

**MARCELLA SILVA VIEIRA**

**VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA DE TANQUES PILOTO PARA AVALIAÇÃO  
DO EFEITO DE UM COQUETEL DE BACTERÍOFAGOS SOBRE O BIOFILME E  
PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>S 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: Sérgio Oliveira de Paula

Coorientadores: Roberto Sousa Dias

Bruna Almeida Leão Ayupe

Cynthia Canêdo Silva

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2022**

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

T

V658v  
2022  
Vieira, Marcella Silva, 1995-  
Validação de um sistema de tanques piloto para avaliação  
do efeito de um coquetel de bacteriófagos sobre o biofilme e  
produção de H<sub>2</sub>S por bactérias redutoras de sulfato / Marcella  
Silva Vieira. – Viçosa, MG, 2022.  
1 dissertação eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2022.

Referências bibliográficas: f. 63-73.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.315>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Biofilmes. 2. Bactérias redutoras de sulfato.  
3. Bacteriófagos. 4. Corrosão microbiologicamente induzida.  
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

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

**MARCELLA SILVA VIEIRA**

**VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA DE TANQUES PILOTO PARA AVALIAÇÃO  
DO EFEITO DE UM COQUETEL DE BACTERÍOFAGOS SOBRE O BIOFILME E  
PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>S 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: 7 de março de 2022.

Assentimento:



---

Marcella Silva Vieira  
Autora



---

Sergio Oliveira de Paula  
Orientador

*Aos meus pais e vó Aparecida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e minha avó Aparecida (*in memoriam*) por terem trilhado toda essa trajetória comigo. Obrigada pela força, pela luz, pela presença constante e por me reerguerem quando o caminho não estava fácil.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e a Universidade Federal de Viçosa, pela qualidade e excelência no ensino e pesquisa, e por me fornecerem todas as oportunidades para o desenvolvimento do curso e crescimento pessoal.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À PETROBRAS e à FUNARBE, pela concessão da bolsa de estudos, essencial para a execução desse trabalho.

Ao professor Sérgio, pela orientação ao longo desses 7 anos, por me confiar este projeto e me oferecer a oportunidade de fazer ciência.

Ao Roberto, meu coorientador, por sanar minhas dúvidas, compartilhar suas ideias e estar ao meu lado em todas as etapas do meu desenvolvimento como pesquisadora.

À Bruna, minha coorientadora, com quem aprendi muito sobre ciência e a vida. Obrigada por tanta paciência quando eu queria o imediatismo, por pensar comigo quando eu não via saída para os experimentos, pelo conhecimento transmitido a respeito das BRS e principalmente, pela amizade construída nesses anos.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise/UFV, por me oferecer a estrutura e auxílio para realização da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao professor Sukarno Ferreira, indispensável para a realização da perfilometria óptica no SisNANO/UFV. Obrigada pela disponibilidade todas as vezes que precisei!

Aos colegas do Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM), onde tive a oportunidade de aprender, conhecer pessoas magníficas e que me ensinaram tanto. Deixo aqui meu agradecimento ao Vinícius Duarte, que em novembro de 2015 me apresentou ao estágio e desde então depositou sua confiança em mim. Obrigada mesmo, Vini!

Às meninas do Laboratório de Microbiologia Ambiental Aplicada (LAMAP), Déborah, Helena e Lívia, pela amizade e ajuda na execução de diversas análises.

Aos estagiários Ariel e Mirelly, por todas as vezes que me ajudaram com os experimentos, mesmo aos finais de semana.

À toda minha família, pelo amor e torcida mesmo com a distância.

Ao meu namorado, Lucas, por ser um parceiro e amigo de todas as horas. Obrigada por tantas conversas, por me ouvir, aconselhar, e se fazer presente mesmo quando estávamos longe. Você foi essencial, Lu. Te amo!

Aos meus sogros, Simone e Wilton, que me acolheram com tanto carinho em Viçosa.

Aos amigos de longa data: Raíssa, Isabela, Clara, Adriele, meu grupo “Papá no Domingo”, Luiz Otávio, Thainá e Jojo, obrigada por toda ajuda nesse período, por acolherem meu choro, pelas muitas risadas, e claro, muitas conversas! Aos amigos do PPGMBA, em especial Isabelle e Bárbara, com quem pude dividir as alegrias e aflições durante estes 2 anos, e que sempre estiveram presentes quando precisei.

Aos meus pais, Rosimar e Áureo, meus amores incondicionais. Agradeço por tanto amor, carinho, colo, compreensão e por confiarem tanto em mim, ainda que eu mesma não confiava. Vocês são minha certeza e para onde eu sei que sempre posso voltar! À Meg, minha “cãopanheira” há 10 anos, por ser tão querida comigo e me garantir boas risadas nos momentos de tensão.

E a todos que se fizeram presentes e ajudaram na execução desse trabalho, muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Marcella Silva Vieira, filha de Rosimar Oliveira Silva Vieira e Áureo Luiz Vieira, nascida em 16 de outubro de 1995, em Ubá, Minas Gerais.

Ingressou no curso superior de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa em março de 2015, e graduou-se como Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas em janeiro de 2020.

Em março de 2020, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

*“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.  
Agora é a hora de entender mais, para temer menos”.*

(Marie Curie)

## RESUMO

VIEIRA, Marcella Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2022. **Validação de um sistema de tanques piloto para avaliação do efeito de um coquetel de bacteriófagos sobre o biofilme e produção de H<sub>2</sub>S por bactérias redutoras de sulfato.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Roberto Sousa Dias, Bruna Almeida Leão Ayupe e Cynthia Canêdo Silva.

A corrosão é um processo físico-químico capaz de alterar as propriedades do material exposto a condições corrosivas. O setor de exploração de petróleo é um dos principais setores da economia que sofre com esse processo devido à deterioração de equipamentos, como tanques e oleodutos, que podem acarretar em vazamento de óleo. As bactérias redutoras de sulfato (BRS) constituem o principal grupo relacionado à corrosão microbiologicamente induzida (CMI), gerando prejuízos anuais à indústria do petróleo devido à formação de biofilme e a produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), um gás tóxico e corrosivo. Neste trabalho, um sistema de tanques piloto foi utilizado para simular o armazenamento de fluidos industrial, e inseridos cupons de aço carbono AISI 1020 para formação de biofilme. Nesse sistema, foi avaliado o efeito de um coquetel de bacteriófagos inespecíficos (10<sup>7</sup> UFP/mL), isolados de amostra de água residuais, sobre o biofilme e produção de H<sub>2</sub>S de duas culturas mistas de BRS, denominadas AI e AP. Além do coquetel fágico, foi aplicado à cultura AP o biocida comercial sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônico (THPS), de modo a reproduzir nos tanques o método de rotina empregado na indústria para inibir a biocorrosão. Em células planctônicas, a eficiência dos fagos foi avaliada pela quantificação de H<sub>2</sub>S, leitura de DO<sub>600nm</sub>, contagem do número mais provável de células (NMP) e concentração de ATP total. Para as células do biofilme, foi avaliada a quantificação por NMP de células aderidas, concentração de ATP, perda da massa e taxa de corrosão ocorridas nos cupons, além do efeito sobre a estrutura do biofilme, o que foi verificado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e pela rugosidade da superfície obtida por perfilometria óptica. De maneira similar, com exceção à MEV, as mesmas análises foram conduzidas quando THPS estava sob estudo. Os resultados iniciais demonstraram redução de 77,8% na produção de H<sub>2</sub>S pela cultura mista AI na presença do coquetel fágico, além de menor perda de massa e taxa de corrosão dos cupons avaliados. A população da cultura mista AP teve o crescimento interrompido pelo biocida, mas com surgimento de células resistentes após 12 dias. Com o coquetel

fágico, a cultura mista AP apresentou redução de 26,1% na produção de H<sub>2</sub>S, redução da matriz do biofilme formado e menor extensão dos vales desencadeados por pites de corrosão. Os dados obtidos sugerem o potencial biotecnológico do coquetel de bacteriófagos em um sistema piloto, além de propor alterações futuras como concentração, tempo de aplicação e composição do coquetel de modo a abranger os eventuais problemas de biocorrosão.

Palavras-chave: Biofilme. Bactérias Redutoras de Sulfato. Bacteriófagos. Corrosão Microbiologicamente Induzida. Tanques piloto

## ABSTRACT

VIEIRA, Marcella Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2022. **Pilot tanks system validation for bacteriophages' cocktail effect evaluation on biofilm and H<sub>2</sub>S production by sulfate reducing bacteria**. Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisers: Roberto Sousa Dias, Bruna Almeida Leão Ayupe and Cynthia Canêdo Silva.

Corrosion is a physical-chemical process capable of changing the properties of material exposed to corrosive conditions. The oil exploration sector is one of the main sectors of the economy that suffers from that process due to the deterioration of equipment, such as tanks and pipelines, which can lead to oil leakage. Sulfate reducing bacteria (SRB) are the main group related to microbiologically induced corrosion (MIC), causing annual losses to the oil industry due to biofilm formation and the production of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), a toxic and corrosive gas. In this work, a pilot tank system was used to simulate industrial fluid storage, and AISI 1020 carbon steel coupons were inserted for biofilm formation. In this system, the effect of a cocktail of nonspecific bacteriophages (10<sup>7</sup> PFU/mL), isolated from a wastewater sample, was evaluated on the biofilm and H<sub>2</sub>S production of two mixed cultures of SRB, named AI and AP. Moreover, the commercial biocide tetrakis(hydroxymethyl)phosphonic sulfate (THPS) was applied to culture AP, in order to reproduce in the tanks the routine method used in the industry to inhibit biocorrosion. In planktonic cells, phage efficiency was evaluated by H<sub>2</sub>S quantification, optical density (OD<sub>600nm</sub>), most probable number (MPN) and total ATP concentration. For the biofilm cells, MPN quantification of adhered cells, ATP concentration, mass loss and corrosion rate occurred in the coupons were evaluated, in addition to the effect on the biofilm structure, which was verified by Scanning Electron Microscopy (SEM) and surface roughness obtained by optical profilometry. Similarly, with the exception of SEM, the same analyzes were conducted when THPS was under study. The initial results showed a reduction of 77.8% in the production of H<sub>2</sub>S by the mixed culture AI in the presence of the phage cocktail, in addition to lower mass loss and corrosion rate of the evaluated coupons. The population of mixed culture AP had its growth interrupted by the biocide, but with emergence of resistant cells after 12 days. For the phage cocktail, the mixed culture AP showed a 26,1% reduction in the production of H<sub>2</sub>S, reduction in the biofilm matrix formed and a smaller extension of the valleys triggered by corrosion pits. The data

obtained suggest the biotechnological potential of the bacteriophage cocktail in a pilot system, in addition to proposing future changes such as concentration, application time and cocktail composition in order to cover possible biocorrosion problems.

Keywords: Biofilm. Sulfate-reducing Bacteria. Bacteriophages. Microbiologically Induced Corrosion. Pilot tanks.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema dos experimentos realizados no sistema de tanques piloto. A 1ª etapa é caracterizada pela padronização do crescimento, avaliando inicialmente o efeito do coquetel fágico na cultura mista AI, e logo depois apenas o crescimento das culturas AI e AP no sistema de tanques. A 2ª etapa corresponde ao experimento conduzido com a cultura mista AP e o biocida THPS, e em seguida, a cultura mista AP com o coquetel fágico.....28

**Figura 2.** Sistema de tanques piloto instalados no Laboratório de Imunovirologia Molecular. A figura 2A representa a estrutura completa do sistema de tanques piloto. A figura 2B apresenta a parte superior da primeira imagem, destacando a tampa com quatro roscas para o fechamento completo da estrutura. As figuras em 2C destacam o tampão onde foi acoplado os cupons de aço carbono, e cada tanque possui 6 tampões. A figura 2D apresenta a parte inferior do tanque, destacando a válvula que permite o abre/fecha para o fluido armazenado. ....29

**Figura 3.** Sistema de mangueiras acoplado aos tanques piloto e à bomba peristáltica. (A) Apresenta como foi realizada a circulação, a partir da saída próxima à válvula; (B) destaca o triway inserido nas mangueiras.....30

**Figura 4.** Kit de número mais provável (NMP) utilizado para estimativa de células viáveis de bactérias redutoras de sulfato (BRS) no fluido do sistema de tanques piloto. O kit é constituído por salinas redutoras e frascos com meio de cultura anaeróbio. Cada salina representa uma diluição, iniciando da  $10^{-1}$  até  $10^{-7}$ . Os meios de cultura apresentam a cor rosa antes da inoculação e caso não apresente crescimento após 28 dias de incubação a 30 °C. A presença de precipitado preto nesses frascos demonstra o crescimento de BRS.....34

**Figura 5.** Curva de produção de  $H_2S$  pela cultura mista de bactérias redutoras de sulfato AI durante 55 dias em sistema de tanques na ausência (controle) e presença (tratamento) do coquetel fágico ( $10^7$  UFP/mL) adicionado no início do ensaio. A seta indica o momento da reaplicação da solução nutritiva. ....37

**Figura 6.** Representação gráfica da média da perda de massa (A) e taxa de corrosão (B) dos cupons AISI1020 após 55 dias em tanques inoculados com a cultura mista AI na ausência (controle) e presença (tratamento) do coquetel fágico ( $10^7$  UFP/mL).....38

**Figura 7.** Padronização do cultivo das culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato AI e AP em sistema de tanques piloto durante 21 dias. O crescimento foi acompanhado por leitura de densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) e produção de  $H_2S$ .....39

**Figura 8.** Curva de produção  $H_2S$  (A) e  $DO_{600nm}$  (B) pela cultura mista de bactérias redutoras de sulfato AP em sistema de tanques na ausência (controle) e presença de 200 ppm de THPS (tratamento). .....40

**Figura 9.** Estimativa de células planctônicas e aderidas a cupons de aço carbono AISI 1020 instalados em sistema de tanques inoculados com a cultura mista de BRS AP. A estimativa de células planctônicas corresponde a três períodos: no momento da inoculação da cultura nos tanques (A), em 10 dias de ensaio (B) e ao final do ensaio, 21 dias (C), sendo na ausência (controle) e presença de 200 ppm de THPS (tratamento). A estimativa de células no biofilme é apresentada na figura 9D.....42

**Figura 10.** Concentração de ATP (pg ATP/mL) das células planctônicas para os tanques controle e tratamento com THPS – 200 ppm em três períodos diferentes: no momento da inoculação da cultura mista AP (tempo 0), no máximo de produção de  $H_2S$  (10 dias) e ao final do experimento (21 dias) .....43

**Figura 11.** Representação gráfica da média da perda de massa (A) e taxa de corrosão (B) dos cupons AISI1020 ao longo de 21 dias em tanques inoculados com a cultura mista de BRS AP, na ausência (controle) e presença (tratamento) do biocida comercial THPS.....44

**Figura 12.** Perfilometria óptica da superfície dos cupons expostos por 21 dias à cultura mista de BRS AP em sistema de tanques na ausência e presença do biocida comercial THPS – 200 ppm. Um panorama da superfície é mostrado para os tanques controle (A) e tratamento (B), assim como a formação gráfica dessas imagens em eixos x e y (C e D). Imagens tridimensionais da superfície dos cupons no tanque controle (E) e tanque tratamento (F).....45

**Figura 13.** Curva de produção de  $H_2S$  (A) e  $DO_{600nm}$  (B) antes e após dosagem do coquetel de bacteriófagos ( $10^7$  UFP/mL) em sistema de tanques inoculados com a cultura mista de BRS AP. O coquetel fágico foi adicionado no 6° dia, como é indicado pela seta contínua. O experimento foi conduzido por 38 dias, e a solução nutritiva foi reaplicada no 25° dia (seta pontilhada). .....47

**Figura 14.** Estimativa de células viáveis de BRS por NMP em sistema de tanque inoculados com a cultura mista AP, na ausência e presença do coquetel fágico ( $10^7$  UFP/mL) dosado no sexto dia do ensaio. Avaliação realizada em três períodos diferentes: tempo 0, no momento da inoculação de BRS (A), no sexto dia de ensaio (B) e no final do ensaio, 21 dias (C). Células viáveis de BRS no biofilme foram estimadas no final em 38 dias de ensaio (D).....49

**Figura 15.** Concentração de ATP (pg ATP/mL) das células planctônicas (A) e células aderidas (pg ATP/cm<sup>2</sup>) nos cupons AISI1020 (B) para os tanques controle e tratamento com o coquetel de bacteriófagos ( $10^7$  UFP/mL). Em A, foi avaliado três períodos diferentes: no momento da inoculação da cultura mista de BRS AP (tempo

0), máxima produção de H<sub>2</sub>S (6 dias) e ao final do experimento (21 dias). Em B, ao final de 38 dias de experimento.....50

**Figura 16.** Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado nos cupons de aço carbono AISI 1020 inseridos no sistema de tanques controle (A, B e C) e tratamento (D, E e F), inoculados com a cultura mista de BRS AP e o coquetel fágico (10<sup>7</sup> UFP/mL), respectivamente. (A) As superfícies dos cupons apresentaram biofilmes maduros, como indicado pela seta branca; (B) Predominância de células de formato bacilo nos biofilmes; (C) Possível deposição de exopolissacarídeo, indiciado pela seta branca; (D) Superfícies dos cupons com aparente menor adesão celular; (E) Menor concentração de células nos biofilmes; (F) Presença de filamentos, indicados com as setas brancas.....51

**Figura 17.** Representação gráfica da média da perda de massa (A) e taxa de corrosão (B) dos cupons AISI1020 ao longo de 38 dias em tanques inoculados com a cultura mista de BRS AP na ausência (controle) e presença (tratamento) do coquetel fágico em 10<sup>7</sup> UFP/mL .....52

**Figura 18.** Perfilometria óptica da superfície dos cupons expostos por 38 dias à cultura mista de BRS AP em sistema de tanques na ausência e presença do coquetel fágico – 10<sup>7</sup> UFP/mL. Um panorama da superfície é mostrado para os tanques controle (A) e tratamento (B), assim como a formação gráfica dessas imagens em eixos x e y (C e D). Imagens tridimensionais da superfície dos cupons no tanque controle (E) e tanque tratamento (F).....54

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AI	água de injeção
AISI	American Institute of Steel and Iron
AP	água de produção
ASTM	American Society of Testing and Material
ATP	adenosina trifosfato
BCX	exclusão biocompetitiva
BRS	bactérias redutoras de sulfato
BTEX	benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
CMI	corrosão microbiologicamente induzida
C-MIC	corrosão química
DO <sub>600nm</sub>	densidade óptica em 600 nanômetros
EO	óleo essencial
E-MIC	corrosão eletrogênica
EPS	substâncias poliméricas extracelulares
H <sub>2</sub> S	sulfeto de hidrogênio
MEV	microscopia eletrônica de varredura
Min	minuto
mL	mililitro
NMP	número mais provável
PPM	partes por milhão
Ra	rugosidade média
Rp	altura máxima do pico
Rq	raiz quadrada média
Rt	total (pico + vale)
Rv	profundidade média do vale
THPS	sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônico
UFP	unidades formadoras de placas

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
2.1 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)	20
2.2 Biofilme	21
2.3 Corrosão Microbiologicamente Induzida (CMI) na indústria petrolífera	22
2.4 Bacteriófagos e coquetéis fágicos	25
<b>3. OBJETIVOS</b>	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
4.1. Delineamento experimental	27
4.2 Cultivo das culturas mistas de BRS	28
4.3 Sistema de tanques piloto	29
4.3.1 Estrutura do sistema de tanques piloto	29
4.3.2 Corpos de prova	30
4.3.3 Montagem do sistema de tanques piloto	30
4.4 Formulação do coquetel de bacteriófagos	32
4.5 Análises do crescimento planctônico	33
4.6 Caracterização do biofilme	34
4.6.1 Concentração de ATP no biofilme	34
4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
4.6.3 Estimativa de células aderidas	35
4.6.4 Perda de massa e taxa de corrosão	35
4.6.5 Perfilometria óptica	36
4.7 Análises estatísticas	36
<b>5. RESULTADOS</b>	36
5.1 Cultura mista AI	36
5.1.1 Produção de H <sub>2</sub> S	37
5.1.2 Perda de massa e taxa de corrosão	38
5.2 Padronização do cultivo das culturas mistas de BRS AI e AP	38
5.3 Cultura mista AP	39
5.3.1 Avaliação do THPS no controle da produção de H <sub>2</sub> S	39
5.3.2 Estimativa de células planctônicas e aderidas por NMP	40

5.3.3	Concentração de ATP.....	42
5.3.4	Perda de massa e taxa de corrosão .....	43
5.3.5	Rugosidade da superfície por perfilometria óptica .....	44
5.3.6	Avaliação do coquetel fágico no controle da produção de H <sub>2</sub> S.....	46
5.3.7	Estimativa de células planctônicas e aderidas por NMP.....	48
5.3.8	Concentração de ATP.....	49
5.3.9	Visualização do biofilme por MEV.....	50
5.3.10	Perda de massa e taxa de corrosão .....	52
5.3.11	Rugosidade da superfície por perfilometria óptica .....	52
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A corrosão de metais e ligas metálicas é definida, de acordo com a ISO8044:2020, como “uma interação físico-química entre o material metálico e seu ambiente, resultando em alterações nas propriedades do material, que pode culminar na perda significativa da função e desempenho do equipamento”. Dentre os mecanismos envolvidos na corrosão, encontra-se a presença ativa de microrganismos, a chamada biocorrosão, ou também conhecida como corrosão microbiologicamente induzida (CMI). A CMI afeta consideravelmente diversos setores industriais, e no setor petrolífero, pode afetar mais de 20% dos oleodutos (JIA et al., 2018a; LI et al., 2018).

A indústria de petróleo e gás é uma das mais rentáveis em termos econômicos e energéticos, comercializando os mais variados subprodutos derivados do petróleo (GOMES, 2014). Em contrapartida, esse setor apresenta prejuízos financeiros anuais de milhões de dólares, os quais estão relacionados, em parte, aos danos provocados pelo processo de corrosão e subseqüente gastos com medidas de prevenção (ENNING; GARRELFIS, 2014; LI et al., 2018). Durante o processo de extração *offshore* do petróleo, a água do mar, rica em íons sulfato, é injetada nos poços de produção de óleo, favorecendo o crescimento de um grupo de microrganismos, as bactérias redutoras de sulfato (BRS). De modo similar ocorre para a água de produção, uma mistura de óleo e água gerada na produção do petróleo, a qual é comumente reinjetada no sistema e favorece o crescimento de BRS (DE ALMEIDA; FREIRE; RABELO, 2001; GOMES, 2014).

As BRS são microrganismos anaeróbios, inseridas em um grupo taxonomicamente diverso e que realizam a redução dissimilativa do sulfato, utilizando-o como acceptor final de elétrons durante a respiração (LI et al., 2010; GUAN et al., 2013). Diante da disponibilidade de sulfato, a matéria orgânica degradada na redução dissimilativa gera um subproduto, o sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), um gás tóxico e diretamente relacionado à CMI. A permanência da água de produção em ductos, tanques de armazenamento e outros equipamentos favorece o modo de vida sésil bacteriano, e a interface óleo/água compõe um meio nutritivo e anaeróbio para o estabelecimento de BRS (VIEIRA, 2013). As células sésseis se organizam em uma estrutura heterogênea e aderidas a uma superfície iniciando o processo de formação dos biofilmes, uma complexa e dinâmica comunidade microbiana envolta por uma

matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que confere estabilidade e proteção às células contra variações ambientais e agentes externos, além de ser capaz de gerar um aumento significativo de H<sub>2</sub>S (GONG; JIANG, 2015; MOTLAGH et al., 2009). Adicionalmente à produção desse gás, o biofilme formado na superfície metálica dos tanques contribui acelerando a biocorrosão, podendo ocasionar vazamentos futuros, gerando assim prejuízos para a produção, ao ambiente e segurança da equipe (SYAFAAT; ISMAIL, 2015).

Os esforços para combater a CMI voltam-se, majoritariamente, para a aplicação de agentes químicos, os biocidas, de modo a eliminar a vida microbiana. Os biocidas são compostos inorgânicos (como cloro e ozônio) ou orgânicos (como quaternário de amônio e aldeídos), atuam diretamente no metabolismo celular e mostram-se mais eficientes em células planctônicas (VIDELA, 2002; OTTER et al., 2015; CHRYSALIDIS; KYZAS, 2020). Nos biofilmes, a matriz EPS garante que as células sejam cerca de 100 a 1000 vezes menos suscetíveis à ação bactericida. Logo, o uso de biocidas em biofilmes, além de não promover a remoção da biomassa depositada, pode requerer dosagens maiores, em até duas ordens de magnitude quando comparado ao uso em células planctônicas (GILBERT; MCBAIN, 2001; MURTHY; VENKATESAN, 2008).

Os bacteriófagos, vírus que têm as bactérias como hospedeiras, são alternativas biotecnológicas em ascensão e com potencial promissor para controle da contaminação bacteriana, já apresentando aplicabilidade na indústria petrolífera (PEDRAMFAR et al., 2017), alimentícia (SPRICIGO et al., 2013), no setor hospitalar (KAŹMIERCZAK et al., 2014) e tratamento de águas residuais (WITHEY et al., 2005). Além da atividade lítica, os fagos possuem a capacidade de degradação do biofilme (ALI GHARIEB et al., 2020; DA SILVA DUARTE et al., 2018; MONTAÑEZ-IZQUIERDO et al., 2012) a partir de enzimas específicas, como depolimerases, e podem ser utilizados em diferentes combinações, como em formulações de coquetéis contendo dois ou mais bacteriófagos (ISLAM et al., 2019; FAZZINO et al., 2020).

Os coquetéis fágicos são opções viáveis para utilização contra culturas mistas, uma vez que garantem diversidade de interação enzima-matriz e uma durabilidade do efeito por prevenir uma futura resistência bacteriana frente à diversidade viral (CHAN; ABEDON; LOC-CARRILLO, 2013; FERRIOL-GONZÁLEZ; DOMINGO-CALAP, 2020). Alguns estudos (SILLANKORVA; NEUBAUER; AZEREDO, 2010; GONZÁLEZ et al., 2017; MILHO et al., 2019) têm focado em entender como os coquetéis atuam em

biofilmes multi-espécies, visto que é o modo encontrado em ambientes industriais. Nesses casos, as enzimas virais responsáveis por degradar a matriz podem ir além da relação hospedeiro-específico, eliminando o EPS de outra espécie presente (TAIT et al., 2002).

O coquetel fágico usado neste trabalho foi produzido utilizando os bacteriófagos vB\_EcoM-UFV09, vB\_EcoM-UFV10, vB\_EcoM-UFV13 e vB\_EciM-UFV01 isolados no Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM), selecionados devido à estabilidade que apresentaram em diferentes faixas de pH, temperatura e salinidade. Além disso, o coquetel foi capaz de reduzir o biofilme formado por onze bactérias aeróbias inespecíficas, como também apresentou reduções significativas para culturas mistas de BRS avaliadas em experimentos de bancada. A partir desses resultados, o coquetel foi selecionado para ser avaliado em um sistema piloto que simula os tanques de armazenamento de óleo, visto que o coquetel é uma alternativa considerável a ser aplicada em ambientes expostos a biocorrosão. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de um coquetel inespecífico de bacteriófagos na prevenção de formação e remoção do biofilme formado por culturas mistas de BRS em tanques piloto, assim como analisar seu efeito indireto na produção de H<sub>2</sub>S. Essa abordagem visa mitigar a biocorrosão gerada sobre o aço carbono AISI 1020, material de revestimento comumente utilizado em tanques de armazenamento na indústria de petróleo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) fazem parte um extenso grupo de microrganismos anaeróbios denominados procariotos redutores de sulfato, que engloba mais de 220 espécies, dentro de 60 gêneros (BARTON; FAUQUE, 2009). Dentro desta diversidade, são inclusos representantes dos domínios *Archaea* e em sua maioria, representantes do domínio *Bacteria*. A classificação bacteriana é majoritariamente pertencente ao filo *Proteobacteria*, classe *Deltaproteobacteria* (gram-negativas), e ainda alguns representantes gram-positivos do filo *Firmicutes*, representado por *Bacillus* e *Clostridium* (KUSHKEVYCH et al, 2021).

As BRS estão intimamente relacionados a transformações exercidas no ciclo do enxofre, utilizando o sulfato como nutriente e reduzindo-o a sulfeto para geração

de energia (MUYZER; STAMS, 2008), e são amplamente distribuídas em ambientes anaeróbios, como em fendas hidrotermais (a exemplo de alguns gêneros termofílicos, *Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulfovibrio* e *Thermodesulfobium*) e sedimentos marinhos, e possuem um potencial biotecnológico como bioremediadoras, atuando em solos contaminados por exemplo, pelo complexo BTEX – benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BARTON; FAUQUE, 2009; KUSHKEVYCH et al, 2021). Apesar de serem reconhecidas como anaeróbias restritas, Kjeldsen et al (2004) relataram a identificação de BRS, provenientes de amostras de lodo ativado, que toleraram exposição ao oxigênio durante 9 h, sem alteração na estimativa de células viáveis do sistema.

O papel fisiológico exercido pelo sulfato está relacionado a uma redução assimilativa e dissimilativa, e por ser um íon estável, é inicialmente ativado pela enzima ATP sulforilase que permite a formação de um par redox mais eficiente (BARTON; FAUQUE, 2009). Durante o metabolismo assimilativo, esse composto inorgânico é reduzido de modo a suprir as demandas de biossíntese da célula, sendo incorporado em moléculas como aminoácidos e coenzimas. Entretanto, no metabolismo dissimilativo, o sulfato é utilizado comoceptor final de elétrons para degradação da matéria orgânica, reação na qual o H<sub>2</sub>S é excretado, um gás tóxico e corrosivo (COSTA, 2012; VARON-LOPEZ, 2013; MADIGAN et al., 2016).

Em campos de petróleo e sistemas associados, os principais gêneros encontrados são *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* (HAMILTON; LEE, 1995) e estão relacionados aos processos de *souring* e *biofouling*, caracterizados pela acidificação dos reservatórios e deposição das células sobre as superfícies, respectivamente (VIDELA, 2002). Como consequência, a biocorrosão ou corrosão microbiologicamente induzida (CMI) acomete o revestimento em aço de tanques e dutos, sendo os responsáveis diretos o H<sub>2</sub>S, em conjunto com o biofilme, que modifica o contato do material com o ambiente, favorecendo o processo corrosivo (ALABBAS et al., 2013a).

## 2.2 Biofilme

No ambiente, as células bacterianas geralmente adotam um modo de vida sésil, com a capacidade de associarem-se a superfícies bióticas ou abióticas a partir de interações entre as células e a superfície, e essa colonização é denominada biofilme. Os biofilmes são embebidos em uma matriz de moléculas poliméricas extracelulares (EPS) composta principalmente por proteínas, lipídeos, açúcares e

DNA extracelular que garantem proteção às células contra perturbações ambientais e agentes antimicrobianos (BERLANGA; GUERRERO, 2016).

O processo de alteração do modo de vida planctônico para a formação de biofilme pode ser desencadeado por condições fisiológicas e ambientais impostas às células como a limitação de nutrientes e densidade populacional, respostas controladas por c-di-GMP (segundo mensageiro) e o sistema de *quorum sensing* (FERRIOL-GONZÁLEZ; DOMINGO-CALAP, 2020; TOLKER-NIELSEN, 2015). A primeira etapa de formação do biofilme é um processo reversível, e nesse estágio o movimento flagelar é responsável por direcionar a célula à adesão inicial e garantir que forças de repulsão sejam superadas. Neste momento, ainda que a síntese de adesinas esteja ativa, a célula previamente aderida pode se desprender e voltar ao estágio de vida livre (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013).

Forças atrativas, como van der Waals, são responsáveis por garantir a adesão celular irreversível, de modo que a produção de adesinas é elevada para superar forças repulsivas e como consequência, ocorre a formação de microcolônias (CROUZET et al., 2014). O processo de maturação consiste em reverter a expressão gênica para favorecer o estágio sésil, contínua proliferação celular e consequente produção de EPS, que depende da síntese e secreção de moléculas para formar uma matriz que ofereça proteção e conectividade com o meio, proporcionando hidratação e captura de nutrientes (FLEMMING et al., 2016). O setor petrolífero enfrenta obstáculos para mitigar a formação de biofilmes por BRS, os quais se estabelecem devido à limitação nutricional, fluxo contínuo de água, temperaturas desfavoráveis e proteção a agentes químicos, e estão diretamente relacionados à biocorrosão de superfícies metálicas (PROCÓPIO, 2019).

De acordo com Flemming et al (2016), as células embebidas no biofilme são tolerantes à ação antimicrobiana e em condições de estresse, a exemplo da aplicação de biocidas, células em estado metabólico dormente podem não ser removidas, e o cenário pós aplicação é a retomada do crescimento microbiano, gerando um círculo vicioso que gera resistência bacteriana, aumento da dosagem e custos ao ambiente e segurança do manipulador (XU; GU, 2015).

### **2.3 Corrosão microbiologicamente induzida (CMI) na indústria petrolífera**

O processo de corrosão, disposto na ISO 8044:2020, inclui todo tipo de interação, geralmente de natureza eletroquímica, que altere a propriedade de metais

e ligas derivadas, como o aço carbono, sendo capaz de comprometer a estrutura e o funcionamento do material envolvido. De acordo com Prasad et al. (2020), as perdas econômicas globais vinculadas à corrosão chegam a ser em torno de US\$60 bilhões de dólares anualmente para a indústria de petróleo e gás, com impactos gerados na troca do equipamento, perda de eficiência e custos de manutenção.

O aço carbono é a liga metálica frequentemente utilizada em petrolíferas para construções que realizam o transporte e estocagem de óleo e derivados, sendo vantajoso por suas propriedades mecânicas eficientes e um custo relativamente menor que outros materiais (ALABBAS et al., 2013b). A exposição a diferentes fluidos como água do mar, água de produção e hidrocarbonetos, fonte de carbono para microrganismos, favorece a interação das células com a superfície e um posterior *biofouling*, e posteriormente, a atividade desses microrganismos culmina em biocorrosão ou CMI (ABDOLAHY et al., 2014; JIA et al., 2018b).

As perturbações causadas pela CMI apresentam-se inicialmente em pontos localizados, sendo morfológicamente caracterizados como pites (corrosão alveolar), fendas, rachaduras e galvânica (LITTLE; LEE, 2007). Em ambientes anaeróbios, a CMI é favorecida pela presença de bactérias produtoras de ácido, redutoras de nitrato, oxidantes de ferro, arqueas metanogênicas e as bactérias redutoras de sulfato, que se apresentam como o grupo comumente encontrado (LV et al., 2019).

Os mecanismos de biocorrosão induzida por BRS são divididos em dois grupos: o primeiro, a corrosão eletrogênica (E-MIC) ou também conhecida por reação anódica, e o segundo, a corrosão química (C-MIC) também conhecida como reação catódica (ENNING; GARRELF, 2014; KHOUZANI et al., 2019). Diante da ausência de compostos orgânicos, as BRS podem utilizar o ferro elementar (presente na composição química do aço carbono) como doador de elétrons a partir da sua oxidação. No segundo mecanismo, a ação corrosiva é indiretamente influenciada pela produção de um metabólito corrosivo, o  $H_2S$ , que ao reagir com o ferro, gera um precipitado negro típico da corrosão. É o processo mais distribuído e conhecido entre BRS. O  $H_2S$  é derivado da redução dissimilativa do sulfato e acarreta problemas como *souring*, alteração química da superfície metálica, toxicidade e tem seu potencial corrosivo exacerbado quando as células se organizam em biofilmes (CASTANEDA; BENETTON, 2008; VIEIRA, 2013).

Para controlar os danos causados pela CMI, três abordagens são comumente empregadas: métodos físicos, biológicos e químicos. Dentre os métodos físicos, a

limpeza mecânica e o revestimento de proteção se destacam, mas com limitações: além da arquitetura dos equipamentos que gera um acesso limitado, é necessário manter a segurança da equipe, frente a resíduos tóxicos do óleo e a exposição a ambientes hostis afeta a integridade do material de revestimento (CHRYSALIDIS; KYZAS, 2020; SHAW; HOFFMANN; HORNE, 2016; VARLEY; LEONG, 2016). Para as abordagens biológicas, podem ser citados a utilização de óleos essenciais (EO), como do capim-limão (KORENBLUM et al., 2013) e a exclusão biocompetitiva (BCX) (LAI et al., 2020). Entretanto, a atividade antimicrobiana dos óleos sobre as BRS ainda é pouco compreendida (SOUZA et al., 2017), e o favorecimento de bactérias redutoras de nitrato pela BCX pode estimular a biocorrosão e *souring* gerados por determinadas espécies capazes de reduzirem o sulfato e produzirem H<sub>2</sub>S (YUK et al., 2020).

Os biocidas são os principais agentes no espectro químico, sendo amplamente utilizado na indústria petrolífera. Ainda que sejam eficazes contra uma ampla gama de microrganismos, o uso constante de biocidas leva a seleção de células resistentes (RAJASEKAR et al., 2010). Além disso, os biocidas não são eficientes para remoção de biofilmes, são prejudiciais ao ambiente e possuem um alto custo para a indústria (LIN et al., 2012).

O biocida sulfato de tetrakis(hidroximetil)fosfônico (THPS) é um dos mais utilizados na indústria petrolífera para cessar a atividade microbiana que geram danos em dutos e tanques (PEREIRA; PILZ-JUNIOR; CORÇÃO, 2021). Entretanto, Xu & Gu (2015) apontam que, devido à resistência bacteriana, uma dosagem ecologicamente correta, que varia de 50 a 100 ppm, seria alterada para 500 a 1000 ppm para combater de modo eficaz células resistentes. Essa dosagem elevada, além do custo muito alto, culminaria em desequilíbrios ambientais e formação de incrustação nos equipamentos.

Visto esse cenário, os bacteriófagos líticos se mostram como possibilidades biológicas viáveis para o controle da biocorrosão, atuando diretamente em BRS (SUMMER et al., 2011) e agindo em biofilmes de hospedeiros inespecíficos (TAIT, 2002; DA SILVA DUARTE et al., 2018a). Assim como podem ser utilizados isoladamente, o efeito sinérgico de um coquetel fágico aumenta as probabilidades de eficácia e diminui as chances de resistência bacteriana (CHAN; ABEDON; LOC-CARRILLO, 2013).

## 2.4 Bacteriófagos e coquetéis fágicos

Os bacteriófagos (normalmente designados fagos) são vírus que infectam bactérias, e a depender do ciclo, podem causar a lise celular. São considerados seres ubíquos, com cerca de  $10^{31}$  partículas no ecossistema, dominando o ambiente marinho, onde participam da ciclagem de nutrientes, além de serem encontrados no solo, águas residuais e também na microbiota humana (MANN, 2005; ŽACZEK et al., 2020).

Diante de uma célula suscetível, os fagos injetam seu genoma no hospedeiro e a partir dessa etapa, dois ciclos tradicionais podem ser direcionados: o ciclo lisogênico, no qual o material genético viral será integrado ao cromossomo bacteriano, ou o ciclo lítico, que resulta na multiplicação de novas partículas e posterior lise celular, liberando novos vírions no meio. Ainda nos ciclos de multiplicação, duas outras estratégias são reconhecidas, como o ciclo pseudolisogênico, no qual o genoma fica livre no citoplasma e a depender das condições ambientais segue para lisogenia ou ciclo lítico, e a infecção crônica, na qual as partículas são liberadas por brotamento (LAWRENCE; BALDRIDGE; HANDLEY, 2019).

A ascensão de bactérias multirresistentes destacou a fagoterapia como um tratamento alternativo (KORTRIGHT et al., 2019), e os fagos líticos possuem vantagens como sua especificidade, a lise celular, baixa toxicidade, rápida formulação e aplicação, e eliminação de biofilmes (LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011). Os setores industriais se deparam com a ineficácia de desinfetantes para combater células persistentes (MC CARLIE; BOUCHER; BRAGG, 2020), a exemplo da resistência ao quaternário de amônio (BRAGG et al., 2014), e principalmente, para remoção de biofilmes, nos quais a aplicação de fagos já se mostra uma alternativa eficaz (GUTIÉRREZ et al., 2016). O produto Listex® P100 já é comercializado para o controle de *Listeria monocytogenes* com bons resultados (MIGUÉIS; SARAIVA; ESTEVES, 2017), assim como a dosagem de fagos em um sistema de água de fluxo contínuo pode auxiliar no controle de doenças que afetam a piscicultura, causadas por *Flavobacterium columnare* (LAANTO et al., 2015).

O isolamento de fagos para espécies do grupo BRS tem ganhado destaque (SUMMER et al., 2011; KARAMYSCHEVA et al., 2018; KRETZER KREMER et al., 2019), mas como no ambiente elas reúnem-se numa complexa comunidade, um

coquetel fágico, com ação polivalente, é capaz de aumentar o espectro de ação no biofilme (CHAN; ABEDON; LOC-CARRILLO, 2013).

Os coquetéis são preparações que contêm 2 ou mais fagos que interagem sinergicamente, uma opção eficiente para tratar biofilmes multi-espécies, uma vez que componentes estruturais dos fagos (como as enzimas depolimerases) podem hidrolisar de modo distinto o EPS, possibilitando ação de outro vírus (GEREDEW KIFELEW; MITCHELL; SPECK, 2019). Gong & Jiang (2015) demonstraram a eficácia de um coquetel contendo nove fagos para a redução do biofilme formado por três espécies de BRS em diversas superfícies, como em aço inox, borracha e plástico, e no setor hospitalar, Santiago et al. (2020), a partir de um coquetel com quatro fagos, também observaram a redução do biofilme multi-espécies relacionado a sistemas de lavagem de mãos. Em conjunto, a ação enzimática do coquetel é de extrema importância para a degradação da matriz EPS, e desse modo, mesmo em espécies não hospedeiras, os fagos podem ter um desempenho eficaz (TAIT et al., 2002; CARMO, 2019; DA SILVA DUARTE et al., 2018b).

O coquetel utilizado neste trabalho é composto por quatro bacteriófagos (vB\_EcoM-UFV09, vB\_EcoM-UFV10, vB\_EcoM-UFV13 e vB\_EcIM-UFV01) previamente submetidos a teste de estabilidade (térmica, pH e salinidade) e redução de biofilme de culturas não hospedeiras. As temperaturas avaliadas corresponderam ao ambiente, -20 °C, 37 °C, 55 °C, 80 °C e 95 °C. Sob congelamento, todos os fagos mantiveram o título inicial, e durante 5 min em 80 °C, os fagos vB\_EcoM-UFV10, vB\_EcoM-UFV13 e vB\_EcIM-UFV01 ainda apresentaram partículas viáveis. Em relação as faixas de pH avaliadas, 2, 4, 7, 10 e 12, apenas o pH = 2 foi responsável por inviabilizar as partículas virais, e quanto a salinidade da água do mar, todos os fagos se mantiveram estáveis.

Os testes de redução da formação de biofilme realizados individualmente em microplacas demonstraram que os fagos foram eficazes para diferentes linhagens bacterianas aeróbias, e quando testados em conjunto em culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato, o coquetel fágico foi eficiente em duas culturas, reduzindo o biofilme em aproximadamente 70% e 96%.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito de um coquetel de bacteriófagos sobre o biofilme e produção de H<sub>2</sub>S por culturas mistas de BRS em um sistema de tanques piloto.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Ajustar as condições necessárias para o cultivo anaeróbio em tanques piloto;
- Cultivar culturas mistas de BRS em tanques piloto;
- Avaliar o crescimento das culturas mistas em estudo;
- Avaliar o coquetel fágico na prevenção da formação de biofilme e controle de H<sub>2</sub>S em tanques piloto;
- Simular o armazenamento de fluidos e a biocorrosão no aço carbono de um ambiente industrial em tanques piloto.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

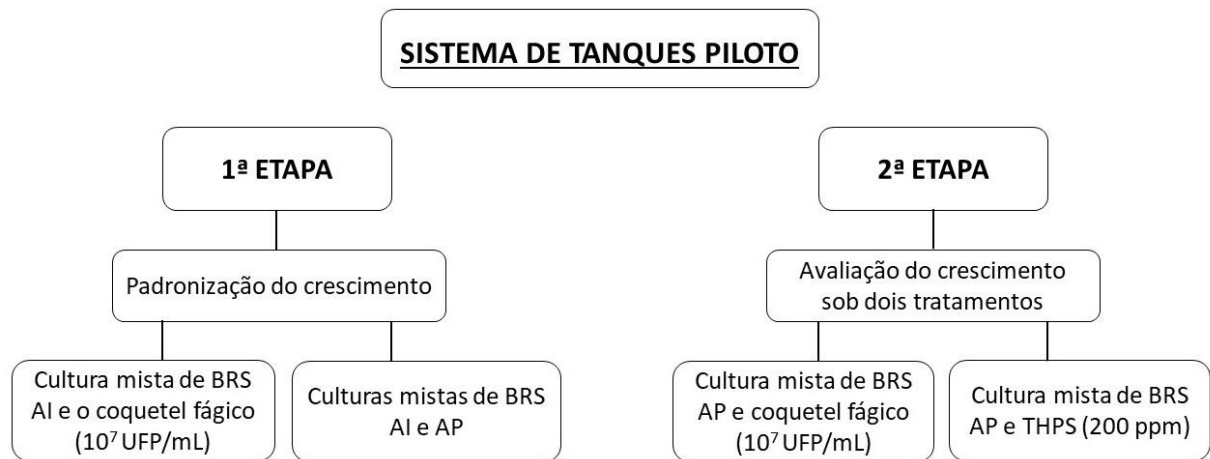
### **4.1 Delineamento experimental**

O sistema de tanques piloto foi projetado para reproduzir em larga escala os experimentos prévios realizados em bancada com o coquetel fágico, e dessa forma aproximar da realidade industrial o tratamento alternativo para a biocorrosão proposto neste trabalho. Os ensaios foram organizados em duas etapas: primeiramente, a padronização do crescimento nos tanques das culturas mistas de BRS, aqui denominadas AI (água de injeção) e AP (água de produção), e em seguida a avaliação do crescimento da cultura mista AP sob dois tratamentos, o biocida comercial THPS e coquetel fágico (figura 1).

O primeiro ensaio (figura 1 – 1ª etapa) consistiu em padronizar o crescimento da cultura mista AI no sistema de tanques e avaliar o efeito do coquetel fágico nessa cultura. Nesse ensaio, dois tanques foram montados: o controle, no qual a cultura AI foi inoculada na ausência do coquetel fágico, e o tratamento, no qual 80 mL coquetel (10<sup>7</sup> UFP/mL no tanque) foi dosado no sistema no momento da inoculação da cultura. Em seguida, um segundo experimento foi conduzido sem adição de tratamento, no qual além da cultura mista AI, foi avaliado o crescimento de uma nova cultura mista de interesse, AP, com o objetivo de padronizar ambas as culturas trabalhadas.

Após os experimentos mencionados acima, a segunda etapa consistiu em analisar o crescimento da cultura mista AP sob dois tratamentos aplicados no sistema de tanques. O primeiro experimento avaliou o efeito do biocida comercial THPS, sendo esse produto adicionado em uma concentração final de 200 ppm assim que o inóculo

foi realizado, e por fim, foi avaliado o efeito do coquetel fágico ao adicioná-lo após o crescimento inicial da cultura mista, assim que ocorreu um máximo de produção de H<sub>2</sub>S. Durante esse experimento, ao observar o declínio do crescimento de ambas as populações dos tanques, controle e tratamento, uma nova aplicação de solução nutritiva (descrita no tópico 4.3.3) foi realizada para observar o efeito do coquetel diante do restabelecimento da cultura.



**Figura 1.** Esquema dos experimentos realizados no sistema de tanques piloto. A 1ª etapa é caracterizada pela padronização do crescimento, avaliando inicialmente o efeito do coquetel fágico na cultura mista AI, e logo depois apenas o crescimento das culturas AI e AP no sistema de tanques. A 2ª etapa corresponde ao experimento conduzido com a cultura mista AP e o biocida THPS, e em seguida, a cultura mista AP com o coquetel fágico.

#### 4.2 Cultivo das culturas mistas de BRS

Dentre a bacterioteca do Laboratório de Imunovirologia Molecular, da Universidade Federal de Viçosa – Viçosa/MG (LIVM/UFV), a cultura mista de BRS denominada AI apresenta origem diversa, sendo a mistura de água de injeção de várias plataformas da Bacia de Santos, Brasil. A cultura denominada AP é derivada de tanque de carga de uma plataforma *offshore*, localizada na Bacia de Campos, Brasil.

As culturas foram mantidas no LIVM a 30 °C em meio de cultura anaeróbio Postgate E (POSTGATE, 1984) modificado (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1 g/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L, CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1 g/L, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>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), tendo como base água do mar natural.

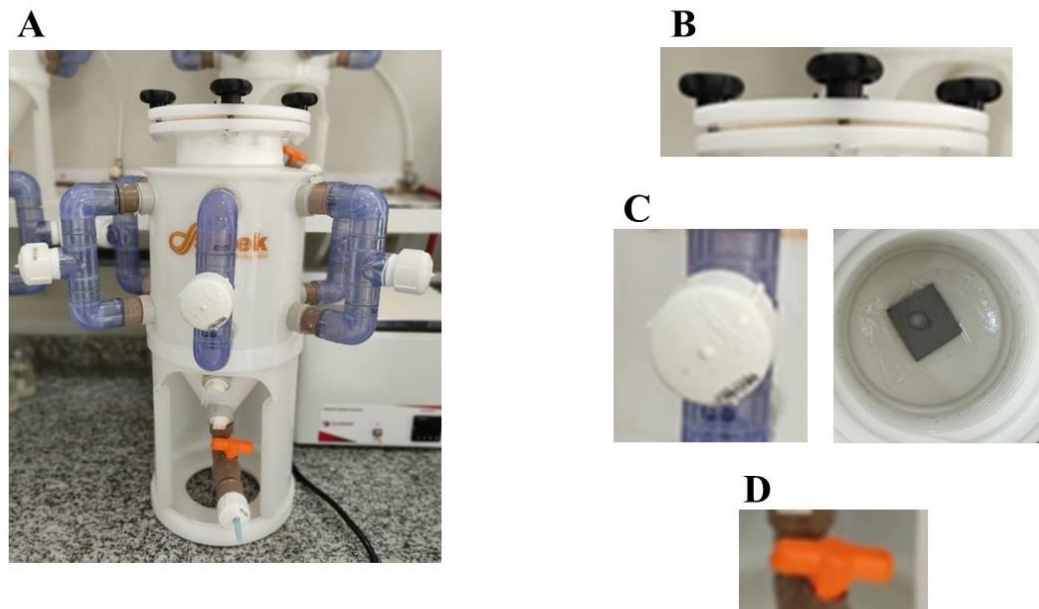
Para realização dos pré-inóculos, repique de 10% da cultura foi adicionado em frascos de penicilina de 50 mL, contendo 45 mL de meio anaeróbio Postgate E. As amostras foram incubadas em estufa a 30 °C durante 7 dias.

Após o crescimento, alíquotas de 40 mL foram retiradas para compor um inóculo de 400 mL total, em meio Postgate E preparado em frascos Schott de 500 mL. Esse procedimento foi realizado em câmara de anaerobiose (Whitley A95®) sob atmosfera de H<sub>2</sub> (10%), CO<sub>2</sub> (10%) e N<sub>2</sub> (80%). Os frascos foram incubados na câmara de anaerobiose a 30 °C durante 7 dias.

### 4.3 Sistema de tanques piloto

#### 4.3.1 Estrutura do sistema de tanques piloto

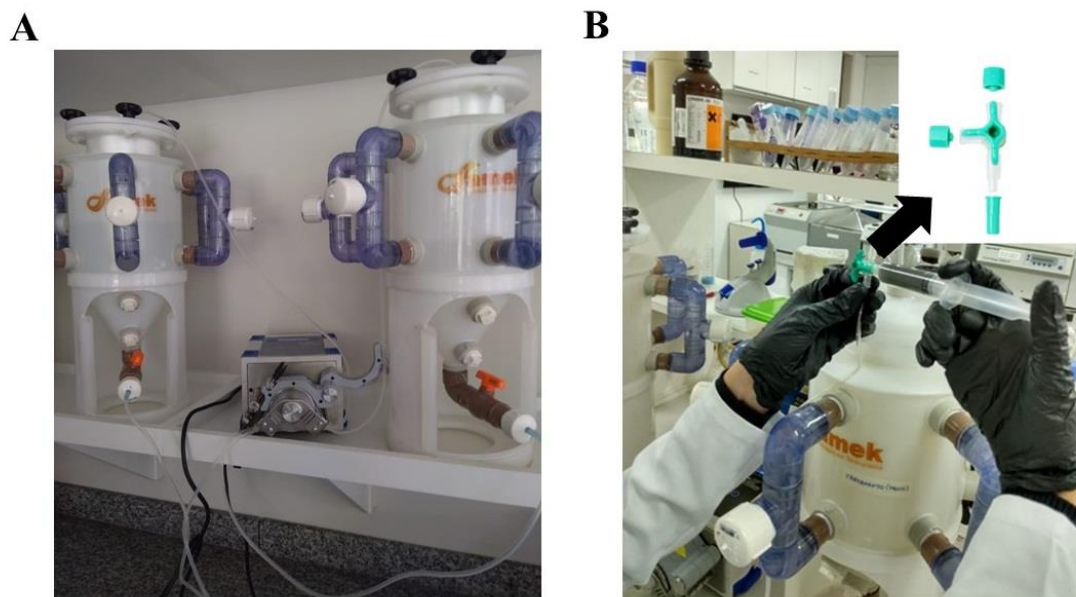
Os tanques piloto são estruturas com volume útil de 8 L constituídas, no corpo, por material plástico, e os “braços” de material policloreto de vinila (PVC) transparente, pelos quais é possível visualizar o volume do sistema (Figura 2A). A parte superior é composta por uma tampa com 4 roscas e uma borracha para permitir maior vedação e anaerobiose do sistema (Figura 2B). Cada “braço” contém um tampão, no qual os corpos de prova foram inseridos (Figuras 2C), e a parte inferior possui uma válvula que permite circular o volume a ser trabalhado (Figura 2D).



**Figura 2.** Sistema de tanques piloto instalados no Laboratório de Imunovirologia Molecular. A figura 2A representa a estrutura completa do sistema de tanques piloto. A figura 2B apresenta a parte superior da primeira imagem, destacando a tampa com quatro roscas para o fechamento completo da estrutura. As figuras em 2C destacam o tampão onde foi acoplado

os cupons de aço carbono, e cada tanque possui 6 tampões. A figura 2D apresenta a parte inferior do tanque, destacando a válvula que permite o abre/fecha para o fluido armazenado.

Ainda na parte inferior, a circulação do volume contido nos tanques foi realizada por um sistema de mangueiras acoplado, concomitantemente, à saída da válvula, à uma bomba peristáltica e a um tampão na parte superior do tanque (figura 3A). Para a coleta de amostras, uma torneira de 3 vias (*triway*) foi inserida em cada uma das mangueiras (figura 3B).



**Figura 3.** Sistema de mangueiras acoplado aos tanques piloto e à bomba peristáltica. (A) Apresenta como foi realizada a circulação, a partir da saída próxima à válvula; (B) destaca o *triway* inserido nas mangueiras.

#### 4.3.2 Corpos de prova

Os corpos de prova utilizados como suporte para a formação de biofilmes no sistema de tanques foram cupons de aço carbono AISI 1020, com dimensões 10,0 x 10,0 mm. Para a limpeza, os cupons foram submersos em solução específica para o aço carbono, disposto na ISO8407:2009, composta por HCl 50% (v/v) e adicionada de 3,5 g de hexametileno de tetramina durante 10 min, e em seguida a massa determinada em balança analítica. Os cupons foram mantidos em dessecador até a realização do experimento.

#### 4.3.3 Montagem do sistema de tanques piloto

Os cupons previamente limpos foram inseridos com fita dupla face nos tampões laterais dos tanques, que estavam em contínuo contato com o fluido do sistema. Para iniciar os primeiros experimentos, foram preparados 20 L de água do mar sintética (NaF 0,003 g/L, SrCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,02 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,03 g/L, KBr 0,1 g/L, KCl 0,7 g/L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,113 g/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,0 g/L, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 10,78 g/L, NaCl 23,5 g/L, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O 0,02 g/L, Na<sub>4</sub>EDTA 0,001 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0,2 g/L, pH 8-8,1) e posteriormente, filtrada em membrana de 0,45 µm e armazenada sob refrigeração. Para a transferência aos tanques, a água foi aquecida até aproximadamente 45 °C e purgada com N<sub>2</sub> industrial (99,9%) por 30 min para maior eficiência de retirada de oxigênio. Foram transferidos 6,8 L dessa água para cada um dos tanques, controle e tratamento. Durante esse processo, os tanques foram mantidos sob purga constante de nitrogênio.

Os tanques foram suplementados em 10% do volume (800 mL) com uma solução nutritiva em concentração 10X (extrato de levedura 10 g/L, glicose 2,5 g/L, lactato de sódio 40 mL/L). Essa solução também foi aquecida previamente e purgada com N<sub>2</sub> durante 15 min. Em seguida, durante os respectivos experimentos, 400 mL do inóculo da cultura A e B foram transferidos para cada um dos tanques (controle e tratamento) utilizando o sistema de bomba peristáltica, e seguindo o mesmo modo, o tratamento também foi aplicado no momento estabelecido. Esse sistema também permitiu a circulação de todo o volume e pausas na circulação, reproduzindo situações semi-estáticas de um tanque de armazenamento.

Os tanques foram mantidos em condições semi-estáticas durante todo o experimento. Diariamente, o fluido do sistema foi recirculado por, aproximadamente, 1 h antes e após a coleta de amostras para análise do crescimento microbiano por leitura de DO<sub>600nm</sub> e acompanhamento da produção de H<sub>2</sub>S por titulação potenciométrica. A coleta de amostras foi realizada utilizando seringa estéril acoplada à torneira de 3 vias (*triway*), adaptada ao sistema de mangueiras (figura 2B). As amostras coletadas foram imediatamente transferidas para tubos Hungate, previamente purgados com nitrogênio.

A estimativa de BRS viáveis e quantificação de adenosina trifosfato (ATP) no fluido dos tanques foram ainda utilizados para acompanhamento do crescimento microbiano em pontos considerados críticos do experimento (tempo zero-montagem dos tanques, ao atingir um máximo de H<sub>2</sub>S, e no último dia do ensaio). Ao final do experimento, os cupons foram removidos dos tanques (controle e tratamento),

processados e submetidos às seguintes análises para avaliação do biofilme e corrosão: concentração de ATP no biofilme, microscopia eletrônica de varredura (MEV), perfilometria óptica, perda de massa/taxa de corrosão e estimativa de células aderidas.

#### 4.4 Formulação do coquetel de bacteriófagos

O coquetel fágico foi composto pelos seguintes fagos isolados no LIVM: vB\_EcoM-UFV09, vB\_EcoM-UFV10, vB\_EcoM-UFV13, os quais utilizam *Escherichia coli* 30 como hospedeira e o fago vB\_EclM-UFV01, o qual utiliza *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 como hospedeira.

Inicialmente foram realizados pré-inóculos em frascos Erlenmeyers de 500 mL, correspondendo à *E. coli* 30, estirpe isolada de mastite bovina e cedida pela EMBRAPA® Gado de Leite, e *E. cloacae* ATCC 13047. Em 300 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB – NaCl 10 g/L, peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L) foi adicionada uma colônia isolada de cada um dos hospedeiros, e em seguida os frascos foram incubados a 37 °C, sob agitação de 150 rpm, por 24 h. No dia seguinte, após a leitura da densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ), o volume da suspensão a ser adicionada em um novo meio LB para compor o inóculo foi ajustado, de modo que a  $DO_{600nm}$  final estivesse em 0,1 em Erlenmeyers de 1 L contendo 600 mL de meio LB.

Durante fase logarítmica ( $DO_{600nm}$  0,6) foi acrescentada à cultura uma alíquota de cada suspensão viral, de modo a obter uma concentração final de  $10^7$  unidades formadoras de placa de lise por mililitro (UFP/mL). A propagação foi mantida a 37 °C, sob agitação de 150 rpm, durante 24 h. Após esse período, o propagado foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado a 8000 g, 4 °C, 15 min. O sobrenadante foi recuperado e filtrado em membranas de 0,22 µm (Kasvi®).

Para a titulação viral, foram realizadas diluições seriadas em tampão SM (NaCl 5,8 g/L, MgSO<sub>4</sub> 2g/L, Tris-HCl 6,057 g/L, gelatina 0,1 g/L, pH 7,5) com cada um dos fagos descritos. Brevemente, 100 µL das diluições feitas na proporção 1:9 foram transferidos para 900 µL de cultura de *E. coli* 30 e *E. cloacae* ATCC 13047, previamente crescidas até  $DO_{600}$  0,6. A mistura foi plaqueada pelo método de dupla camada e as placas incubadas a 37 °C por 24 horas. As placas de lise formadas na superfície do ágar foram contadas e o título viral de cada fago determinado conforme descrito:

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

Após determinar o título, os fagos foram combinados em uma única solução de 80 mL em concentração de  $10^9$  UFP/mL, de modo que em 8 L, a concentração chegaria ao desejado,  $10^7$  UFP/mL. O coquetel foi armazenado sob refrigeração, a 4 °C.

#### 4.5 Análises do crescimento planctônico

Para avaliar o crescimento da cultura, diariamente foram recolhidas amostras em triplicata de 10 mL e transferidas para tubos Hungate, nos quais foram feitas as leituras de  $DO_{600nm}$  em espectrofotômetro (Hach®). A titulação potenciométrica de  $H_2S$  foi realizada em titulador automático (Mettler Toledo®), utilizando  $AgNO_3$  como titulante. Brevemente, 1 mL da amostra foi adicionada à solução sequestrante de  $H_2S$  (NaOH 50 mL e  $NH_4OH$  5 mL), e submetido à análise no titulador.

A estimativa de células viáveis de BRS no fluido e no biofilme foi determinada pelo método dos tubos múltiplos – número mais provável (NMP). O NMP foi realizado a partir de 1 mL da amostra (controle e tratamento) diluída seriadamente em salina redutora (NaCl 3,5% m/v) até  $10^{-7}$  e, em seguida, transferido 1 mL das diluições para suas respectivas triplicatas de meio de cultura anaeróbio Postgate E (9 mL) adicionado de  $FeSO_4$  (0,5 g/L) (figura 4). Os kits de NMP foram mantidos em estufa a 30 °C durante 28 dias. A observação de um precipitado preto foi considerada resultado positivo de crescimento de BRS.

A atividade metabólica também foi avaliada pela produção de ATP (LuminUltra® ATP Testing KIT). Para as células presentes no fluido, 1 mL de amostra (controle e tratamento) foi filtrado em filtros de seringa (0,22  $\mu m$ ) de modo a reter as células. Em seguida, 5 mL do tampão LumiClean® foi adicionado à seringa e o filtro reconectado, lavando as células presentes. A etapa de secagem é essencial para retirada de resquícios do tampão, dessa forma o filtro foi conectado a uma seringa de 60 mL e o êmbolo pressionado até o fim. Com o filtro seco, 1 mL do tampão de lise UltraLyse® foi adicionado à seringa e filtrado em 9 mL da solução de diluição UltraLute®, invertida 3x após a filtração. Para a quantificação do ATP, foram adicionados 100  $\mu L$  da enzima Luminase® e 100  $\mu L$  do UltraCheck® em um tubo de ensaio, agitado suavemente 5x e em seguida inserido no luminômetro, determinando a concentração do estoque de

enzima. Para as amostras, 100  $\mu\text{L}$  da enzima foram misturados com 100  $\mu\text{L}$  do UltraLute<sup>®</sup> de cada um dos tanques. O resultado final foi calculado pela fórmula:

$$c_{ATP} \text{ (pg ATP/mL)} = \frac{RLU_{cATP}}{RLU_{ATP1}} \times \frac{10\,000 \text{ (pg ATP)}}{\text{Volume da amostra (mL)}} \quad (\text{Equação 2})$$

na qual  $RLU_{cATP}$  corresponde ao valor encontrado para a amostra e  $RLU_{ATP1}$  o valor obtido pela enzima. A concentração final foi obtida em pg ATP/mL.



**Figura 4.** Kit de número mais provável (NMP) utilizado para estimativa de células viáveis de bactérias redutoras de sulfato (BRS) no fluido do sistema de tanques piloto. O kit é constituído por salinas redutoras e frascos com meio de cultura anaeróbio. Cada salina representa uma diluição, iniciando da  $10^{-1}$  até  $10^{-7}$ . Os meios de cultura apresentam a cor rosa antes da inoculação e caso não apresente crescimento após 28 dias de incubação a 30 °C. A presença de precipitado preto nesses frascos demonstra o crescimento de BRS.

## 4.6 Caracterização do biofilme

### 4.6.1 Concentração de ATP no biofilme

Para as células do biofilme, os cupons correspondentes aos tanques foram analisados pelo método “Biofilm Collector” (LuminUltra<sup>®</sup> ATP Testing KIT). Após a imersão na solução UltraLyse<sup>®7</sup> (Extraction) Tube, os tubos foram agitados vigorosamente para expor ao máximo o material da superfície ao fluido, e em seguida deixados em repouso por 5 min. Assim como o método anterior, a diluição da amostra foi realizada a partir de 1 mL adicionado a 9 mL da solução de diluição UltraLute<sup>®</sup>, invertendo 3x para homogeneizar. Após checagem da concentração da enzima, 100

$\mu\text{L}$  dessa foram misturados com 100  $\mu\text{L}$  de cada uma das diluições dos cupons. O resultado final foi obtido pela fórmula:

$$tATP \text{ (pg ATP/cm}^2\text{)} = \frac{RLU_{tATP} \times 50\,000}{RLU_{ATP1} \times \text{área (cm}^2\text{)}} \quad (\text{Equação 3})$$

na qual  $RLU_{tATP}$  corresponde ao valor encontrado para a amostra,  $RLU_{ATP1}$  o valor obtido pela enzima, e a área correspondente à área do cupom, 1  $\text{cm}^2$ .

#### 4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O biofilme formado sobre a superfície dos cupons nos tanques controle e tratamento foi analisado por Microscopia Eletrônica de Varredura no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM/UFV), com a metodologia adaptada de Wang (2012). Os cupons foram submetidos a 3 lavagens sequenciais em tampão PBS 1X (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,44 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g/L, pH 7,4) para remoção de células não aderidas, e em seguida fixados em paraformaldeído 4% (v/v) durante 26 horas em temperatura ambiente. No dia seguinte, os cupons foram lavados novamente com PBS 1X, e imediatamente desidratados em progressivas soluções de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 90 e 100%) por 10 minutos cada, e a etapa de álcool 100% repetida 3x para remoção completa de água. Após essa etapa, foram submetidos à secagem em ponto crítico (Critical Point Dryer - CPD Bal-tec® 030), fixados em porta-espécimes (*stubs*) e metalizados com ouro (Metalizador Quorum® Q150R S). A visualização das imagens foi realizada no Microscópio de Varredura Leo 1430VP.

#### 4.6.3 Estimativa de células aderidas

Para desprender e quantificar as células de BRS no biofilme, cupons em triplicata foram submetidos à sonicação em banho de ultrassom (Cristófoli®). Os cupons foram lavados rapidamente 3x em salina redutora para remoção de células não aderidas e, em seguida, transferidos para frascos contendo salina redutora anaeróbia, os quais foram submetidos à sonicação de 3 ciclos de 1 min. Após o término, 1 mL da solução sonicada foi aplicada em kits de NMP, realizando inicialmente a diluição seriada em salina redutora e logo depois, o diluído transferido para seus respectivos meios de cultura Postgate E, adicionado de  $\text{FeSO}_4$ . Os kits, em triplicata, foram incubados a 30 °C durante 28 dias.

#### 4.6.4 Perda de massa e taxa de corrosão

A perda de massa foi realizada subtraindo a massa inicial dos cupons pela massa final após o processo de corrosão. Para essa análise, os cupons foram submetidos às etapas de limpeza para remoção de depósitos de corrosão, empregando uma solução específica para o aço carbono, disposta na ISO8407:2009: HCl 50% (v/v) adicionada de 3,5 g de hexametileno de tetramina. Os cupons foram submersos na solução de 10 a 20 minutos, a depender do estado de corrosão apresentado, e decorrido o tempo, secos à temperatura ambiente e a massa determinada em balança analítica. A taxa de corrosão foi obtida de acordo com a norma da *American Society for Testing and Materials* – ASTM G1 – 03 pela fórmula:

$$\frac{K \times W}{A \times T \times D} \quad (\text{Equação 4})$$

na qual K é uma constante em milímetros/ano (mm/ano) estabelecida em  $8,74 \times 10^4$ , W é a perda de massa em gramas, A é a área em  $\text{cm}^2$ , T é o tempo de exposição em horas, e D é a densidade do material em  $\text{g/cm}^3$ .

#### 4.6.5 Perfilometria óptica

A análise do efeito do biofilme sobre as superfícies dos cupons foi realizada no perfilômetro óptico 3D Contour-GT K, Buker®, que faz parte do Sistema de Laboratórios em Nanoscopia (SISNano) da UFV. Após três lavagens em série em tampão PBS 1X (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,44 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g/L, pH 7,4), os cupons foram secos em estufa e mantidos no dessecador até a data de análise. A partir do escaneamento da superfície dos cupons, a interferência dos feixes nos eixos x, y e z foi plotada em um mapa topológico em imagens 3D, obtendo as medidas de rugosidade média ( $R_a$ ), altura máxima do pico ( $R_p$ ), raiz quadrada média ( $R_q$ ), valor total de picos e vales ( $R_t$ ) e profundidade média do vale ( $R_v$ ).

#### 4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® 8 a partir do teste-T não pareado para comparação do grupo controle com grupo tratamento, sendo P valor  $<0,05$  considerado significativo e representado por asterisco (\*).

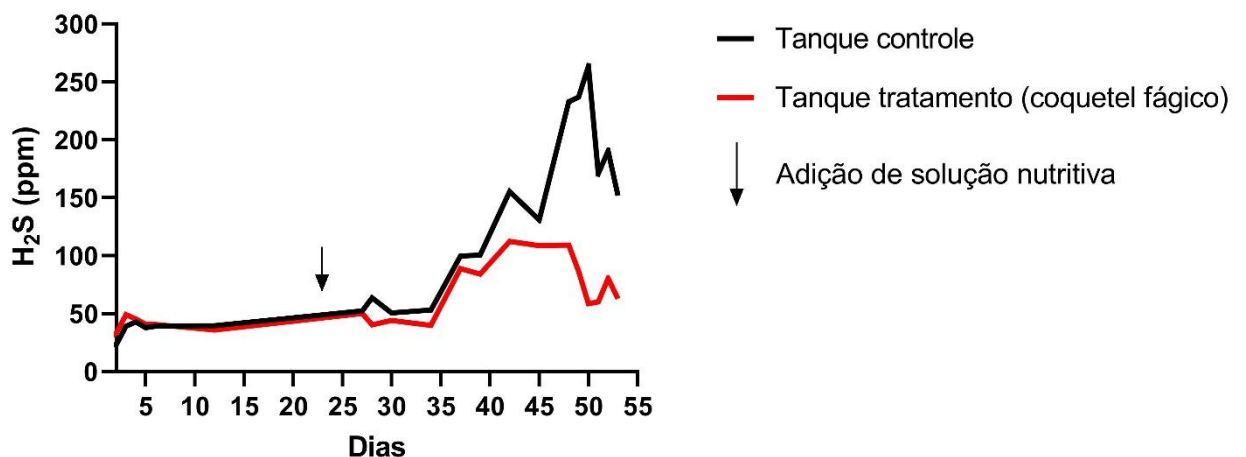
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Cultura mista AI

### 5.1.1 Produção de H<sub>2</sub>S

A figura 5 mostra a variação da concentração de H<sub>2</sub>S na cultura mista de BRS AI ao longo de 55 dias em sistema de tanques. Inicialmente, a cultura necessitou de uma adaptação aos tanques, uma vez que a estrutura e as condições do ambiente eram diferentes daquela em menor escala. Dessa forma, os níveis de H<sub>2</sub>S permaneceram aproximadamente em torno de 50 ppm durante os primeiros 20 dias.

Ao 23° dia, uma nova aplicação de solução nutritiva foi realizada em ambos os tanques para auxiliar no crescimento; nesse momento, 800 mL foram retirados pela bomba peristáltica e 800 mL da solução nutritiva transferida aos tanques. O resultado da disponibilidade de novos nutrientes foi observado após o 35° dia, quando a titulação de H<sub>2</sub>S atingiu 100 ppm e nesse momento foi observado uma diferença maior entre o tanque controle e tratamento, que permaneceu nos dias seguintes. Após dias de crescimento, o máximo de H<sub>2</sub>S foi atingido pela população do tanque controle com 263,584 ppm no 50° dia, enquanto a população presente no tanque tratamento já apresentava queda no crescimento, com 58,512 ppm. A partir desses resultados, foi possível concluir uma redução de até 77,8% do nível de H<sub>2</sub>S, mostrando que o coquetel foi eficaz em sua interferência no crescimento da AI. Ao final de 55 dias, ambos os tanques apresentaram decaimento no crescimento, encerrando o experimento inicial.

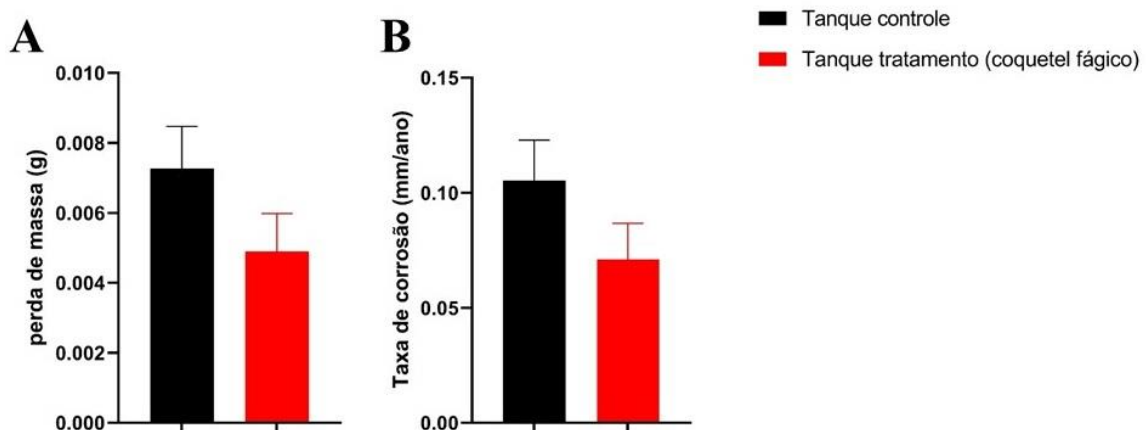


**Figura 5.** Curva de produção de H<sub>2</sub>S pela cultura mista de bactérias redutoras de sulfato AI durante 55 dias em sistema de tanques na ausência (controle) e presença (tratamento) do coquetel fágico (10<sup>7</sup> UFP/mL) adicionado no início do ensaio. A seta indica o momento da reaplicação da solução nutritiva.

### 5.1.2 Perda de massa e taxa de corrosão

A figura 6A apresenta a diferença entre as médias das massas iniciais pela média das massas finais dos cupons, após 55 dias em contato com a cultura AI. A média dos cupons no tanque controle apresentou-se maior que aquela do tanque contendo o coquetel, evidenciando que os cupons perderam relativamente mais massa quando não exposto a um tratamento que freasse a oxidação causada pela atividade bacteriana. De forma contrária, os cupons no tanque em que havia sido adicionado o coquetel apresentaram menor perda de massa, indicando uma atividade preventiva do coquetel.

A taxa de corrosão, assim como a perda de massa, também foi maior para o tanque controle quando comparado ao tanque tratamento (figura 6B). Em valores, o controle teve a taxa de corrosão em 0,1052 mm/ano, enquanto o tratamento 0,0711 mm/ano, uma diferença média de 32,4% na taxa de corrosão do controle em relação ao tratamento com o coquetel fágico.



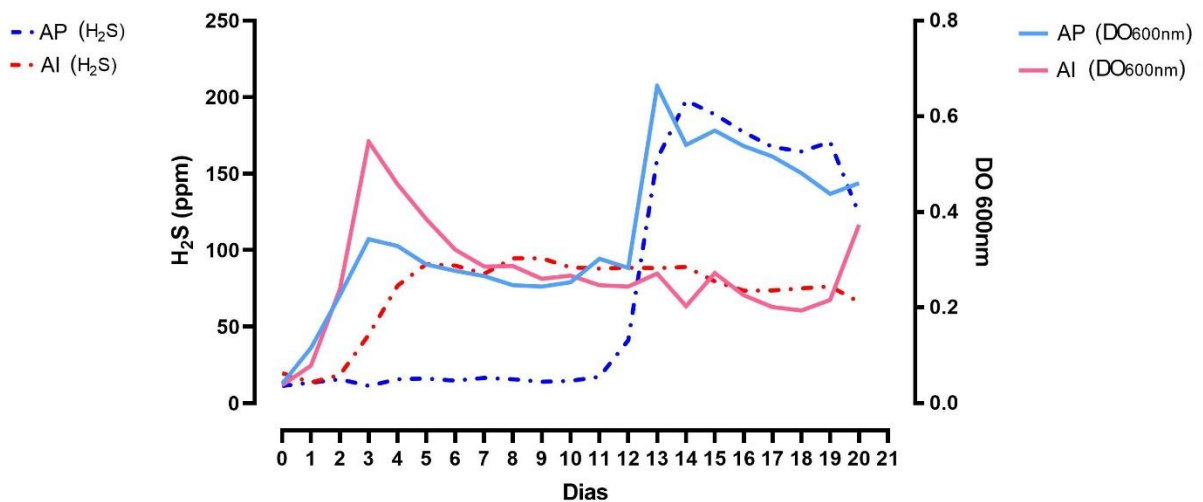
**Figura 6.** Representação gráfica da média da perda de massa (A) e taxa de corrosão (B) dos cupons AISI1020 após 55 dias em tanques inoculados com a cultura mista AI na ausência (controle) e presença (tratamento) do coquetel fágico ( $10^7$  UFP/mL).

### 5.2 Padronização do cultivo das culturas mistas de BRS AI e AP

A partir da figura 7 é possível perceber que nos primeiros 3 dias ocorre um pico na leitura de  $DO_{600nm}$ , sendo mais evidente em AI. Ao 5º dia, a cultura AI apresenta o máximo de  $H_2S$  de 91,024 ppm, menor que do primeiro experimento, porém em um intervalo menor de tempo e estável ao longo dos 20 dias de análise. A cultura AP demonstrou um crescimento mais lento por apresentar um período de adaptação ao ambiente. O aumento de  $H_2S$  ocorreu no 14º dia, atingindo 197,896 ppm e,

concomitantemente, um aumento na  $DO_{600nm}$  também foi observado, indicando a atividade bacteriana anaeróbia.

Com a realização desse experimento, pôde-se concluir o tempo de duração dos próximos ensaios, pois ao adicionar a solução nutritiva 10X nos tanques foi possível obter uma redução dos dias de análise, de 55 dias para 21 dias. Além disso, pôde-se observar a curva de crescimento de duas culturas mistas de BRS, que apresentaram comportamentos diferentes nos tanques. Por fim, foi possível entender qual o máximo de  $H_2S$  as culturas atingiriam em um sistema que tenta se aproximar da realidade.



**Figura 7.** Padronização do cultivo das culturas mistas de bactérias redutoras de sulfato AI e AP em sistema de tanques piloto durante 21 dias. O crescimento foi acompanhado por leitura de densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) e produção de  $H_2S$ .

### 5.3 Cultura mista AP

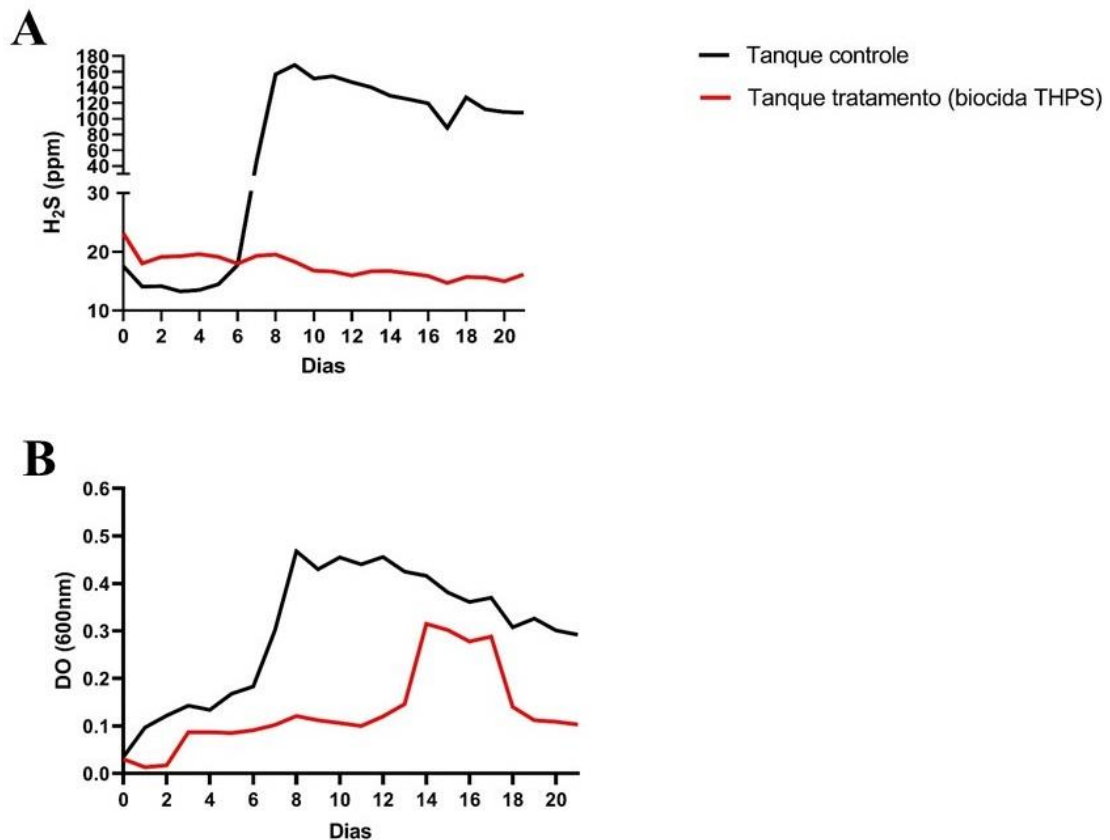
#### 5.3.1 Avaliação do THPS no controle da produção de $H_2S$

Uma vez que o comportamento da cultura já era conhecido, a partir do 6º dia a curva de  $H_2S$  já iniciou sua ascensão, e no 10º dia atingiu o máximo de 178 ppm (figura 8A). Ao comparar com o THPS, percebe-se como ele limitou o crescimento da cultura desde o início, não ultrapassando os níveis basais, o que já era esperado pois é um produto de ação imediata. Assim como no experimento anterior, após o pico, a cultura começa a ter um declínio com o passar dos dias, de modo que pouco se alterou ao término do experimento, variando entre 120 a 100 ppm até o final de 21 dias.

A leitura de  $DO_{600nm}$  foi estabelecida logo após o experimento de padronização do crescimento, pois ajudou na compreensão da curva anaeróbia. Durante os primeiros 6 dias o crescimento aeróbio está presente no tanque controle, auxiliando

no consumo de oxigênio e deixando o sistema mais anaeróbico, o que facilita o crescimento da cultura de interesse (figura 8B). O pico da  $DO_{600nm}$  ocorre similarmente ao máximo de produção de  $H_2S$ , no 8º dia, e em seguida se inicia um declínio no crescimento. O interessante é a comparação ao tanque que recebeu THPS.

Diferente do observado na figura 8A, aqui a curva de THPS sofre uma alteração a partir do 3º dia, onde é possível observar um crescimento bacteriano mesmo diante do biocida, provavelmente derivado de células resistentes à ação desse produto. Ainda a partir do 14º dia, ocorre um aumento na  $DO_{600nm}$ , que mesmo abaixo do controle, consegue atingir cerca de 0.3 de absorbância. Seguido do pico, ocorre um declínio no crescimento das resistentes, até o final dos 21 dias.



**Figura 8.** Curva de produção  $H_2S$  (A) e  $DO_{600nm}$  (B) pela cultura mista de bactérias redutoras de sulfato AP em sistema de tanques na ausência (controle) e presença de 200 ppm de THPS (tratamento).

### 5.3.2 Estimativa de células planctônicas e aderidas por NMP

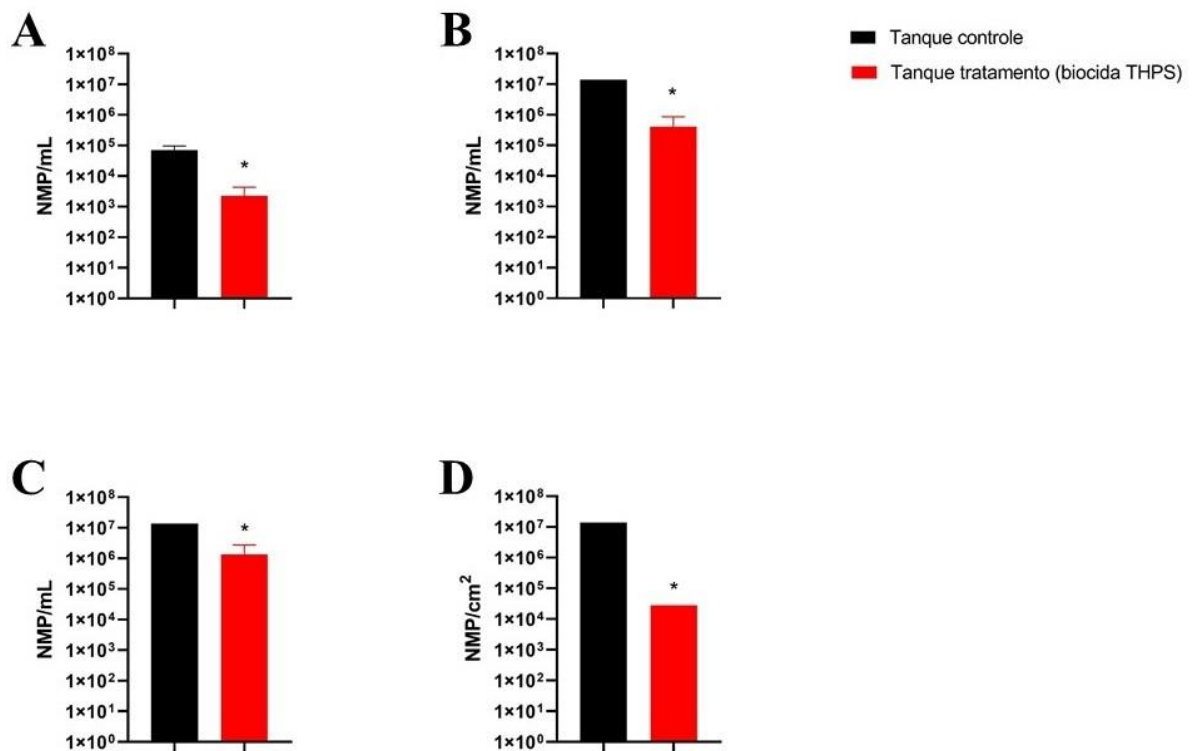
O NMP auxiliou na quantificação de células de BRS viáveis nos tanques, e a figura 9 apresenta os resultados referentes aos três períodos de análise das células

planctônicas (figuras 9A, B e C), assim como os cupons que foram sonicados para determinar a quantidade de células do biofilme (9D).

A inoculação da amostra no kit, assim como as demais análises do tempo 0, ocorreram logo após a homogeneização do volume do tanque (figura 9A). Percebe-se que a estimativa de células presentes no tanque controle estava próximo de  $10^5$  NMP/mL, enquanto no tanque tratamento diminuiu em quase 2 logs, o que demonstra uma ação rápida do THPS na cultura AP. Com 10 dias (figura 9B), no máximo de crescimento do tanque controle, esse aumentou a quantificação em relação ao período inicial, e o tanque tratamento retomou seu crescimento, aumentando de  $10^3$  (figura 9A) para  $10^6$  NMP/mL. O último dia de análise (figura 9C) não apresentou-se muito diferente em relação ao pico, com destaque para uma pequena redução na quantificação do tanque tratamento. A diferença entre controle e tratamento ainda permaneceu significativa, mas é notável que mesmo diante de um produto químico que cessa o crescimento imediatamente, algumas células resistentes conseguem sobressair e crescerem no sistema.

Os cupons sonicados apresentaram diferença significativa quanto à quantidade de BRS no biofilme, sendo  $10^7$  NMP/mL nos cupons do tanque controle e  $10^4$  NMP/mL no tanque tratamento com THPS (figura 9D).

O biocida não apresenta muita eficiência na remoção de células do biofilme, logo o resultado abaixo provavelmente está ligado à baixa adesão inicial das células à superfície dos cupons em consequência da ação imediata do THPS nas células planctônicas e, dessa forma, a quantificação foi menor que aquela apresentada no controle, no qual as células não encontraram nenhum agente estressante.

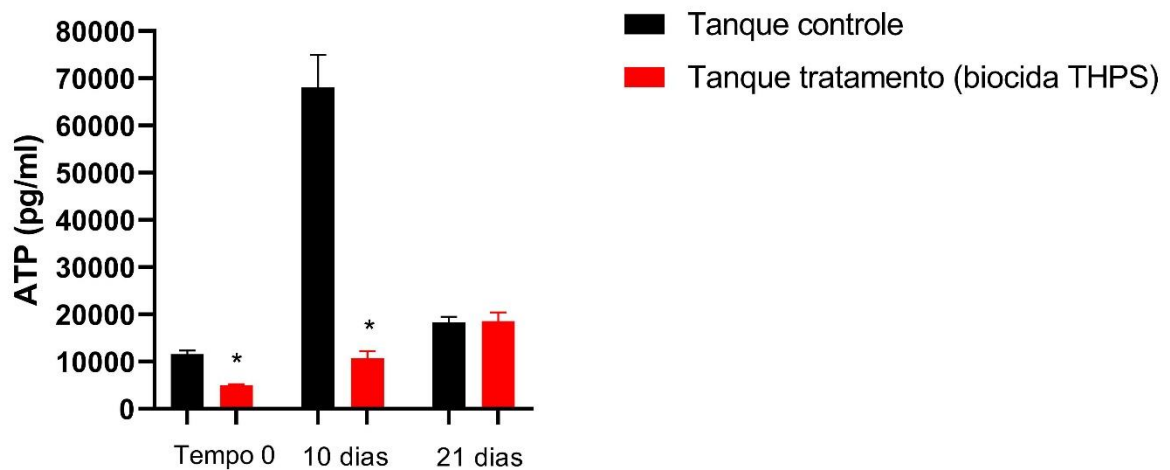


**Figura 9.** Estimativa de células planctônicas e aderidas a cupons de aço carbono AISI 1020 instalados em sistema de tanques inoculados com a cultura mista de BRS AP. A estimativa de células planctônicas corresponde a três períodos: no momento da inoculação da cultura nos tanques (A), em 10 dias de ensaio (B) e ao final do ensaio, 21 dias (C), sendo na ausência (controle) e presença de 200 ppm de THPS (tratamento). A estimativa de células no biofilme é apresentada na figura 9D.

### 5.3.3 Concentração de ATP

Nessa análise, todo o sistema é avaliado, sendo quantificado o ATP de aeróbias e anaeróbias (figura 10). No tempo 0, ao comparar o controle com a aplicação do THPS, percebe-se uma diferença significativa já que o biocida tem efeito imediato, logo o ATP está bem abaixo do controle, o que demonstra semelhança com os dados de estimativa de BRS planctônicas (figura 9A).

No 10º dia de experimento, o controle obteve seu crescimento máximo e correspondeu à máxima concentração de ATP, que também foi ao máximo dentre os três períodos avaliados. O tanque com THPS permaneceu bem abaixo do controle, com uma diferença significativa, entretanto, com uma concentração um pouco acima do inicial.

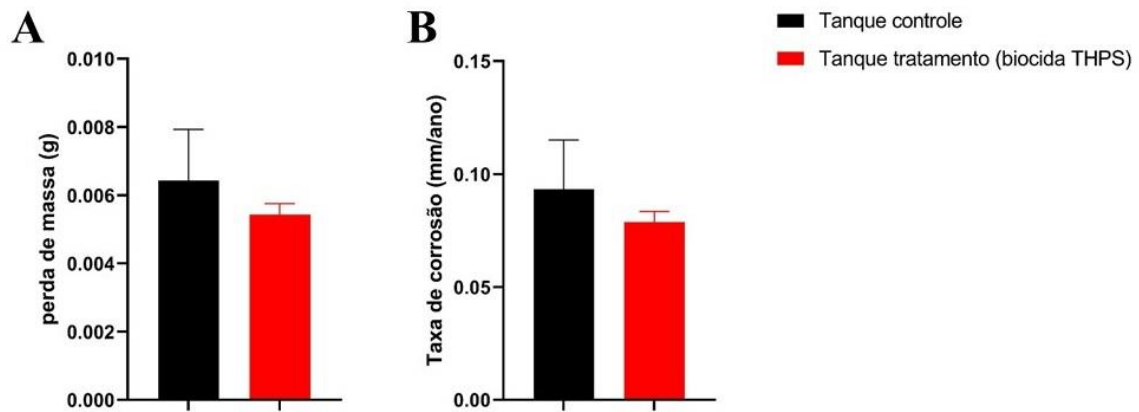


**Figura 10.** Concentração de ATP (pg ATP/mL) das células planctônicas para os tanques controle e tratamento com THPS – 200 ppm em três períodos diferentes: no momento da inoculação da cultura mista AP (tempo 0), no máximo de produção de H<sub>2</sub>S (10 dias) e ao final do experimento (21 dias).

Ao final dos 21 dias, a concentração de ATP da população do tanque controle apresentou queda, e a população sob o tratamento de THPS aumentou em relação ao quantificado em 10 dias. Esse resultado pode estar relacionado ao declínio da curva de DO<sub>600nm</sub> observada para o controle, e também ao surgimento de células resistentes no tanque com THPS ao longo dos dias de experimento.

#### 5.3.4 Perda de massa e taxa de corrosão

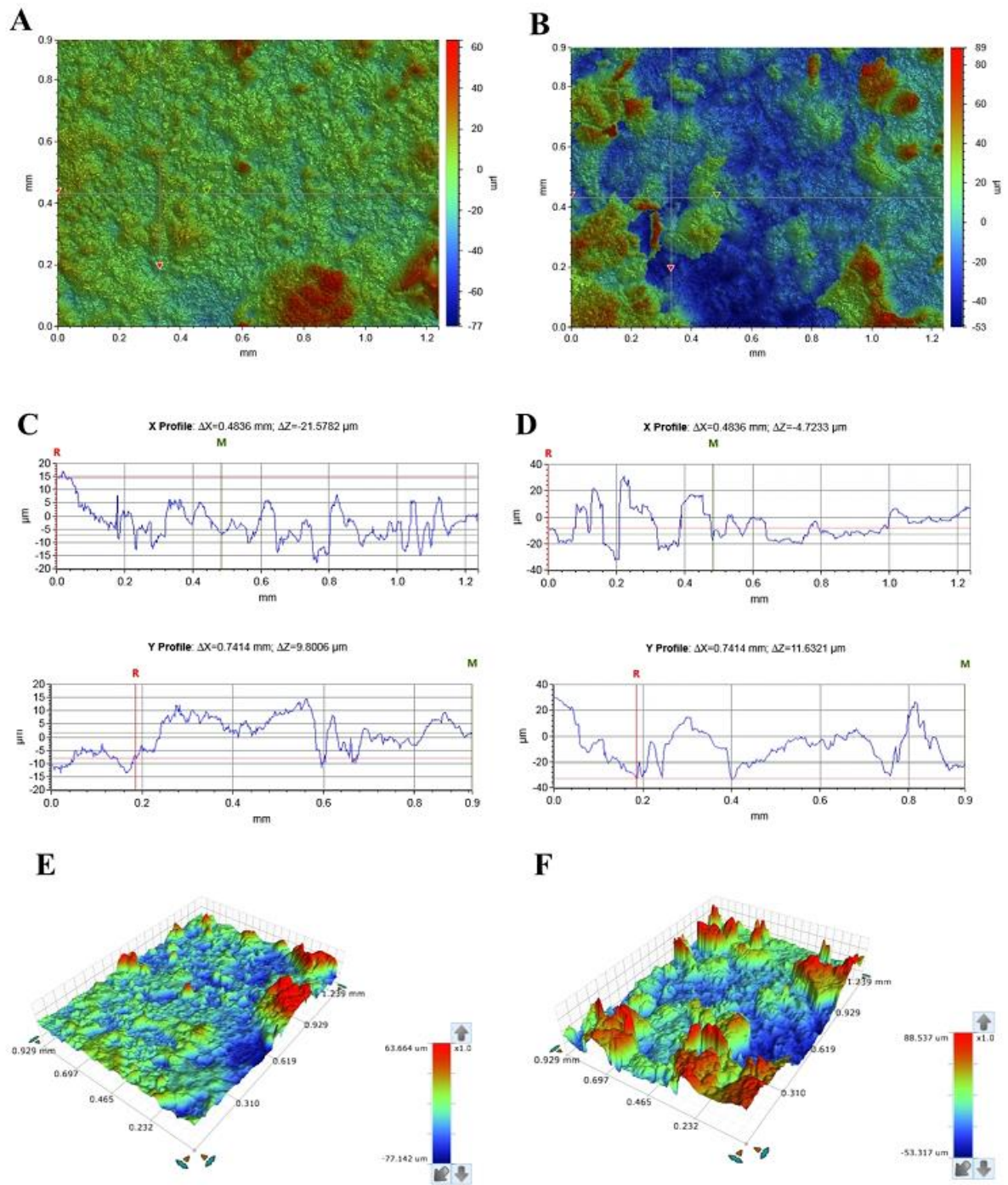
A atividade bacteriana foi regulada pelo THPS no decorrer dos dias, de modo que a perda de massa apresentada pelos cupons do tanque tratamento foi menor que a do tanque controle (figura 11A), assim como também a taxa de corrosão (figura 11B). A diferença entre as taxas de corrosão correspondeu a 15,5%, sendo 0,0933 mm/ano para os cupons do tanque controle e 0,0754 mm/ano para os cupons do tanque com THPS.



**Figura 11.** Representação gráfica da média da perda de massa (A) e taxa de corrosão (B) dos cupons AISI1020 ao longo de 21 dias em tanques inoculados com a cultura mista de BRS AP, na ausência (controle) e presença (tratamento) do biocida comercial THPS.

### 5.3.5 Rugosidade da superfície por perfilometria óptica

A perfilometria dos cupons dos tanques controle e tratamento após a formação de biofilme está representada na figura 12. Um panorama dos eixos x e y do cupom é projetado em um conjunto de cores (figuras 12A e B) e plotados graficamente para gerar o perfil da superfície. O biofilme formado no tanque controle apresentou uma oscilação maior nos eixos avaliados (figura 12C) em comparação ao tanque com THPS (figura 12D), mas esse mostrou oscilações de maior escala, como é mostrado na lateral dos gráficos. Além dessas medidas, as imagens 3D mostraram que a superfície do biofilme dos cupons do tanque controle apresentou-se mais homogênea que àquela dos cupons no tratamento (figuras 12E e F), de modo que é possível inferir que o THPS influenciou na estrutura do cupom.



**Figura 12.** Perfilometria óptica da superfície dos cupons expostos por 21 dias à cultura mista de BRS AP em sistema de tanques na ausência e presença do biocida comercial THPS – 200 ppm. Um panorama da superfície é mostrado para os tanques controle (A) e tratamento (B), assim como a formação gráfica dessas imagens em eixos x e y (C e D). Imagens tridimensionais da superfície dos cupons no tanque controle (E) e tanque tratamento (F).

Dentre os valores obtidos pela perfilometria, a rugosidade média (Ra) e a altura dos picos (Rp) foram maiores no tanque tratamento que no tanque controle (tabela 1). Essa informação (assim também como os valores de Rq, Rt e Rv) é possível ser analisada na imagem tridimensional (figura 12F), onde observa-se a prevalência de cores acentuadas formando os picos, e a superfície com mais deformações.

**Tabela 1.** Parâmetros da rugosidade de superfície ( $\mu\text{m}$ ) dos cupons em ambos os tanques após 21 dias de exposição.

Rugosidade da superfície ( $\mu\text{m}$ )	Tanque – Controle	Tanque – THPS
Rugosidade média (Ra)	7,93	19,08
Altura máxima do pico (Rp)	63,66	88,54
Raiz quadrada média (Rq)	11,39	24,24
Total (pico + vale) (Rt)	140,81	141,85
Profundida média do vale (Rv)	-77,14	-53,32

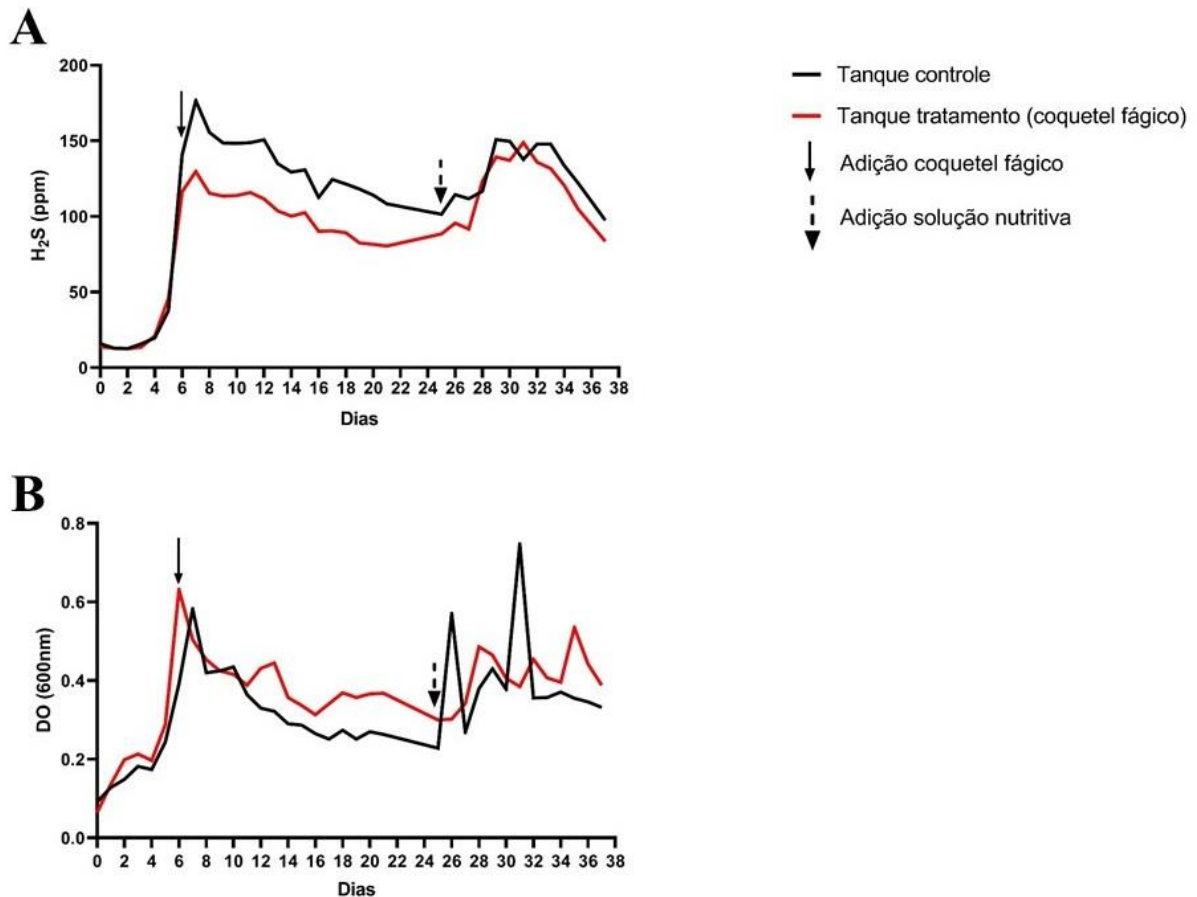
### 5.3.6 Avaliação do coquetel fágico no controle da produção de $\text{H}_2\text{S}$

A ação do coquetel sobre o crescimento da cultura AP foi avaliada adicionando-o após o crescimento inicial da cultura, visto que esse padrão ainda não havia sido estudado.

Seguindo o padrão dos experimentos anteriores, a cultura mista de BRS AP atingiu em poucos dias seu máximo de produção de  $\text{H}_2\text{S}$ , sendo o 6° dia com uma quantificação de 140,22 ppm no tanque controle e 130,31 ppm no tanque tratamento (figura 13A). Nesse momento, o coquetel de fagos foi adicionado ao tanque tratamento, em concentração final de  $10^7$  UFP/mL.

O declínio na quantificação de  $\text{H}_2\text{S}$  pela população do tanque tratamento iniciou logo após dosagem do coquetel nesse tanque, e pode-se observar semelhança de comportamento com a curva de  $\text{H}_2\text{S}$  do tanque controle, mas 26,1% abaixo do controle ao 8° dia, e 26,9% abaixo no 17° dia. As curvas de  $\text{H}_2\text{S}$  da população de ambos os tanques permaneceram em queda ao longo dos dias, e para avaliar se o coquetel

conseguiria manter o mesmo padrão observado inicialmente na curva de  $\text{H}_2\text{S}$ , no 25º dia, após retirada de 800 mL do volume total dos tanques, foram adicionados 800 mL de solução nutritiva. A resposta à disponibilidade de nutrientes mostrou-se nos dias seguintes, de modo que ambas as culturas presentes nos tanques retomaram o crescimento. Com 38 dias o experimento foi encerrado, visto que a resposta à dúvida quanto à durabilidade do efeito do coquetel já estava evidenciada.



**Figura 13.** Curva de produção de  $\text{H}_2\text{S}$  (A) e  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  (B) antes e após dosagem do coquetel de bacteriófagos ( $10^7$  UFP/mL) em sistema de tanques inoculados com a cultura mista de BRS AP. O coquetel fágico foi adicionado no 6º dia, como é indicado pela seta contínua. O experimento foi conduzido por 38 dias, e a solução nutritiva foi reaplicada no 25º dia (seta pontilhada).

A curva de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  inicialmente apresentou um comportamento semelhante entre os dois tanques, o que era esperado já que estavam sob as mesmas condições até o momento (figura 13B). Após o 6º dia, quando foi adicionado o coquetel, o tanque tratamento apresentou declínio no crescimento, que foi acompanhado do tanque controle. O declínio da população controle pode estar relacionado à morte de células

aeróbias e anaeróbias não redutoras de sulfato, visto que na figura 13A, mesmo com a redução do H<sub>2</sub>S, o tanque controle ainda apresentou acima de 100 ppm.

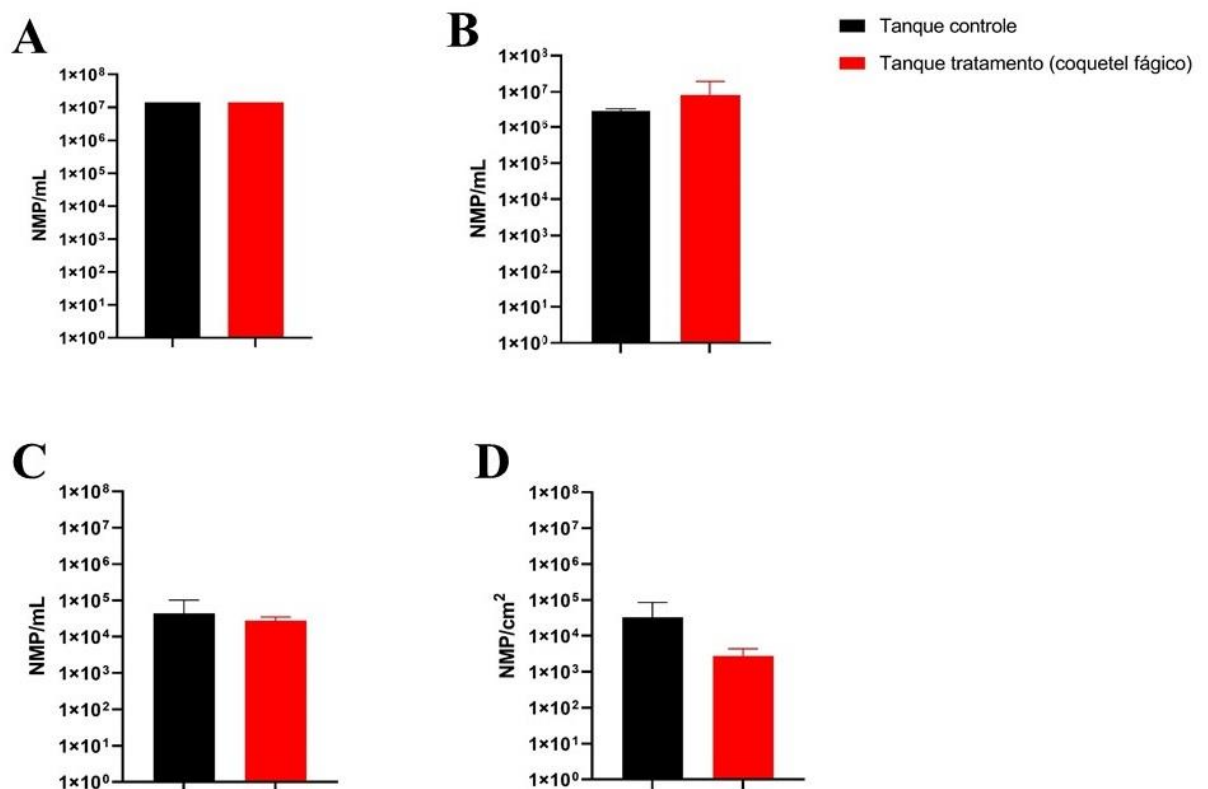
O tanque tratamento, após adição do coquetel, mostrou resultado em diminuir o crescimento da comunidade, que já estava em seu máximo no 6° dia. A adição de solução nutritiva foi essencial para retomar a curva de absorbância do tanque controle, que no dia seguinte foi de 0,228 para 0,568 e 7 dias depois, um novo pico, em 0,747. Em contrapartida, mesmo com novos nutrientes, as células do tanque tratamento não demonstraram um crescimento tão perceptível quanto o controle, atingindo ao máximo de 0,537 no 35° dia, de modo que o coquetel mais uma vez manteve sua atividade dentro dos 38 dias.

### **5.3.7 Estimativa de células planctônicas e aderidas por NMP**

As células planctônicas viáveis foram quantificadas nos três períodos determinados anteriormente (figuras 14A, B e C) e neste experimento, as células do biofilme formado sobre o cupom foram quantificadas ao término de 38 dias (figura 14D).

Os inóculos adicionados aos tanques apresentaram ótimo crescimento, com todos os frascos do NMP positivos ao final de 28 dias de incubação, atingindo os valores de  $1,4 \times 10^7$  NMP/mL (figura 14A), o que permitiu iniciarem o desenvolvimento de forma equivalente. Ao 6° dia, antes da adição do coquetel, as alíquotas foram retiradas e aplicadas no NMP, que após 28 dias, apresentou uma redução na quantificação do tanque controle de, aproximadamente, um log, enquanto o tanque tratamento não sofreu tanta variação, permanecendo em  $10^7$  NMP/mL. Ao final dos 21 dias, ambos os tanques reduziram crescimento (figura 14C), com destaque para o tanque tratamento que reduziu quase em 3 logs de diferença quando comparado ao tempo 0 e 6 dias. Nesse período, a curva de H<sub>2</sub>S também já apresentava decaimento (figura 13A), o que justifica os resultados obtidos para o NMP.

Os cupons sonicados de ambos os tanques apresentaram um valor menor de células quantificadas (figura 14D) quando comparado às quantificações de planctônicas, e o tanque controle ainda apresentou cerca de 1 log acima do tanque com tratamento com o coquetel.

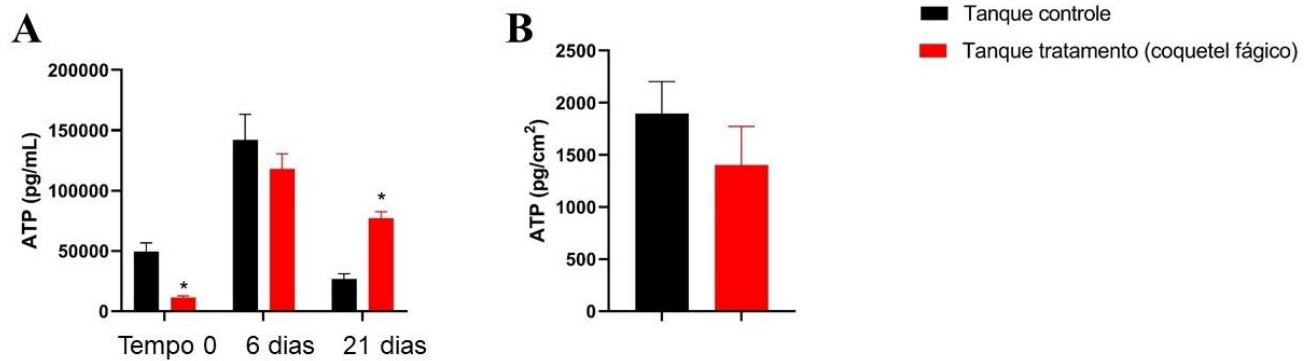


**Figura 14.** Estimativa de células viáveis de BRS por NMP em sistema de tanques inoculados com a cultura mista de BRS AP, na ausência e presença do coquetel fágico ( $10^7$  UFP/mL) dosado no sexto dia do ensaio. Avaliação realizada em três períodos diferentes: (A) tempo 0, no momento da inoculação de BRS, (B) no sexto dia de ensaio e (C) no final do ensaio, 21 dias. Células viáveis de BRS no biofilme foram estimadas no final em 38 dias de ensaio (D).

### 5.3.8 Concentração de ATP

No tempo inicial do experimento (figura 15A), as células do fluido apresentaram concentração significativamente diferente entre os dois tanques, com o tanque controle acima do tanque tratamento, que pode ser devido à uma possível entrada de oxigênio no frasco contendo a cultura e que foi inoculada no tanque tratamento, de forma que células mortas não são contabilizadas na quantificação de ATP. O próximo tempo analisado corresponde ao crescimento inicial da cultura, com máxima produção de H<sub>2</sub>S, e como apresentado nas figuras anteriores, os tanques estavam com padrões de crescimento próximos, e isso também foi representado no ATP, semelhante e sem diferença significativa. O último período analisado correspondeu a 21 dias, de modo a se assemelhar às análises anteriores do fluido. O tanque tratamento revelou estar significativamente maior que o tanque controle, e essa diferença também é observada na figura 13B. O ATP é calculado com todas as células metabolicamente ativas do

sistema, logo contabiliza aeróbias e anaeróbias presentes, que podem ter desenvolvido certa resistência ao coquetel nesse período, mas como visualizado após a adição da solução nutritiva, o tanque controle recuperou o crescimento enquanto o tratamento manteve-se abaixo.



**Figura 15.** Concentração de ATP (pg ATP/mL) das células planctônicas (A) e células aderidas (pg ATP/cm<sup>2</sup>) nos cupons AIS1020 (B) para os tanques controle e tratamento com o coquetel de bacteriófagos (10<sup>7</sup> UFP/mL). Em A, foi avaliado três períodos diferentes: no momento da inoculação da cultura mista de BRS AP (tempo 0), máxima produção de H<sub>2</sub>S (6 dias) e ao final do experimento (21 dias). Em B, ao final de 38 dias de experimento.

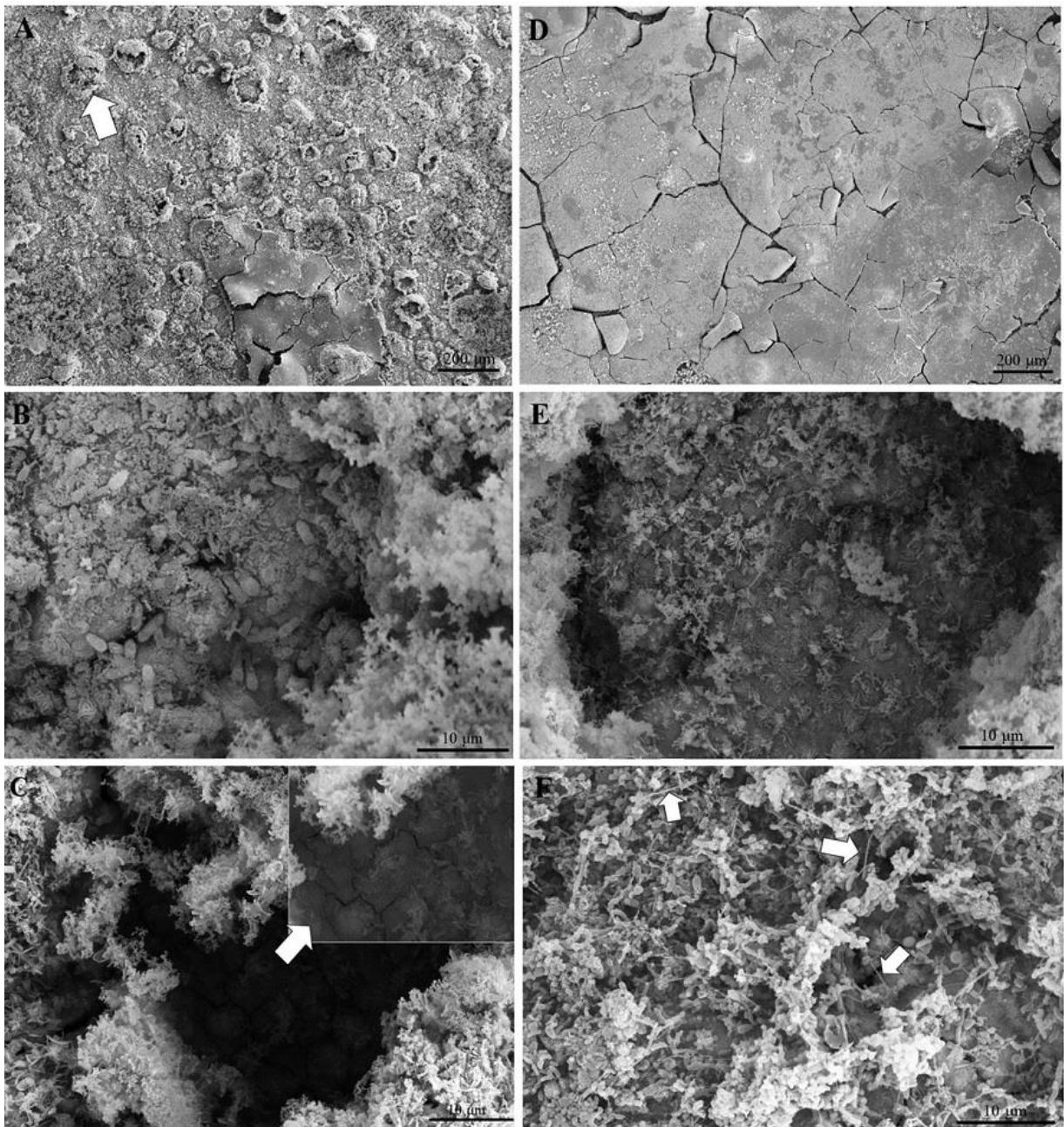
Para o ATP do biofilme, os cupons foram retirados após 38 dias. A população do biofilme no tanque controle atingiu cerca de 2000 pg ATP/cm<sup>2</sup>, enquanto o tanque com o coquetel ficou em, aproximadamente, 1500 pg ATP/cm<sup>2</sup>, logo 25% abaixo em relação ao controle (figura 15B). Esse resultado é considerado promissor para um sistema que está em padronização, e o coquetel conseguiu reduzir a atividade celular no biofilme em maior escala e fora de um ambiente controlado.

### 5.3.9 Visualização do biofilme por MEV

Para avaliar o biofilme formado nos cupons de ambos os tanques, a MEV foi realizada após os 38 dias de experimento e permitiu distinguir algumas diferenças na superfície dos cupons e estruturas presentes abaixo do biofilme (figura 16).

O revestimento do cupom foi afetado em ambos os tanques, mas de modo mais agressivo no tanque controle (figura 16A), no qual é possível observar a presença de biofilmes maduros, como indicado pela seta branca. O tanque tratamento (figura 16D) apresentou regiões de aparente menor adesão celular, e conseqüente menor deposição de EPS. As “rachaduras” visualizadas são referentes ao processo de desidratação alcóolica realizada na preparação do material.

Diante da visualização de biofilmes maduros no tanque controle, foi explorado o conteúdo interno. Foram visualizadas células em forma bacilar, característico de culturas de BRS (figura 16B), além de provável depósito de EPS (figura 16C). A cultura mista AP exposta ao coquetel apresentou características similares, mas em determinados biofilmes foi visualizado uma menor concentração de células (figura 16E) e uma predominância de estruturas filamentosas (figuras 16F), que pode ser uma resposta das células à atividade viral.

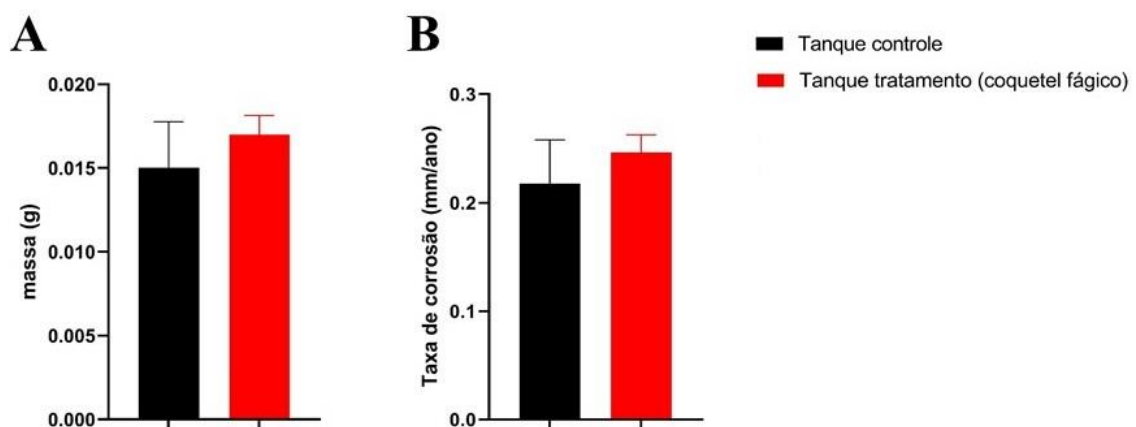


**Figura 16.** Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado nos cupons de aço carbono AISI 1020 inseridos no sistema de tanques controle (A, B e C) e tratamento (D, E e

F), inoculados com a cultura mista de BRS AP e o coquetel fágico ( $10^7$  UFP/mL), respectivamente. (A) As superfícies dos cupons apresentaram biofilmes maduros, como indicado pela seta branca; (B) Predominância de células de formato bacilo nos biofilmes; (C) Possível deposição de exopolissacarídeo, indicado pela seta branca; (D) Superfícies dos cupons com aparente menor adesão celular; (E) Menor concentração de células nos biofilmes; (F) Presença de filamentos, indicados com as setas brancas.

### 5.3.10 Perda de massa e taxa de corrosão

A perda de massa avaliada ao final do experimento foi equivalente para os dois tanques, com uma diferença não significativa para o tanque do tratamento (figura 17A). Da mesma forma, a taxa de corrosão apresentou um resultado similar para os dois experimentos, sendo 0,2176 mm/ano para o tanque controle e 0,2467 mm/ano para o tanque tratamento, o que representou uma pequena diferença de 11,7%. Ambas as taxas são maiores que àquelas encontradas nos ensaios anteriores, provavelmente devido à duração de 38 dias em constante crescimento.



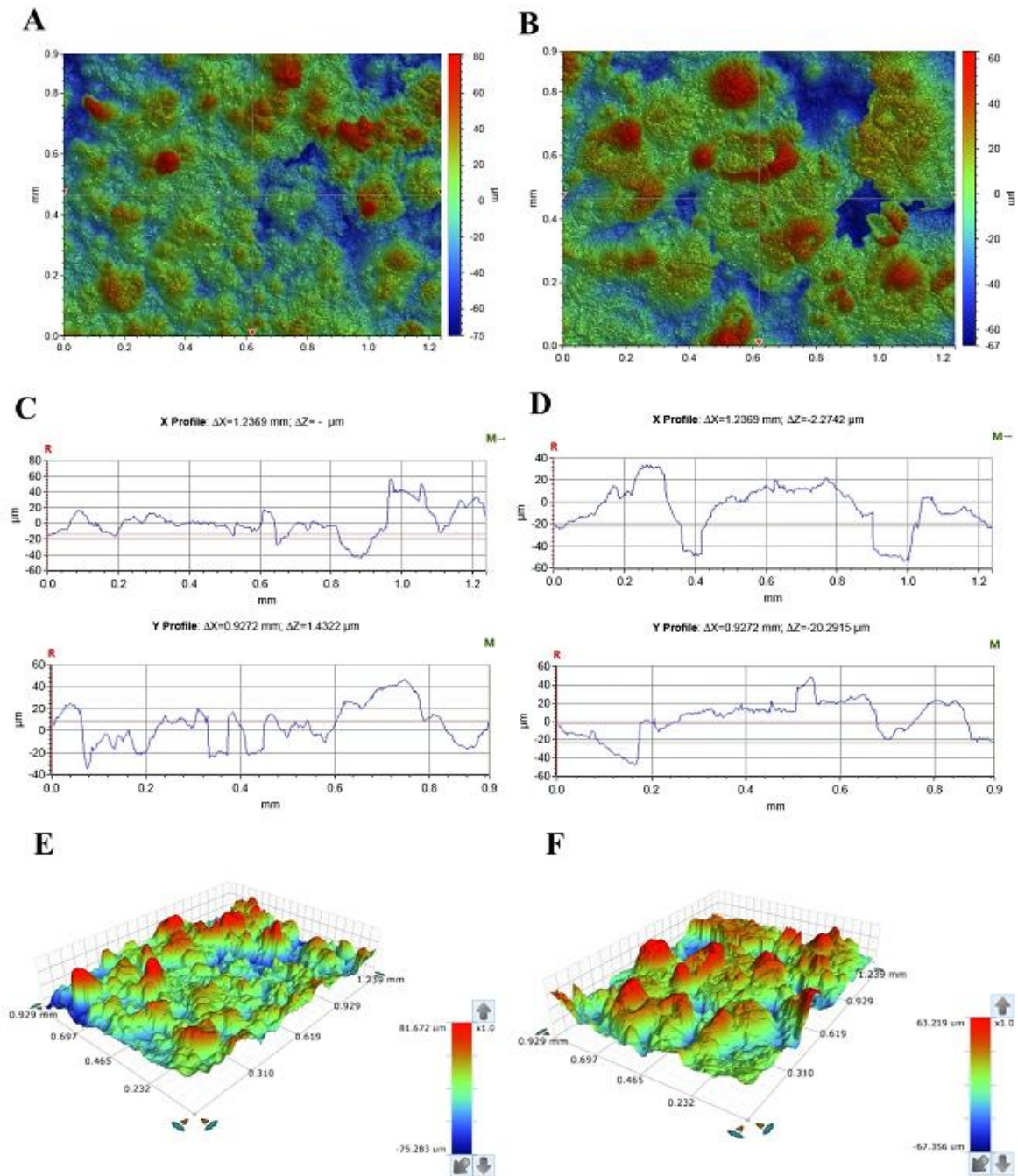
**Figura 17.** Representação gráfica da média da perda de massa (A) e taxa de corrosão (B) dos cupons AISI1020 ao longo de 38 dias em tanques inoculados com a cultura mista de BRS AP na ausência (controle) e presença (tratamento) do coquetel fágico em  $10^7$  UFP/mL.

### 5.3.11 Rugosidade da superfície por perfilometria óptica

Ao analisar as imagens obtidas da perfilometria, inicialmente nota-se pouca diferença entre o tanque controle e tratamento com coquetel. As superfícies dos biofilmes formados em ambos cupons apresentaram pontos específicos com cores mais quentes, mas a escala do controle (figura 18A) com maiores dimensões que o coquetel (figura 18B). A partir do perfil gráfico é possível notar as diferenças: o tanque controle apresenta sulcos mais constantes no eixo y (figura 18C), enquanto o tanque

tratamento apresentou dois sulcos mais evidentes no eixo x, e oscilações menos bruscas no eixo y (figura 18D). As imagens 3D ainda revelam o panorama geral da superfície do cupom, na qual o tanque 1 (figura 18E) apresentou uma diversidade quanto a presença de picos e vales, enquanto o tanque 2 (figura 18F) teve a prevalência de picos.

As medidas de referência de rugosidade (tabela 2) esclareceram menos agressividade aos cupons do tanque tratamento, o que condiz com a MEV (figura 16). A rugosidade média ( $R_a$ ) dos cupons não apresentou diferença, entretanto os valores dos picos ( $R_p$ ) e vales ( $R_v$ ) revelam como os cupons do tanque controle foram mais afetados, e essa corrosão mais profunda, além de retirar os materiais que compõem o aço, é característico da morfologia de *pitting*. O eixo y (figura 18C) destaca essa profundidade.



**Figura 18.** Perfilometria óptica da superfície dos cupons expostos por 38 dias à cultura mista de BRS AP em sistema de tanques na ausência e presença do coquetel fágico –  $10^7$  UFP/mL. Um panorama da superfície é mostrado para os tanques controle (A) e tratamento (B), assim como a formação gráfica dessas imagens em eixos x e y (C e D). Imagens tridimensionais da superfície dos cupons no tanque controle (E) e tanque tratamento (F).

**Tabela 2.** Parâmetros da rugosidade de superfície ( $\mu\text{m}$ ) dos cupons em ambos os tanques após 38 dias exposição.

<b>Rugosidade de superfície (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Tanque – Controle</b>	<b>Tanque – Coquetel</b>
Rugosidade média (Ra)	17,51	17,12
Altura máxima do pico (Rp)	81,67	63,22
Raiz quadrada média (Rq)	22,38	21,65
Total (pico + vale) (Rt)	156,95	130,57
Profundidade média do vale (Rv)	-75,28	-67,36

## 6. DISCUSSÃO

O experimento de padronização conduzido com as culturas mistas de BRS Al e AP em sistema de tanques (figura 7) foi crucial para compreender o comportamento dessas culturas em um novo ambiente, até então não padronizado. Dentre os objetivos propostos, o cultivo de BRS em larga escala se destacou como desafiador, uma vez que o método tradicional consiste em meio de cultura padronizado armazenado em frascos de penicilina lacrados, com volume de 100 mL, e incubação em estufa bacteriológica a 30 °C. Os tanques piloto permaneceram em temperatura ambiente (23 – 25 °C), adicionado de água do mar sintética e solução nutriente para auxiliar o desenvolvimento microbiano, com inóculo a 5% da capacidade total dos tanques.

Ao 3º dia de experimento foi observado um aumento na leitura de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  para ambas as culturas, e em contrapartida, os níveis de  $\text{H}_2\text{S}$  estavam basais. Para esse crescimento inicial, algumas hipóteses são sugeridas como a presença de anaeróbios não redutores de sulfato, e também microrganismos aeróbios e BRS mais tolerantes ao  $\text{O}_2$ , uma vez que a cultura Al é derivada de um ambiente não estritamente anaeróbio. Além disso, o cultivo em tanques não oferece um espaço estéril, assim como a água do mar sintética, pois a filtração é realizada no ambiente, de forma que a presença de microrganismos aeróbios é uma possibilidade.

Após o período de adaptação, o crescimento da cultura AI é caracterizado pela queda da  $DO_{600nm}$  ao mesmo tempo que os níveis de  $H_2S$  aumentam, tendo um aumento ao 5º dia, 91,024 ppm, e o máximo ao 8º dia, com 94,672 ppm. Esse resultado difere do primeiro experimento (figura 5), no qual o máximo alcançado pela cultura foi de 263,584 ppm, mas o procedimento de ter adicionado a solução nutritiva 10X pode ter relação com essa diferença. Ao realizar a 2ª adição da solução no decorrer do primeiro experimento, o ambiente já estava hermeticamente fechado há mais de 20 dias e a resposta da cultura demorou cerca de 10 dias, o que indica que já possuía poucos resquícios de  $O_2$  disponível e que diante da nova oferta de nutrientes, o crescimento de BRS foi em etapas, sem competição e atingindo um pico. Em contrapartida, no experimento em discussão, a disponibilidade imediata e concentrada é uma vantagem ao crescimento de microrganismos do ambiente (além daqueles que compõe a própria cultura mista), que consumiram parte dos nutrientes disponíveis e permitiu à AI um pico menor que aquele observado anteriormente. Analisando o crescimento da AP, durante os 11 primeiros dias, os níveis de  $H_2S$  quantificados se mantiveram basais, evidenciando um período de adaptação maior do que o observado para AI. Ao 12º dia, a curva apresentou uma leve ascensão e ao 14º dia, atingiu o pico de 197,89 ppm, ao mesmo tempo que a  $DO_{600nm}$  seguiu este crescimento, alcançando o maior valor. Os próximos dias foram caracterizados por um declínio, provavelmente pela limitação nutricional.

Dentre os principais aspectos que podem influenciar no crescimento bacteriano, como temperatura, pH e pressão osmótica, a concentração dois tipos de fonte de energia foram avaliadas por Hallbeck (2014), ao comparar o efeito da concentração de lactato e  $H_2$  no crescimento da espécie *Desulfovibrio aespoeensis*. As maiores concentrações foram responsáveis por maior produção de sulfeto de hidrogênio, sendo que para o lactato a quantificação de  $H_2S$  iniciou a partir de 6 dias com níveis basais e com 8 dias já apresentava um crescimento contínuo, com o pico de 170 ppm em 14 dias, semelhante à curva da AP, e para o  $H_2$ , os níveis basais de sulfeto de hidrogênio foram quantificados em 8 dias, acentuado a partir do 10 dia e com o máximo de 209 ppm em 15 dias.

Os resultados descritos por Hallbeck demonstram como a produção de  $H_2S$  está relacionada à concentração e tipo de fontes de energias utilizadas, e a concentração é um parâmetro comparativo ao experimento de padronização, pois a adição da solução nutritiva concentrada, que possui lactato, foi fundamental para

fornecer um crescimento mais rápido para as culturas, mas sem afetar o desenvolvimento dessas, pois ainda foram capazes de alcançar a produção de H<sub>2</sub>S. Esse experimento foi crucial para entender como essas culturas iriam se comportar nos próximos experimentos, assim como foi determinante para padronizar o tempo de avaliação, estabelecido em 21 dias.

A partir do experimento de padronização, a produção de H<sub>2</sub>S e a curva de DO<sub>600nm</sub> da cultura AP já eram previstas, entretanto vale ressaltar que no próximo ensaio discutido foi possível perceber um crescimento mais rápido do que o anterior, o que destaca que diversos fatores durante a montagem dos tanques podem interferir no crescimento, mesmo diante da tentativa de controlar ao máximo todas as variáveis, como temperatura e O<sub>2</sub>.

O THPS é um biocida da classe dos quaternários de amônio e atua diretamente na quebra de ligações enxofre-enxofre produzindo aminoácidos dissulfeto, que acarretam danos à parede celular e membrana plasmática (ZHAO et al, 2008). O rápido efeito do THPS no tanque tratamento em concentração de 200 ppm observado nas curvas de H<sub>2</sub>S (figura 8A) e DO<sub>600nm</sub> (figura 8B) demonstram como danos à estrutura celular levam a uma resposta imediata, de modo que o crescimento planctônico de parte da cultura AP foi cessado durante o curso do experimento. No 14º dia, a DO<sub>600nm</sub> registrou 0,317 de absorbância, um valor alto diante do efeito inicial do biocida, mas Gana et al (2011) relatam que após 9 dias de inibição, o consórcio de BRS em estudo teve o crescimento reiniciado, quantificado por NMP. Essa resistência apresentada, principalmente em uma cultura tão diversa, pode advir tanto de mecanismos intrínsecos ou adquiridos (RUSSELL, 1995).

Apesar da concentração de H<sub>2</sub>S permanecer inalterada, os resultados obtidos pelo NMP demonstram o crescimento de células viáveis mesmo após a adição do THPS em todos os três períodos avaliados para as células planctônicas (figuras 9A, B e C). Apesar da diferença significativa nos três tempos, os resultados encontrados condizem com aqueles obtidos por Okoro (2014). Ao avaliar o efeito do THPS em diferentes concentrações, as comunidades de BRS e de produtoras de ácido (APB) apresentaram resultado positivo (>10<sup>2</sup> NMP/mL) mesmo sob 200 ppm, principalmente as comunidades advindas de água de injeção; o bloqueio total das culturas ocorreu somente quando aplicado 600 ppm. É sabido que uma dosagem alta de biocida pode acarretar uma resistência das células ao produto, e como algumas células já apresentam esse efeito, é possível exacerbá-lo. Da mesma forma, o sulfato liberado

durante a dissociação do THPS ( $[P(CH_2OH)_4]_2SO_4 \rightarrow 2 THP^+ + SO_4^{2-}$ ) pode ser utilizado por BRS, aumentando o crescimento e biocorrosão (SHARMA et al., 2018). A concentração de ATP teve uma diferença significativa para os dois primeiros tempos avaliados (figura 10), sendo que o tanque controle apresentou um aumento considerável em 10 dias, contabilizando a atividade anaeróbia e aeróbia. Semelhante ao NMP no último dia analisado, ambos os tanques reduziram a atividade, e aqui o tanque controle equiparou-se ao tanque tratamento, e esse apresentou a maior concentração dentre os 3 tempos, corroborando com a premissa que após determinado tempo, as células podem retomar o crescimento (GANA et al., 2011).

A perda de massa e a taxa de corrosão obtidas para os tanques controle e tratamento com THPS foram semelhantes, apresentando uma diferença apenas de 15,5% entre as taxas calculadas (figura 11B). Estudos que utilizaram concentrações menores de THPS (0,1-0,4%) reportam sua ineficiência em penetrar no biofilme e reduzir o crescimento das células (Okoro, 2015), assim como determinada concentração (75 ppm) pode acarretar o estresse celular e estimular a formação do biofilme, como um modo de proteger a população (XU et al., 2022). Em comparação aos resultados encontrados neste trabalho, apesar da visível inibição, é preocupante devido à pequena diferença entre controle e tratamento, indicando que futuramente a concentração de 200 ppm também pode não ser eficiente.

O resultado da corrosão desencadeada no tanque tratamento refletiu na rugosidade média do cupom, com diferença de 58,4% (tabela 1). Awad *et al* (2018) encontraram que Ra menor reduz a adesão inicial das células, de modo que como o tanque tratamento apresentou Ra maior que o tanque controle, ele favoreceu o estabelecimento do biofilme e tornou mais difícil a remoção (ORTEGA et al., 2010). Além disso, depósitos de corrosão estão mais concentrados na superfície desse cupom (figura 12F) do que no cupom controle (figura 12E), um indicativo de maior adesão celular (XU et al., 2022). Apesar das quantificações anteriores, esses resultados de superfície mostraram um limiar de ação do THPS, já próximo ao controle.

O foco sob o estudo de bactérias redutoras de sulfato, apesar de não ser um tema amplamente popular, é crescente e cada vez mais trabalhos científicos são publicados, como a capacidade desses microrganismos na remoção de metais tóxicos de efluentes (DE MATOS et al., 2018), em drenagem ácida de minas (GUO et al., 2022), assim como o controle do biofilme e produção de H<sub>2</sub>S com o uso de

bacteriófagos, que vêm apresentado resultados positivos (JIA et al., 2018c; RASHEED et al., 2019; SALIM et al., 2021).

O experimento realizado com a cultura AI demonstrou a necessidade de reaplicação da solução nutritiva, uma vez que na concentração produzida foi insuficiente para iniciar o crescimento anaeróbio (figura 5). Após a aplicação no 24º dia, ambos os tanques iniciaram o crescimento, com destaque para a 50º dia que apresentou o maior valor de H<sub>2</sub>S. Os tanques montados para AP já continham a solução nutritiva 10X e também esclarecido, em média, quantos dias seriam necessários para iniciar o crescimento. Ao 6º dia, a produção de H<sub>2</sub>S eram semelhantes entre tanque controle e tanque tratamento e o coquetel foi adicionado ao tanque tratamento. Por se tratar de culturas mistas e que ainda não há o conhecimento dos microrganismos nelas presentes, os resultados apresentados e aqui discutidos podem estar relacionados a uma gama de fatores que afetam a comunidade, como alterações metabólicas, genômicas e de respostas ao estresse (FERNÁNDEZ; RODRÍGUEZ; GARCÍA, 2018).

O coquetel foi capaz de reduzir em 77,8% (figura 5) e 26,1% (figura 13A) o H<sub>2</sub>S para as culturas AI e AP, respectivamente; na mesma linha, foi responsável por apresentar redução do biofilme formado por AP sobre superfície do cupom, evidenciado por menor depósito de células e melhor estrutura do material de aço carbono. Como os tanques formam um microbioma próprio, uma hipótese sugerida para determinados efeitos é a influência da comunidade na co-evolução de bactérias-fagos em relação à resistência e infectividade (BLAZANIN; TURNER, 2021). Em um estudo conduzido por De Sordi *et al* (2017), no qual baseou-se em uma solução contendo o fago P10, *E. coli* hospedeira e outra *E. coli* não hospedeira, foi avaliada a consequência da aplicação dessa solução no intestino de camundongos com e sem a microbiota natural. Eles observaram que no intestino de animais que tinham um microbioma intacto, o fago P10 acumulou mutações pontuais, principalmente nos genes da fibra da cauda, e os fagos mutantes foram infectivos àquela *E. coli* anteriormente resistente, assim como para as espécies *Citrobacter rodentium* ICC180 e *Erwinia carotovora* (CFBP2141); o mesmo não ocorreu no outro grupo. Dessa forma, foi conclusivo que a comunidade teve efeito no espectro de hospedeiro, e que a diversidade viral foi proporcional à diversidade de hospedeiros disponíveis. Relacionando esse resultado aos obtidos para redução de H<sub>2</sub>S (figura 5 e 13A), o coquetel ou algum dos fagos pode ter tido sua infectividade expandida a outros

hospedeiros por intermédio da comunidade complexa dos tanques, o que possibilitou lisar as células reduzir o H<sub>2</sub>S, e conseqüentemente o biofilme formado.

Uma outra hipótese acerca desses resultados está relacionada ao aumento ou diminuição da expressão de genes envolvidos no biofilme e H<sub>2</sub>S frente à exposição ao coquetel. Em *Desulfovibrio vulgaris*, uma espécie de BRS bem caracterizada, o regulador dependente do sigma 54, DVU2956, é um dos responsáveis por inibir a formação de biofilme e manter as células em estado planctônico; ele regula a região do operon DVU2957-DVU2964, no qual 6 dos 8 genes são reprimidos em células contidas na matriz, que também sofrem alteração na transferência de elétrons necessária para reduzir o sulfato, e conseqüentemente diminui o H<sub>2</sub>S produzido (ZHU et al., 2019). Dentro desse contexto, é sugerido que o coquetel pode ter acarretado um estresse celular que estimulou a expressão de *dvu2956* e assim, as células mantiveram-se em estado planctônico e o mecanismo para formação do sulfeto e biofilme foi interrompido. Em comparação, o tanque controle não teve a superexpressão de *dvu2956* e as células foram capazes de desenvolver o biofilme e produzir H<sub>2</sub>S. Essas informações condizem também com os resultados obtidos para a leitura de DO<sub>600nm</sub>, ATP (planctônica e biofilme) e NMP para a cultura AP, nos quais é possível observar que ao reduzir o H<sub>2</sub>S, a produção de ATP e quantificação de células planctônicas ainda se mantinham altas no tanque tratamento, mas reduzida no biofilme.

Para confirmar tais questionamentos, a expressão do gene *dvu2956* futuramente pode ser confirmada por técnica de PCR, ao comparar um controle positivo, como *D. vulgaris*, com as amostras das populações dos tanques. Análises mais profundas, como metagenômica e transcriptômica, também são essenciais a longo prazo para compreender o dinamismo da comunidade e a expressão de genes, ambas frente à atividade viral, como realizado por Brandão et al (2021), que puderam confirmar por RNA-seq que o fago LUZ19 era responsável por manipular mudanças transcricionais de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

A visualização do biofilme formado pela cultura AP a partir da MEV permitiu esclarecer se a matriz pré-formada seria removida pelo coquetel, e se haveriam diferenças quanto à estrutura presente na superfície dos cupons. A varredura inicial dos cupons evidenciou uma prevalência de biofilmes maduros no tanque controle (figura 16A), enquanto os cupons do tanque tratamento, mesmo que aparentemente frágeis, apresentaram regiões com menor adesão celular ou possivelmente resquícios

da remoção do biofilme pelo coquetel fágico (figura 16D). Os produtos de corrosão advindos da atividade das BRS são depositados na superfície dos cupons (CHEN; WEI; XU, 2021) e podem ser observados em maior degradação para o tanque controle (figura 16A), onde o acúmulo de  $H_2S$  dentro da matriz estimula o processo corrosivo; portanto, a redução de  $H_2S$  em consequência da aplicação do coquetel preservou determinadas regiões do cupom (figura 16D).

A morfologia *pitting* é a mais comum quando relacionada à CMI, e os produtos de corrosão pontuais acarretam um aprofundamento do biofilme para dentro do cupom, que confere um local mais seguro para as células e estimula a adesão e colonização (FLINT; BROOKS; BREMER, 2000). Ao analisar mais a fundo essas estruturas, foi observado células em formato de bacilos e cocobacilos (figuras 16B) e depósitos que se assemelham ao EPS (figura 16C) para cupons do tanque controle, e uma menor concentração celular nos biofilmes do tanque tratamento (figura 16E), provavelmente advindo da ruptura da matriz pelo coquetel. Algumas enzimas contidas na cauda de bacteriófagos, conhecidas como depolimerases, são responsáveis por desestruturar o biofilme pois degradam o EPS a partir da digestão dos polissacarídeos e proteínas envolvidos na matriz, rompendo a rede protetora das células (CARMO, 2019; TIAN et al., 2021). Diante de uma cultura mista, na qual os componentes da matriz extracelular podem diferir (HARPER et al., 2014), a ação do coquetel pode ter sido mais eficiente devido à diversidade viral, expondo as células ao meio e acarretando na desestruturação do biofilme, e menor desgaste do material. Por fim, tem destaque a presença de filamentos no tanque tratamento (figura 16F). Xu et al (2022) relataram a presença de filamentos no biofilme formado por *Desulfovibrio hontreensis* SY-21, assim como também já foi observado para o biofilme duo-espécie de *Listeria monocytogenes* e *Ralstonia insidiosa* (XU et al, 2017), e além de proporem ser um mecanismo de comunicação célula-célula, também pode estar relacionado à comunicação da célula ao substrato, capturando elétrons do aço e induzindo a corrosão. A presença desse processo frente à aplicação do coquetel pode ser uma via de defesa das células para sinalizarem às células vizinhas.

O aprofundamento do material foi correlacionado à profundidade média dos vales medidos nos cupons ( $R_v$ ) (tabela 2), no qual o tanque tratamento, ainda que discretamente, reduziu em 10,5% a extensão da corrosão. A rugosidade média ( $R_a$ ) obtida foram idênticas, o que mostra que a aplicação do coquetel já após o crescimento da cultura pode ter interferido no seu mecanismo de ação em prevenir a

corrosão, assim como a diminuição do número de partículas virais ao longo do tempo também pode influenciar. Isso é observado nas imagens obtidas pela perfilometria (figura 18), onde os tanques apresentaram resultados similares.

Em relação à perda de massa e taxa de corrosão, foram obtidos resultados distintos para as culturas analisadas. Quando avaliado esses parâmetros em Al, ambos se apresentaram menor no tanque de tratamento com o coquetel (figura 6). A partir do resultado de H<sub>2</sub>S, que é um fator crucial na corrosão do material exposto a ele, obter uma redução de 32,4% é positivo diante de um sistema que está sob estudo, uma vez que reduzindo a produção de H<sub>2</sub>S devido à atividade viral sobre as bactérias, os cupons tiveram menor efeito desse gás. De forma contrária, o coquetel foi adicionado após o crescimento inicial AP e não apresentou redução quanto à perda de massa e taxa de corrosão (figura 17). Esse resultado, assim como a medida de Ra obtida da perfilometria, evidenciam que talvez seja necessária concentração maior do coquetel (GONG; LIU; JIANG, 2014). Além disso, como explicado anteriormente, não é possível avaliar os padrões aqui discutidos ao longo dos três períodos propostos, de modo que é possível supor que o coquetel teve um efeito positivo no percurso do experimento assim que aplicado, mas que foi mascarado devido atividade bacteriana sobre o cupom nos primeiros dias de experimento.

## **7. CONCLUSÃO**

Este trabalho concluiu o cultivo de culturas mistas de BRS em um sistema de tanques piloto e que a aplicação de um coquetel de bacteriófagos inespecíficos em concentração de 10<sup>7</sup> UFP/mL foi capaz de reduzir a produção de H<sub>2</sub>S em duas culturas em estudo. A perda de massa e taxa de corrosão apresentada pela cultura mista Al sob o tratamento com o coquetel foram reduzidas. Em relação à cultura mista AP, a caracterização do biofilme apresentou menor concentração de células e menor profundidade dos vales para os tanques tratados, um bom indicativo que a corrosão por pites foi reduzida. Entretanto, a perda de massa e taxa de corrosão não apresentaram diferenças, o que pode sugerir uma reavaliação do coquetel fágico para a cultura AP. O coquetel demonstrou ser uma opção viável de controle da biocorrosão, uma vez que o THPS, além da aquisição de células resistentes, promoveu aumento da rugosidade da superfície do cupom, que pode estimular a adesão bacteriana.

## 8. PERSPECTIVAS

O sistema de tanques piloto é um protótipo proposto para simular tanques de armazenamento de fluidos que estejam expostos à biocorrosão e onde a aplicação de um coquetel de bacteriófagos é capaz de mitigar esse processo. Aqui foram propostos e desenvolvidos experimentos para obter os primeiros resultados, observar a necessidade de ajustes, e quais análises ainda são necessárias. A metagenômica e transcriptômica são essenciais para avaliar o papel do coquetel sobre uma comunidade tão diversa, assim como um possível reajuste na concentração ou dos bacteriófagos que compõe o coquetel aplicado aos tanques. O presente trabalho é inovador e está em constante busca de metodologias atualizadas para oferecer resultados que reduzam a biocorrosão.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLAH, A. et al. Microbially influenced corrosion of steels by *Pseudomonas aeruginosa*. **Corrosion Reviews**, v. 32, n. 3–4, p. 129–141, 2014.

ALABBAS, F. M. et al. Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 78, p. 34–42, 2013a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.10.014>

ALABBAS, F. M. et al. The shielding effect of wild type iron reducing bacterial flora on the corrosion of linepipe steel. **Engineering Failure Analysis**, v. 33, p. 222–235, 2013b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2013.05.020>

ALI GHARIEB, R. M. et al. Characterization of two novel lytic bacteriophages for reducing biofilms of zoonotic multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and controlling their growth in milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 124, n. 109145, p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109145>

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens. 2003. ASTM Committee G01 on Corrosion of Metals, subcommittee G01.05 on Laboratory Corrosion Tests. Designation G 1-03.

AWAD, T. S. et al. Food-Safe Modification of Stainless Steel Food-Processing Surfaces to Reduce Bacterial Biofilms. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 10, n. 27, p. 22902–22912, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsami.8b03788>

BARTON, L. L.; FAUQUE, G. D Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, cap. 2, v. 68, 2009. ISSN 0065-2164.

BERLANGA, M.; GUERRERO, R. Living together in biofilms: The microbial cell factory

and its biotechnological implications. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 165, 2016. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0569-5>

BLAZANIN, M.; TURNER, P. E. Community context matters for bacteria-phage ecology and evolution. **The ISME Journal**, v. 15, p. 3119-3128, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41396-021-01012-x>

BRAGG, R. et al. Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 808, n. 3-4, p. 1-13, 2014. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00027-4)

BRANDÃO, A. et al. Differential transcription profiling of the phage LUZ19 infection process in different growth media. **RNA Biology**, v. 18, n. 11, p. 1778-1790, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1870844>

CARMO, A. J. **Influência do fago vB\_EcoM-UFV13 no biofilme formado pelo consórcio P48SEP**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2019.

CASTANEDA, H.; BENETTON, X. D. SRB-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel-electrolyte interface when exposed to artificial seawater conditions. **Corrosion Science**, v. 50, n. 4, p. 1169-1183, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2007.11.032>

CHAN, B. K.; ABEDON, S. T.; LOC-CARRILLO, C. Phage cocktails and the future of phage therapy. **Future Medicine**, v. 8, n. 6, p. 769-783, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47>

CHEN, L.; WEI, B.; XU, X. Effect of Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) on the Corrosion of Buried Pipe Steel in Acidic Soil Solution. **Coatings**, v. 11, n. 6, p. 625, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6412/11/6/625/htm>

CHRYSALIDIS, A.; KYZAS, G. Z. Applied Cleaning Methods of Oil Residues from Industrial Tanks. **Process**, v. 8, n. 5, p. 569, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr8050569>

COSTA, P. F. **Cultivo de Bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na remoção de sulfato e arsênio utilizando pó de penas de galinha como substrato orgânico**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2012.

CROUZET, M. et al. Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 253, p. 1-12, 2014. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-014-0253-z>

DA SILVA DUARTE, V. et al. A T4virus prevents biofilm formation by *Trueperella pyogenes*. **Veterinary Microbiology**, v. 218, p. 45-51, 2018a. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.025>

DA SILVA DUARTE, V. et al. Genomic analysis and immune response in a murine mastitis model of vB-EcoM-UFV13, a potential biocontrol agent for use in dairy cows. **Scientific Reports**, v. 8, n. 6845, p. 1–12, 2018b. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24896-w>

DE ALMEIDA, É. S. C.; FREIRE, M. DAS G. M.; RABELO, S. K. L. Avaliação dos efeitos da presença de bactérias redutoras de sulfato em linhas de produção de petróleo na bacia de campos. **Perspectivas online**, v. 3, n. 10, p. 119–133, 2001. ISSN: 2236-8868.

DE MATOS, L. P. et al. Simultaneous removal of sulfate and arsenic using immobilized non-traditional SRB mixed culture and alternative low-cost carbon sources. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 1630–1641, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.11.035>

DE SORDI, L. et al. The gut microbiota facilitates drifts in the genetic diversity and infectivity of bacterial viruses. **Cell Host & Microbe**, v. 22, p. 801–808, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.010>

ENNING, D.; GARRELFIS, 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02848-13>

FAZZINO, L. et al. Phage cocktail strategies for the suppression of a pathogen in a cross-feeding coculture. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 1997–2007, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13650>

FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, P. Phage or foe: an insight into the impact of viral predation on microbial communities. **The ISME Journal**, v. 12, n. 5, p. 1171, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41396-018-0049-5>

FERRIOL-GONZÁLEZ, C.; DOMINGO-CALAP, P. Phages for biofilm removal. **Antibiotics**, v. 9, n. 5, p. 268, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/5/268>

FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 563–575, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.94>

FLINT, S. H.; BROOKS, J. D.; BREMER, P. J. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. **Journal of Food Engineering**, v. 43, n. 4, p. 235–242, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00157-0)

GANNA, M. L. et al. Antagonistic activity of *Bacillus* sp. obtained from an Algerian oilfield and chemical biocide THPS against sulfate-reducing bacteria consortium inducing corrosion in the oil industry. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 391–404, 2011. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jimb/article/38/3/391/5994200>

GEREDEW KIFELEW, L.; MITCHELL, J. G.; SPECK, P. Mini-review: efficacy of lytic bacteriophages on multispecies biofilms. **Biofouling**, v. 35, n. 4, p. 472–481, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1613525>

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J. Biofilms: Their impact on health and their recalcitrance toward biocides. **American Journal of Infection Control**, v. 29, n. 4, p. 252-255, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/mic.2001.115673>

GOMES, A. P. P. **Gestão ambiental da água produzida na indústria de petróleo: 70 melhores práticas e experiências internacionais**. 2014. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) - Instituto Alberto Luiz Coimbra, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2014.

GONG, C.; JIANG, X. Application of bacteriophages to reduce biofilms formed by hydrogen sulfide producing bacteria on surfaces in a rendering plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 539–544, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0142>

GONG, C.; LIU, X.; JIANG, X. Application of bacteriophages specific to hydrogen sulfide-producing bacteria in raw poultry by-products. **Poultry Science**, v. 93, n. 3, p. 702–710, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03520>

GONZÁLEZ, S. et al. The Behavior of *Staphylococcus aureus* Dual-Species Biofilms Treated with Bacteriophage phiPLA-RODI Depends on the Accompanying Microorganism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, p. 2821–2837, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02821-16>

GUAN, J. et al. Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in four petroleum reservoirs detected by using 16S rRNA and dsrAB genes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 76, p. 58–66, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.021>

GUO, X. et al. Experimental study of the remediation of acid mine drainage by Maifan stones combined with SRB. **PLOS ONE**, v. 17, n. 1, p. 1-16, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261823>

GUTIÉRREZ, D. et al. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 825, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825>

HALLBECK, L. Determination of sulphide production rates in laboratory cultures of the sulphate reducing bacterium *Desulfovibrio aespoeensis* with lactate and H<sub>2</sub> as energy sources. **Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co.** Technical Report TR-14-14.

HAMILTON, W. A.; LEE, W. Biocorrosion. **Sulfate-Reducing Bacteria - Biotechnology Handbooks**, v. 8. Boston: Editora Springer, 1995; pp. 243-264. ISBN 978-1-4899-1582-5

HARPER, D. et al. Bacteriophages and Biofilms. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 270–284, 2014. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/3/3/270>

ISLAM, M. S. et al. Application of a Phage Cocktail for Control of *Salmonella* in Foods and Reducing Biofilms. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 841, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/9/841>

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Corrosion of metals and alloys - Removal of corrosion products from corrosion test specimens. ISO8407, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Corrosion of metals and alloys. ISO 8044, 2020.

JIA, R. et al. Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 137, p. 42-58, 2018a.

JIA, R. et al. Effects of biogenic H<sub>2</sub>S on the microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by sulfate reducing *Desulfovibrio vulgaris* biofilm. **Corrosion Science**, v. 130, p. 1–11, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2017.10.023>

JIA, R. et al. Effects of biogenic H<sub>2</sub>S on the microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by sulfate reducing *Desulfovibrio vulgaris* biofilm. **Corrosion Science**, v. 130, p. 1–11, 2018c. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2017.10.023>

KARAMYSCHEVA, N. N., et al. Comparison of Two Ways of the Metal Protection against Corrosion Caused by *Desulfovibrio desulfuricans*. **Pakistan Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 53-57, 2018.

KAŹMIERCZAK, Z.; GÓRSKI, A.; DABROWSKA, K. Facing antibiotic resistance: *Staphylococcus aureus* phages as a medical tool. **Viruses**, v. 6, n. 7, p. 2551–2570, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v6072551>

KHOUZANI, M. K. et al. Microbiologically influenced corrosion of a pipeline in a petrochemical plant. **Metals**, v. 9, n. 4, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4701/9/4/459>

KJELDTSEN, K. U. JOULIAN, C.; INGVORSEN, K. Oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria in activated sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 38-43, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es034777e>

KORENBLUM, E. et al. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. **AMB Express**, v. 3, n. 44, p. 1–8, 2013. Disponível em: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/2191-0855-3-44>

KORTRIGHT, K. E. et al. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant. **Bacteria Cell Host and Microbes**, v. 25, n. 2, p. 219-232, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, 2013. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/3/4/a010306.long>

KRETZER KREMER, M. et al. Phages of Sulphate Reducing Bacteria in reactor water from offshore oil wells: tentative method for concentration and purification. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, vol: 25, n. 4, p. 619-626. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522020182484>

KUSHKEVYCH, I. et al. Microscopic Methods for Identification of Sulfate-Reducing Bacteria from Various Habitats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4007, p. 1-27, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/4007>

LAANTO, E. et al. The use of phage FCL-2 as an alternative to chemotherapy against columnaris disease in aquaculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 829, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00829>

LAI, R. et al. Bio-competitive exclusion of sulfate-reducing bacteria and its anticorrosion property. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 194, p. 107480, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.107480>

LAWRENCE, D.; BALDRIDGE, M. T.; HANDLEY, S. A. Phages and human health: More than idle hitchhikers. **Viruses**, v. 11, n. 7, p. 587, 2019. Disponível: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/7/587>

LI, H. et al. Molecular detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria in high-temperature petroleum reservoirs. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 4, p. 771–783, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-010-9733-3>

LI, Y. et al. Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: A review. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 34, n. 10, p. 1713–1718, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2018.02.023>

LIN et al. Biocorrosion control: Current strategies and promising alternatives. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 91, p. 15736–15747, 2012. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/129604>

LITTLE, B. J.; LEE, J. S. Microbiologically Influenced Corrosion. **John Wiley & Sons Inc.** ISBN 978-0-471-77276-7

LOC-CARRILLO, C.; ABEDON, S. T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 111–114, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>

LV, M. et al. Mechanism of microbiologically influenced corrosion of X65 steel in seawater containing sulfate-reducing bacteria and iron-oxidizing bacteria. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 5, p. 4066–4078, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.07.016>

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2016. 987 p. ISBN 978-85-8271-298-6.

MANN, N. H. The third age of phage. **PLoS Biology**, v. 3, n. 5, p. 182, 2005. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0030182>

MC CARLIE, S.; BOUCHER, C. E.; BRAGG, R. R. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 48, p. 100672, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.100672>

MIGUÉIS, S.; SARAIVA, C.; ESTEVES, A. Efficacy of LISTEX P100 at different concentrations for reduction of *Listeria monocytogenes* inoculated in sashimi. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 12, p. 2094-2098, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-098>

MILHO, C. et al. *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* dual-species biofilms: interspecies interactions and antibiofilm efficacy of phages. **Scientific Reports**, v. 9, n. 18183, p. 1-15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54847-y>

MONTAÑEZ-IZQUIERDO, V. Y.; SALAS-VÁZQUEZ, D. I.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 470–477, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.016>

MOTLAGH, A. M. et al. Biofilm control with natural and genetically-modified phages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 67, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-016-2009-4>.

MURTHY, P. S.; VENKATESAN, R. Industrial Biofilms and their Control. **Marine and Industrial Biofouling**, v. 4, p. 65-101, 2008. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-69796-1\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-69796-1_4).

MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 441-454, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1892>

OKORO, C. C. Impacts of Tetrakis-hydroxymethyl Phosphonium Sulfate (THPS) Based Biocides on the Functional Group Activities of Some Oil Field Microorganisms Associated with Corrosion and Souring. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 12, p. 1463-1475, 2014. Disponível em: <https://journalmrji.com/index.php/MRJI/article/view/6273>

OKORO, C. C. The Biocidal Efficacy of Tetrakis-hydroximethyl Phosphonium Sulfate (THPS) Based Biocides on Oil-Pipeline PigRuns Liquid Biofilms. **Petroleum Science**

**and Technology**, v. 33, p. 1366-1372, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10916466.2015.1062781>

OLSEN, N. M. C. et al. Synergistic removal of static and dynamic staphylococcus aureus biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase. **Viruses**, v. 10, n. 8, 2018.

ORTEGA, M. P. et al. Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 573–578, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.08.010>

OTTER, J. A. et al. Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: Implications for hospital cleaning and disinfection. **Journal of Hospital Infection**, v. 89, n. 1, p. 16–27, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.09.008>

PEDRAMFAR, A.; MAAL, K. B.; MIRDAMADIAN, S. H. Phage therapy of corrosion-producing bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* using isolated lytic bacteriophages. **Anti-corrosion Methods and Materials**, v. 64, n. 6, p. 607-612, 2017. Disponível em: <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/ACMM-02-2017-1755/full/html>.

PEREIRA, G. F.; PILZ-JUNIOR, H. L.; CORÇÃO, G. The impact of bacterial diversity on resistance to biocides in oilfields. **Scientific Reports**, v. 11, n. 23027, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02494-7>

POSTGATE, J. R. The Sulfate Reducing Bacteria. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1984.

PRASAD, A. R. et al. Corrosion Inhibition in Oil and Gas Industry: Economic Considerations. **Corrosion Inhibitors in the Oil and Gas Industry**, 1. ed., cap. 5. Nova Jersey: Editora Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2020.

PROCÓPIO, L. The role of biofilms in the corrosion of steel in marine environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 73, p. 1-9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2647-4>

RAJASEKAR, A. et al. Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 1175–1188, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-009-2289-9>

RASHEED, P. A. et al. Controlling the biocorrosion of sulfate-reducing bacteria (SRB) on carbon steel using ZnO/chitosan nanocomposite as an eco-friendly biocide. **Corrosion Science**, v. 148, p. 397–406, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2018.12.028>

RUSSELL, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 36, n. 3–4, p. 247–265, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(95\)00056-9](https://doi.org/10.1016/0964-8305(95)00056-9)

SALIM, A. et al. Bacteriophage-based control of biogenic hydrogen sulphide produced by multidrug resistant *Salmonella enterica* in synthetic sewage. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105797, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105797>

SANTIAGO, A. J. et al. Bacteriophage treatment of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a multispecies biofilms: a potential biocontrol strategy for healthcare facilities. **AIMS Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 43-63, 2020. Disponível em: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2020003>

SHARMA, M. et al. Effect of long term application of tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS) in a light oil-producing oilfield. Effect of long term application of tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS) in a light oil-producing oilfield. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 34, n. 6, p. 605-617, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1476500>

SHAW, M. P.; HOFFMANN, H.; HORNE, M. Case study: Comparison of microbial monitoring techniques used in the field and how their complementarity can be harnessed to build a full picture of the microbial life in the field. *In*: SPE INTERNATIONAL OILFIELD CORROSION CONFERENCE AND EXHIBITION, SPE-179936-MS, 2016, Aberdeen. **One Petro**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2118/179936-MS>

SILLANKORVA, S.; NEUBAUER, P.; AZEREDO, J. Phage control of dual species biofilms of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus lentus*. **Biofouling**, v. 26, n. 5, p. 567–575, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.494251>

SOUZA, P. M. et al. Growth Inhibition of Sulfate-Reducing Bacteria in Produced Water from the Petroleum Industry Using Essential Oils. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 648, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/4/648>

SPRICIGO, D. A. et al. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 2, p. 169–174, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.009>

SUMMER, E. J. et al. Phage of Sulfate Reducing Bacteria Isolated From High Saline Environment. *In*: CORROSION, NACE-11222, 2011, Houston. **One Petro**, 2011.

SYAFAAT, T. A.; ISMAIL, M. C. Microbiologically influenced corrosion (MIC) of storage tank bottom plates. **AIP Conference Proceedings**, v. 1669, n. 1, p. 1–7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.4919141>

TAIT, K. et al. The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 18, n. 4, p. 305-311, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/0892701021000034418>

TIAN, F. et al. Bacteriophage – A Promising Alternative Measure for Bacterial Biofilm Control. **Infection and Drug Resistance**, v. 2021, n. 14, p. 205, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IDR.S290093>

TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm Development. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014>

VARLEY, R. J.; LEONG, K. H. Polymer coatings for oilfield pipelines. **Active Protective Coatings**, v. 233, p. 385-428, 2016. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-7540-3\\_14](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-7540-3_14)

VARON-LOPEZ, M. **Descrição da microbiota relacionada às transformações do enxofre em sedimentos de manguezais**. 2013. Doutorado (Tese de Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2013.

VICKERY, K. et al. Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 80, n. 1, p. 52–55, 2012.

VIDELA, H. A. Prevention and control of biocorrosion. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 49, n. 4, p. 259-270, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00053-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00053-7)

VIEIRA, M. R. S. **Estudo dos processos de corrosão e biocorrosão causados por fluidos da indústria de petróleo**. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2013.

WITHEY, S. et al. Bacteriophages - Potential for application in wastewater treatment processes. **Science of the Total Environment**, v. 39, n. 1-3, p. 1-18, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.021>

XU, D.; GU, T. The War against Problematic Biofilms in the Oil and Gas Industry. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 5, 2015.

XU, L. et al. Inadequate dosing of THPS treatment increases microbially influenced corrosion of pipeline steel by inducing biofilm growth of *Desulfovibrio hontreensis* SY-21. **Bioelectrochemistry**, v. 145, p. 108048, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.108048>

XU, Y. et al. Enhanced biofilm formation in dual-species culture of *Listeria monocytogenes* and *Ralstonia insidiosa*. **AIMS Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 774-783, 2017. Disponível em: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2017.4.774>

YUK, S. et al. The contribution of nitrate-reducing bacterium *Marinobacter* YB03 to biological souring and microbiologically influenced corrosion of carbon steel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, p. 107520, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107520>

ŻACZEK, M. et al. Phage prevalence in the human urinary tract—current knowledge and therapeutic implications. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1–15, 2020. Disponível

em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/11/1802>

ZHAO, K. et al. Mechanistic Modeling of Anaerobic THPS Degradation in Seawater Under Various Conditions. *In: CORROSION CONFERENCE & EXPO, NACE-08512, 2008, Nova Orleans. One Petro, 2008.*

ZHU, L. et al.  $\sigma_{54}$ -Dependent regulator DVU2956 switches *Desulfovibrio vulgaris* from biofilm formation to planktonic growth and regulates hydrogen sulfide production. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 10, p. 3564–3576, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14679>