.

Adicionalmente, considerando que os cupons metálicos foram distribuídos em diferentes regiões do sistema de tanques, foi possível observar variações entre cupons pertencentes a um mesmo tanque. Essa heterogeneidade pode estar associada à formação de microambientes distintos no interior do sistema, influenciados por fatores como fluxo, disponibilidade de nutrientes e distribuição da comunidade microbiana. Em sistemas complexos, como os utilizados neste estudo, é esperado que ocorram gradientes locais que impactem de maneira diferenciada a formação de biofilme e os processos corrosivos. De fato, estudos experimentais demonstram que variações nas condições ambientais, como disponibilidade de nutrientes e características do sistema, podem influenciar a estrutura dos biofilmes e a intensidade dos processos de corrosão microbiologicamente influenciada (Salgar-Chaparro et al., 2020).

Ainda que tenha sido empregada a recirculação do sistema por meio de bomba peristáltica antes das coletas, o tempo e as condições de homogeneização podem não ter sido suficientes para garantir a distribuição completamente uniforme do fluido no interior dos tanques. Em sistemas complexos, como o presente, a formação de gradientes locais de células e nutrientes pode resultar em heterogeneidade espacial significativa.

Essa variabilidade pode ter influenciado diretamente as leituras de densidade óptica (DO_{600}), uma vez que diferenças na concentração celular entre regiões do sistema podem resultar em valores distintos de turbidez. Como consequência, observa-se um possível aumento no desvio padrão entre as replicatas, refletindo não apenas variações biológicas, mas também limitações associadas à homogeneização do sistema experimental.

A avaliação da perda de massa e da taxa de corrosão indicou uma tendência de redução no sistema tratado com o coquetel fágico, embora sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A menor perda de massa e a redução da taxa de corrosão observadas no sistema tratado sugerem que o coquetel contribuiu para a mitigação parcial dos processos corrosivos, possivelmente pela modulação da comunidade microbiana e consequente redução da atividade metabólica associada à formação do biofilme e à produção de metabólitos corrosivos, com o H_2S . Ainda que o coquetel não tenha sido direcionado exclusivamente às bactérias responsáveis pela corrosão, sua aplicação resultou em alterações na dinâmica microbiana do sistema, refletidas pela redução da biomassa do biofilme, da atividade metabólica e da produção de H_2S . Dessa forma, os resultados indicam que o coquetel fágico apresentou potencial para interferir nos processos relacionados à CIM, atuando principalmente por meio da modulação da comunidade microbiana e da redução de fatores associados à corrosividade do ambiente.

Esses resultados sugerem que, embora o tratamento não tenha promovido uma inibição significativa da corrosão no período avaliado, o coquetel fágico apresentou potencial para reduzir fatores associados à corrosão microbiologicamente influenciada, como a atividade metabólica da comunidade microbiana e a produção de metabólitos corrosivos. Considerando que o sistema avaliado apresentava um biofilme previamente estabelecido e uma comunidade microbiana complexa, a aplicação do coquetel pode ser considerada uma estratégia complementar de controle, com potencial para atuar na modulação do biofilme e na redução da agressividade do ambiente corrosivo quando associada a outras medidas de mitigação.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho desenvolveu e avaliou o efeito de um coquetel fágico inespecíficos no controle de biofilmes produzidos por culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato (BRS), inicialmente em ensaios de bancada e, posteriormente, em sistema de tanques piloto. Nos ensaios em tanques piloto, a aplicação do coquetel fágico em concentração de aproximadamente 10^7 UFP/mL promoveu redução na produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), além de tendência de diminuição da atividade metabólica do biofilme e da densidade microbiana quando

comparado ao sistema controle. As análises estruturais indicaram desorganização do biofilme nos sistemas tratados, com menor adesão celular e redução da matriz extracelular.

Em relação aos parâmetros de corrosão, mesmo que, observou-se tendência de redução na perda de massa e na taxa de corrosão dos cupons metálicos no sistema tratado, essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Esses resultados sugerem que, embora o tratamento tenha impactado a estrutura e atividade do biofilme, a resposta em termos de corrosão pode estar associada à complexidade da comunidade microbiana e às condições do sistema experimental.

Esses resultados indicam que, embora o tratamento tenha promovido alterações na estrutura e na atividade do biofilme, seus efeitos sobre o processo corrosivo não ocorreram de maneira equivalente. Dessa forma, a redução da biomassa ou a alteração da organização do biofilme, por si só, podem não ser suficientes para promover uma inibição completa da corrosão, considerando que outros fatores, como a atividade metabólica residual da comunidade microbiana e a persistência de células aderidas à superfície, podem continuar influenciando esse processo.

Dessa forma, o coquetel fágico demonstrou potencial como estratégia alternativa para o controle de biofilmes e mitigação da corrosão microbiologicamente induzida. No entanto, ajustes na formulação, concentração e frequência de aplicação podem ser necessários para otimizar sua eficácia em sistemas complexos, reforçando sua aplicabilidade como abordagem complementar no controle da biocorrosão em ambientes industriais.

8 PERSPECTIVAS

O sistema de tanques piloto utilizado neste estudo representa uma abordagem experimental relevante para simular condições industriais associadas à corrosão microbiologicamente induzida. Os resultados obtidos fornecem uma base inicial para compreensão da atuação desses coquetéis em sistemas complexos, evidenciando a necessidade de ajustes e aprofundamento das análises realizadas.

Diante da complexidade da comunidade microbiana envolvida, abordagens complementares, como análises metagenômicas, tornam-se relevantes para a caracterização mais detalhada da composição microbiana dos biofilmes e para a avaliação das alterações promovidas pela aplicação do coquetel fágico. Essas

análises podem contribuir para a identificação dos grupos microbianos mais impactados pelo tratamento, permitindo uma melhor compreensão de seus efeitos diretos e indiretos sobre a dinâmica da comunidade. Além disso, análises genômicas dos fagos utilizados no coquetel podem fornecer informações sobre o potencial funcional desses vírus, incluindo a identificação de genes associados à replicação, especificidade de hospedeiro e produção de enzimas relacionadas à degradação da matriz extracelular. Dessa forma, a caracterização do repertório genético dos fagos pode auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos na ação antibiofilme e contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle de biofilmes microbianos.

Adicionalmente, é necessário avaliar o efeito do aumento do tempo de circulação do fluido e da duração total do experimento, de modo a validar a eficiência do coquetel fágico em aplicações prolongadas, mais próximas das condições reais de operação industrial, de maneira que o fluido sempre esteja bem distribuído. Durante a condução dos ensaios, foram observadas limitações relacionadas aos componentes do sistema responsáveis pela circulação do fluido, como mangueiras e pontos de entrada e saída, utilizados no bombeamento do líquido. Esses fatores indicam a necessidade de aprimoramento estrutural do sistema experimental.

Outra perspectiva relevante consiste no aumento do número de repetições biológicas por condição experimental, permitindo maior amostragem estatística e confiabilidade dos dados obtidos.

A avaliação do coquetel fágico em tanques contendo outras culturas microbianas de relevância industrial, também se apresenta como uma abordagem importante para ampliar a compreensão sobre sua aplicabilidade em diferentes cenários operacionais, considerando a diversidade microbiana presente em sistemas reais da indústria do petróleo.

Dessa forma, o presente trabalho contribui como etapa inicial no desenvolvimento de estratégias biotecnológicas inovadoras, reforçando a importância da continuidade dos estudos para o aprimoramento e consolidação do uso de coquetéis fágicos no controle da corrosão microbiologicamente induzida.

REFERÊNCIAS

ABEDON, S. T. Bacteriophages and biofilms: ecology. Phage Therapy, Plaques. **Bacteriophage**, 1(2), 66–83. 2011.

ALTAMIRANO, F. L. G.; BARR, J. J. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32, n. 2, e00066-18, 2019.

Baldwin, D., Summer, N.S. Prevention and remediation of petroleum reservoir souring and corrosion by treatment with virulent bacteriophage, Patent number: US8168419 B2. 2012 .

BRÜSSOW, Harald; CANCHAYA, Carlos; HARDT, Wolf-Dietrich. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 68, n. 3, p. 560-602, 2004.

Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol.* 2013 Jun;8(6):769-83. doi: 10.2217/fmb.13.47. PMID: 23701332.

CHAN, Benjamin K.; T. ABEDON, Stephen. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 1, p. 85-99, 2015.

CHANG, C.; YU, X.; GUO, W.; GUO, C.; GUO, X.; LI, Q.; ZHU, Y. Bacteriophage-mediated control of biofilm: a promising new dawn for the future. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 825828, 2022.

CHEN, X.; LIU, M.; ZHANG, P.; XU, M.; YUAN, W.; BIAN, L.; LIU, Y.; XIA, J.; LEUNG, S. S. Y. Phage-derived depolymerase as an antibiotic adjuvant against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 845500, 2022.

CLOKIE, Martha RJ; KROPINSKI, Andrew M.; LAVIGNE, Rob. Methods and protocols volume 1. In: **Bacteriophages: Methods and Protocols volume 1**. Springer Protocols, Humana Press, New York, 2009.

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. 2021. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Viçosa.

DA SILVA DUARTE, Vinícius *et al.* A T4virus prevents biofilm formation by *Trueperella pyogenes*. **Veterinary microbiology**, v. 218, p. 45-51, 2018.

DO CARMO SANTOS, Adriele Jéssica *et al.* Two marine sulfur-reducing bacteria co-culture is essential for productive infection by a T4-like Escherichia coli-infecting phage. **Heliyon**, v. 10, n. 18, 2024.

Dutta A, Valle F, Goldman T, Keating J, Burke E, Williamson N, Dirmeier R, Bowman JS, 2021. Detection of Sulfate-Reducing Bacteria as an Indicator for Successful Mitigation of Sulfide Production. *Appl Environ Microbiol* 87:e01748-21.

ELSGAARD, Lars *et al.* Thermophilic sulfate reduction in hydrothermal sediment of Lake Tanganyika, East Africa. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1473-1480, 1994.

ENNING, D.; GARRELF, J. *Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1226–1236, 2014.

FISCHETTI, Vincent A. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 10, p. 491-496, 2005.

Flemming, HC., Wingender, J., Szewzyk, U. *et al.* Biofilmes: uma forma emergente de vida bacteriana. *Nat Rev Microbiol* **14**, 563–575 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

FORSYTHE, Stephen. (2020). *The Microbiology of Safe Food*, 3rd Edition.

GIEG, Lisa M.; JACK, Tom R.; FOGHT, Julia M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, p. 263-282, 2011.

Gliźniewicz M, Miłek D, Olszewska P, Czajkowski A, Serwin N, Cecerska-Heryć E, Dołęgowska B and Grygorcewicz B (2024) Advances in bacteriophage-mediated strategies for combating polymicrobial biofilms. *Front. Microbiol.* 14:1320345. doi: 10.3389/fmicb.2023.1320345

GUO Z, Liu M, Zhang D. Potential of phage depolymerase for the treatment of bacterial biofilms. *Virulence*. 2023.

HALL-STOODLEY, Luanne; COSTERTON, J. William; STOODLEY, Paul. Biofilmes bacterianos: do ambiente natural às doenças infecciosas. *Nature reviews microbiology*, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

Harper, D. R., Parracho, H. M. R. T., Walker, J., et al. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270–284.

HIBBING, M. E.; FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; PETERSON, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 15–25, 2010.

HYMAN, Paul; ABEDON, Stephen T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. **Advances in applied microbiology**, v. 70, p. 217-248, 2010.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). **Oil Market Report – December 2024**. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/oil-market-report-december-2024>. Acesso em: 24 abr. 2025.

JIA, Ru et al. Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: a state of the art review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 137, p. 42-58, 2019.

Lackner, N., Wagner, A. O., & Illmer, P. (2020). *Effect of sulfate addition on carbon flow and microbial community composition during thermophilic digestion of cellulose*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 104, 4605–4615.

LATKA, Agnieszka *et al.* Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 3103-3119, 2017.

MARTINS, Guilherme de Oliveira *et al.* Cultivo de bactérias nitrificantes a partir do biofilme de filtro biológico aerado submerso tratando esgoto. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.10, n.6, p.77-91, 2019.

Mayorga-Ramos A, Carrera-Pacheco SE, Barba-Ostria C and Guamán LP (2024) Bacteriophage-mediated approaches for biofilm control. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 14:1428637. doi: 10.3389/fcimb.2024.1428637

MIN, M.; MCHALE, R.; RAPP, E.; MCKENZIE, S.; BARNHILL, J.; BRASKO, B.; MAZUR, M.; KOVACS, C.; BURPO, F. Disruption of biofilm by bacteriophages in clinically relevant settings. *Military Medicine*, v. 189, n. 5-6, p. e1294–e1302, 2024.

MUYZER, Gerard; STAMS, Alfons JM. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature reviews microbiology**, v. 6, n. 6, p. 441-454, 2008.

OLIVEIRA, Hugo *et al.* Functional analysis and antivirulence properties of a new depolymerase from a myovirus that infects *Acinetobacter baumannii* capsule K45. **Journal of virology**, v. 93, n. 4, p. 10.1128/jvi. 01163-18, 2019.

OLIVEIRA, Kelly Mari Pires de; OLIVEIRA, Tereza Cristina Rocha Moreira de. Biofilmes microbianos e resistência aos sanitizantes: uma revisão. *Hig. aliment*, p. 54-59, 2008.)

PARASION, Sylwia *et al.* Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 137-145, 2014.

RABUS, Ralf; HANSEN, Theo A.; WIDDEL, Friedrich. Dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing prokaryotes. In: **The prokaryotes**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 309-404.

PIRES, Diana P. *et al.* Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 2141-2151, 2016.

RABUS, Ralf; HANSEN, Theo A.; WIDDEL, Friedrich. Dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing prokaryotes. In: **The prokaryotes**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 309-404.

Salgar-Chaparro SJ, Lepkova K, Pojtanabuntoeng T, Darwin A, Machuca LL. Nutrient Level Determines Biofilm Characteristics and Subsequent Impact on Microbial Corrosion and Biocide Effectiveness. *Appl Environ Microbiol*. 2020 Mar 18;86(7):e02885-19. doi: 10.1128/AEM.02885-19. PMID: 31980429; PMCID: PMC7082584.

Santos, A. J. C., Dias, R. S., Silva, J. D., et al. (2024). *Two marine sulfur-reducing bacteria co-culture is essential for productive infection by a T4-like Escherichia coli-infecting phage*. **Heliyon**, 10, e37934.

Shree, Pallee & Singh, Chandra & Sodhi, Kushneet & Surya, Jaya & Singh, Dileep. (2023). Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. *Medicine in Microecology*. 16. 100084. 10.1016/j.medmic.2023.100084.

SINGH, Sudha B.; CARROLL-PORTILLO, Amanda; LIN, Henry C. *Desulfovibrio* in the gut: the enemy within?. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1772, 2023.

SULAKVELIDZE, Alexander; ALAVIDZE, Zemphira; MORRIS JR, J. Glenn. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649-659, 2001.

Sutherland, I. W., Hughes, K. A., Skillman, L. C., & Tait, K. (2004). The interaction of phage and biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, 232(1), 1–6.

SUTTLE, C. A. Viruses in the sea. *Nature*, v. 437, p. 356–361, 2005.

TKHILAISHVILI, T., Winkler, T., Müller, M., Perka, C., & Trampuz, A. Bacteriophage–antibiotic combination therapy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in an animal model of periprosthetic joint infection. **Frontiers in Microbiology**, 12, 660387. 2021

WEINBAUER, Markus G. Ecology of prokaryotic viruses. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 127-181, 2004.

WIDDER, S.; ALLEN, R. J.; PFEIFFER, T.; CURTIS, T. P.; WIUF, C.; SLOAN, W. T.; CORDERO, O. X.; BROWN, S. P.; MOMENI, B.; SHOU, W.; *et al.* Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *The ISME Journal*, v. 10, n. 11, p. 2557–2568, 2016.

WIKIEŁ, A. J.; DATSENKO, I.; VERA, M.; SAND, W. Impact of *Desulfovibrio alaskensis* biofilms on corrosion behaviour of carbon steel in marine environment. *Bioelectrochemistry*, v. 97, p. 52–60, 2014.

YEMASHOVA, Natalia A. et al. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, p. 315-337, 2007.

YOUNG, Ry. Phage lysis: do we have the hole story yet?. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 6, p. 790-797, 2013.

Zhang et al. (2020). *Metagenomic insights into aniline effects on microbial community and biological sulfate reduction pathways during anaerobic treatment of high-sulfate wastewater*. **Science of the Total Environment**, 742, 140537