

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**



Lucas Lourenço Barros

**BACTERIÓFAGOS APLICADOS AO CONTROLE MICROBIANO EM SISTEMAS  
DE RESFRIAMENTO INDUSTRIAIS**

**BELO HORIZONTE**

**2023**

Lucas Lourenço Barros

**BACTERIÓFAGOS APLICADOS AO CONTROLE MICROBIANO EM  
SISTEMAS DE RESFRIAMENTO INDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia dos Santos**

**BELO HORIZONTE**

**2023**

043

Barros, Lucas Lourenço.

Bacteriófagos aplicados ao controle microbiano em sistemas de resfriamento industriais [manuscrito] / Lucas Lourenço Barros. – 2023.

147 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Terapia por Fagos. 3. Bacteriófagos. I. Santos, Vera Lúcia dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE: **LUCAS LOURENÇO BARROS**

Nº REGISTRO: **2021661584**

Às 09:30 horas do dia **14 de agosto de 2023**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Miriam Cristina do Amaral Moravia (Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA/UFMG), Juliana Calábria de Araújo (Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - DESA/UFMG) e a Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos (Orientadora), para julgar o trabalho final "**Bacteriófagos aplicados ao controle microbiano em sistemas de resfriamento industriais**", do aluno **Lucas Lourenço Barros**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos - orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 14 de agosto de 2023

Membros da banca:

Dra. Miriam Cristina do Amaral Moravia

Profa. Dra. Juliana Calábria de Araújo

De acordo:

Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos

(Orientadora)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos  
(Coordenador do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 17/08/2023, às 10:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Calabria de Araujo, Professora do Magistério Superior**, em 17/08/2023, às 14:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vera Lucia dos Santos, Servidor(a)**, em 17/08/2023, às 15:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Cristina Santos Amaral Moravia, Professora do Magistério Superior**, em 22/11/2023, às 23:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2265289** e o código CRC **A66537B4**.

*Para Cândida, In Memoriam.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar força e determinação, em segundo aos que lutam e que lutaram pela educação gratuita e de qualidade em nosso Brasil.

A Antônio e Isis agradeço por doarem parte de suas vidas para que eu possa realizar meu sonho de criança. Com vocês aprendi o significado de amor. Amo vocês pai, e mãe. Agradeço às tias Eunice e Cleonice pelo apoio e constante carinho. Agradeço à minha companheira Nevelly pelo cuidado, amor e apoio. Agradeço também a minha avó Cândida, que hoje mora em meu coração. Suas palavras nunca sairão de mim.

A Vera Lucia dos Santos, agradeço infindamente por toda paciência, moralidade e carinho maternal, tornando a jornada muito mais fácil e tranquila do que seria usualmente.

Agradeço aos meus companheiros de pós-graduação e principalmente aos meus companheiros de pesquisa. Muito obrigado Giovanna, Guilherme, Ana Paula e Luiza por todo esforço, determinação e cuidado em todos os experimentos. A Odilon, agradeço o apoio técnico em tudo que precisávamos. Sem pessoas como você, a universidade não seria o que é hoje.

A PETROBRÁS e FAPEMIG agradeço a concessão da bolsa e os investimentos que permitiram o andamento da pesquisa.

## Resumo

Os bacteriófagos (fagos), vírus que infectam bactérias, têm sido amplamente utilizados como agentes de controle microbiano em diferentes setores devido à sua capacidade de reduzir ou eliminar populações bacterianas. Neste estudo, exploramos a aplicação de bacteriófagos isolados de sistema de resfriamento para o controle de bactérias também isoladas do mesmo sistema. Para tanto, utilizamos dois biorreatores de bancada, que apresentam fluxo contínuo, temperatura controlada em 37°C e alimentados com água sintética de composição semelhante à de um sistema de resfriamento industrial. Os fagos foram caracterizados quanto ao espectro de hospedeiro, multiplicidade de infecção (MOI), atividade bacteriolítica, infectividade em diferentes condições de pH (6,5; 7; 7,5; 8 e 8,5) e temperatura (30,35,40 e 45°C) por meio de ensaios realizados em leitor de Elisa do tipo Varioskan, além de ensaios realizados em frascos de 250 mL e caracterização morfológica via microscopia eletrônica de transmissão (MET), seguida da extração do material genético viral para posterior caracterização genômica. Os resultados demonstraram que todos os 34 fagos analisados apresentaram polivalência. Desses, 10 fagos foram caracterizados como fagos com calda através das análises das morfologias por MET. Três fagos foram avaliados em três diferentes MOI (1,10 e 100), onde a MOI100 se mostrou mais eficaz para os fagos B1 e 12.1.2 e a MOI 1 para o fago18.1.4. Nos testes de infectividade em meio líquido, testou-se 3 bacteriófagos em 12 bactérias. Neste experimento, identificaram-se 6 espécies bacterianas (*Sphingopyxis macrogoltabida*, *Bacillus. pumilus*, *Aciinetobacter sp.* *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Stenotrophomonas maltophilia*) que apresentaram maiores reduções de densidade quando tratadas por 6 fagos (12.1.2; P2, 12.2.2, 12.3.3, 18.1.4 e B1). Já os experimentos de infectividade em diferentes faixas de pH e temperatura mostraram que as atividades líticas foram maiores em pH entre 6,5 e 7,5 e entre 30 e 45°C. Nos experimentos de avaliação da eficácia da fagoterapia em reatores, esses foram inoculados com uma mistura de 3 ou 6 espécies bacterianas e fagos correspondentes, testados no teste de infectividade em meio líquido. Os resultados referentes aos monitoramentos de densidade bacteriana demonstraram que nos experimentos tratados com fagos houve controle bacteriano na forma sésil (redução máxima de 100 vezes) e planctônica (controle máximo de 10 vezes), em que as taxas de controle de bactérias em biofilme se mostraram mais promissoras.

**Palavras chave:** Fagoterapia; Bacteriófagos; Sistema De Resfriamento Industrial; Controle Microbiológico, Microbiologia Ambiental, Remediação.

## ABSTRACT

Bacteriophages (phages), viruses that infect bacteria, have been widely used as microbial control agents in different sectors due to their ability to reduce or eliminate bacterial populations. In this study, we explored the application of bacteriophages isolated from a cooling system to control bacteria also isolated from the same system. To this end, we used two benchtop bioreactors, which have continuous flow, controlled temperature at 37°C and fed with synthetic water with a composition similar to that of an industrial cooling system. The phages were characterized regarding host spectrum, multiplicity of infection (MOI), bacteriolytic activity, infectivity in different pH conditions (6.5; 7; 7.5; 8 and 8.5) and temperature (30.35, 40 and 45°C) through tests carried out in a Varioskan type Elisa reader, in addition to tests carried out in 250 mL bottles and morphological characterization via transmission electron microscopy (TEM), followed by the extraction of viral genetic material for subsequent characterization genomics. The results demonstrated that all 34 phages analyzed showed polyvalence. Of these, 10 phages were characterized as tailed phages through TEM morphology analysis. Three phages were evaluated at three different MOIs (1,10 and 100), where MOI100 was more effective for phages B1 and 12.1.2 and MOI 1 for phage18.1.4. In infectivity tests in liquid media, 3 bacteriophages were tested in 12 bacteria. In this experiment, 6 bacterial species were identified (*Sphingopyxis macrogoltabida*, *Bacillus. pumilus*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* and *Stenotrophomonas maltophilia*) that showed greater reductions in density when treated by 6 phages (12.1.2; P2, 12.2.2, 12.3.3, 18.1.4 and B1). Infectivity experiments in different pH and temperature ranges showed that lytic activities were greater at pH between 6.5 and 7.5 and between 30 and 45°C. In experiments evaluating the effectiveness of phage therapy in reactors, they were inoculated with a mixture of 3 or 6 bacterial species and corresponding phages, tested in the infectivity test in liquid medium. The results regarding bacterial density monitoring demonstrated that in the experiments treated with phages there was bacterial control in the sessile form (maximum reduction of 100 times) and planktonic form (maximum control of 10 times), in which the control rates of bacteria in biofilm were shown to be most promising.

**Keywords:** Phagotherapy; Bacteriophages; Industrial Cooling System; Microbiological Control, Environmental Microbiology, Remediation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Esquema de funcionamento de um sistema de resfriamento fechado com circulação de água. ....	14
<b>Figura 2</b> - Esquema de funcionamento de um Sistema de resfriamento industrial abertos sem recirculação. ....	15
<b>Figura 3</b> – Esquema de funcionamento de um Sistema de resfriamento semiaberto com circulação de água. ....	16
<b>Figura 4</b> - Esquema de funcionamento de uma torre de resfriamento de um sistema de refrigeração semiaberto com recirculação de água.....	17
<b>Figura 5</b> - Esquema das quatro etapas de formação de biofilme: adesão reversível, adesão irreversível, maturação e dispersão.....	19
<b>Figura 6</b> - Tipos de morfologias descritas de bacteriófagos. A) bacteriófagos com calda- B) bacteriófagos sem calda-C) bacteriófagos filamentosos.....	31
<b>Figura 7</b> – Tipos de ciclos de multiplicação de bacteriófagos descritos. A) Ciclo lítico; B) Ciclo lisogênico; C) Ciclo pseudo-lisogênico; D) Ciclo crônico .....	32
<b>Figura 8</b> - Fluxograma dos experimentos realizados durante a dissertação. ....	40
<b>Figura 9</b> – Representação gráfica da metodologia de diluição seriada, no qual visa a diluição de uma amostra de forma exponencial. ....	46
<b>Figura 10</b> - Equipamentos pertencentes ao sistema de resfriamento de bancada confeccionado pelo grupo de pesquisa, A) Suporte com lâminas de vidro alocados dentro dos reatores; B) Reatores utilizados no experimento.....	52
<b>Figura 11</b> - Fluxograma relativo aos experimentos realizados em reatores em escala de bancada durante a realização do trabalho .....	55
<b>Figura 12</b> - Fluxograma simplificado da circulação de água (representado pelas setas) e dos componentes do reator de bancada, tais quais, as bombas, reatores, banho maria e reservatórios.....	62
<b>Figura 13</b> - Representação em gráfico de dispersão relativa ao ensaio de espectro de hospedeiros utilizando os trinta e três bacteriófagos isolados e as trinta e quatro espécies bacterianas.....	67
<b>Figura 14</b> – Resultados referentes as relações entre os valores de densidade bacteriana (UFC/mL), densidade óptica (D.O <sub>600NM</sub> ) e viabilidade bacteriana (UAF) das bactérias <i>S. maltophilia</i> (A); <i>P. aeruginosa</i> (B) e <i>S. marcescens</i> PLA5 (C). ....	69

**Figura 15** Resultados referentes aos padrões de crescimento da densidade óptica bacteriana em meio líquido quando submetida a concentrações distintas de bacteriófagos (Diferentes MOI) (a) *S. maltophilia* 94 e o fago 12.1.2. (b) *S. marcescens* PLA5 e o fago B1 e c) *P. aeruginosa* RLI 17 e o fago 18.1.4. d) *S. maltophilia* 94, *S. marcescens* PLA5, *P. aeruginosa* RLI 17 e os fagos 12.1.2, B1 e 18.1.4. ....71

**Figura 16** – Resultados dos monitoramentos das densidades ópticas durante os tempos os períodos de 24 horas, evidenciado o de crésicmo de tais densidades a partir da de atividade dos bacteriófagos analisados. A) *S. macrogoitabida*; B) *S. saprophyticus*; C) *Bacillus sp*; D) *B. pumilus*; E) *Raltonia sp.*; F) *A. temperans*; G) *Acinetobacter sp*; H) *S.maltophilia*; I) *S.marcescens*; J) *P. aeruginosa*; K) *P. alcaliphila*; L) *Chryseobacterium sp* .....75

**Figura 17** – Resultados de monitoramento das densidades ópticas por 16 horas em quatro faizas de pH distintas (6,5; 7; 7,5 e 8), evidenciando os perfis de crescimento bacteriano nos experimentos controle e tratamento por bacteriófagos. A) Controle; experimentos tratados com bacteriófagos: B) B1; C) 12.2.2; D) 11.2.1; E)12.1; F) 12.2.3; G) 12.1.2 .....79

**Figura 18** - Perfis de crescimento de *P.aeruginosa* em relação ao tempo entre os experimentos controle e tratamento por bacteriófagos. A) Controle; experimentos tratados com bacteriófagos: B) 18.1.4; C) 18C; D) P2. ....81

**Figura 19**- Perfis de crescimento de *S. marcescens* em diferentes temperaturas, tradafos ou não com bacteriófagos. A) Controle; experimentos tratados com bacteriófagos: B) B1; C) 12.2.2; D) 11.2.1; E)12.1; F) 12.2.3; G) 12.1.2. ....83

**Figura 20**- Perfis de crescimento bacteriano em relação ao tempo entre os experimentos controle e tratamento por bacteriófagos. A) Controle; experimentos tratados com bacteriófagos: A)Controle experimentos tratados com bacteriófagos: B) 18.1.4; C) 18C; D) P2; .....85

Figura 21- Microscopia de transmissão do fago 3.1 .....87

**Figura 22**- microscopia de transmissão dos fagos 12.2.2 (A), 11.2.1(B), 12.1 (C), 12.2.3 (D) E 12.1.2 (E) .....88

Figura 23- Microscopias de transmissão dos bacteriófagos 18C (A), P2 (B), 18.1.4 (C), B1 (D). ....89

Figura 24 – A) Monitoramento das densidades bacterianas e virais utilizados nos reator 1 e reator 2 nas formas planctônicas; B) Monitoramento das densidades bacterianas sésseis e bacteriófagos planctônicos nos reatores 1 e 2 durante o

experimento; C) Monitoramento das densidades ópticas das águas sintéticas dos reatores 1 e 2 durante os experimentos.....97

**Figura 25** – A) Monitoramento das densidades bacterianas planctônicas do Reator controle, Reator 1 e Reator 2 durante os experimentos; B) Monitoramento das densidades bacterianas na forma séssil dos do Reator controle, Reator 1 e Reator 2 durante os experimentos; C) Monitoramento das densidade dos bacteriófagos do reator 1 e reator 2 durante o experimento; D) Monitoramento dos parâmetros pH e ORP do Reator controle, Reator 1 e Reator 2 durante o experimento. ....99

**Figura 26** Microscopias de varredura dos biofilmes presentes nas lâminas dos reatores R1(A) ; R2(B) e Reator controle (C e D)..... 103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Relação da comunidade bacteriana presente em plantas de resfriamento industrial segundo estudos analisados.....	22
<b>Tabela 2</b> - Principais agentes químicos utilizados em sistemas de resfriamento industriais para eliminação de biofouling.....	28
<b>Tabela 3</b> - Identificação das bactérias utilizadas no trabalho e locais de coleta dos isolados .....	41
<b>Tabela 4</b> - Relação dos bacteriófagos isolados de diversas estruturas pertencentes aos sistemas de resfriamento da REGAP pela equipe do LMA (UFMG) e as suas respectivas bactérias hospedeiras .....	42
<b>Tabela 5</b> - Metodologia de análise das previsões de vida em anos dos metais e os controles de corrosão através das taxas de corrosão em aço carbono. ....	59
<b>Tabela 6</b> - Coeficientes de correlação de Pearson sobre os parâmetros Densidade óptica, viabilidade celular e densidade bacteriana da bactéria <i>S. maltophilia</i> . ....	70
<b>Tabela 7</b> - Coeficientes de correlação de Pearson sobre os parâmetros Densidade óptica, viabilidade celular e densidade bacteriana da bactéria <i>S. marcescens</i> .....	70
<b>Tabela 8</b> - Coeficientes de correlação de Pearson sobre os parâmetros Densidade óptica, viabilidade celular e densidade bacteriana da bactéria <i>P. aeruginosa</i> .....	70
<b>Tabela 9</b> - Resultados obtidos referentes a quantificação e eficácia de extração do material genético viral .....	86
<b>Tabela 10</b> – Resultados das dimensões dos fagos, mensuradas do software IMAGE J em resultados da microscopia eletrônica de transmissão .....	87
<b>Tabela 11</b> - Resultados do monitoramento dos pesos e das taxas de corrosão dos cupons de aço associadas nos reatores 1, 2 e controle.....	103

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>13</b>
2.1	SISTEMAS DE RESFRIAMENTO	13
2.2	ESTRUTURA E FORMAÇÃO DO BIOFILME EM SISTEMAS DE RESFRIAMENTO	18
2.3	BIOFILMES EM SISTEMAS DE RESFRIAMENTO	21
2.4	CORROSÃO BACTERIANA	23
2.5	CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM TORRES DE RESFRIAMENTO	27
2.5.1	<i>Métodos químicos de controle microbiológico</i>	27
2.5.2	<i>Métodos alternativos de controle microbiológico</i>	29
2.6	BACTERÍOFAGOS	30
2.6.1	<i>Estrutura e Classificação de bacteriófagos</i>	30
2.6.2	<i>Ciclo de infecção dos bacteriófagos</i>	32
2.7	CONTROLE BACTERIANO POR UTILIZAÇÃO DE FAGOS	34
2.7.1	<i>Estudos referentes ao controle bacteriano por utilização de fagos no Brasil</i>	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>39</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
4.1	SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS NO ESTUDO	40
4.2	ESPECTRO/ESPECIFICIDADE DOS BACTERÍOFAGOS EM RELAÇÃO AS BACTÉRIAS ENCONTRADAS NO SISTEMA	42
4.3	MULTIPLICAÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS	43
4.4	TITULAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS	44
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS	45
4.5.1	<i>Correlação entre densidade óptica e UFC/mL e viabilidade usando o corante resazurina</i>	45
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIOLÍTICA COM DIFERENTES MOIS	47
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIOLÍTICA EM ÁGUA SINTÉTICA	48
4.8	ENSAIO DE INFECTIVIDADE EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PH	48
4.9	ENSAIO DE INFECTIVIDADE EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA	49
4.10	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	50
4.11	EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL E AVALIAÇÃO DA PUREZA	51
4.12	DESCRIÇÃO DO APARATO EXPERIMENTAL DOS TESTES SIMULANDO SISTEMAS DE RESFRIAMENTO INDUSTRIAL EM ESCALA DE BANCADA	52
4.12.1	<i>Metodologias de monitoramento de parâmetros químicos e biológicos dos reatores</i>	55
4.12.1.1	<i>Quantificação e Viabilidade de bactérias planctônicas pelo método de resazurina</i>	55

4.12.1.2	Análise quantitativa de bactérias plantônicas.....	56
4.12.1.3	Análise quantitativa de bactérias sésseis .....	56
4.12.1.4	Análise quantitativa de bacteriófagos planctônicos.....	57
4.12.1.5	Avaliação da corrosão em corpo de provas por perda de massa .....	57
4.12.1.6	Análise por microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes presentes nas lâminas teste dos reatores	59
4.12.2	<i>Teste comparativo de viabilidade bacteriana em duas águas sintéticas com características distintas em sistema de resfriamento industrial em escala de bancada .....</i>	60
4.12.3	<i>Fagoterapia aplicada a reatores aos quais utilizou-se água sintética sem adição de extrato de levedura.....</i>	60
4.12.3.1	Teste comparativo de periodicidade de adição de fagos em sistema de resfriamento em escala piloto	60
4.12.3.2	Efeito da aplicação diária de bacteriófagos em reator com água sintética sem adição de extrato de levedura	61
4.12.4	<i>Fagoterapia aplicada a reatores aos quais utilizou-se água sintética com adição de extrato de levedura.....</i>	62
4.12.4.1	Teste comparativo da eficiência da utilização de fagos em reator com adição constante de água sintética enriquecida.....	63
4.12.4.2	Efeitos da adição diária de fagos no controle das densidades de bactérias planctônicas e sésseis em sistemas de resfriamento em escala de bancada .....	63
4.12.4.3	Ensaio comparativo de eficiência de controle bacteriano entre um sistema sem tratamento por fagos , um sistema com adição diária de bacteriófagos e um sistema com adição única de bacteriófagos .....	63
4.12.4.4	Avaliação de coquetéis de fagos no controle de bactérias sésseis e planctônicas em biorreator de bancada inoculado com 6 gêneros bacterianos .....	64
4.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	65
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
5.1	ESPECTRO DE HOSPEDEIRO .....	66
5.2	CORRELAÇÃO ENTRE DENSIDADE ÓPTICA E UFC/ML .....	68
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIOLÍTICA COM DIFERENTES MOIS.....	71
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIOLÍTICA EM ÁGUA SINTÉTICA .....	74
5.5	ENSAIO DE INFECTIVIDADE EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PH.....	79
5.6	ENSAIO DE INFECTIVIDADE EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA .....	82
5.7	EXTRAÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO.....	86
5.8	ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS BACTERIÓFAGOS .....	86
5.9	RESULTADOS DOS TESTES ENVOLVENDO OS SISTEMAS DE RESFRIAMENTO INDUSTRIAL EM ESCALA DE BANCADA	89
5.9.1	<i>Teste comparativo de viabilidade bacteriana em duas diferentes águas sintéticas em sistema de resfriamento industrial em escala de bancada.....</i>	89
5.9.2	<i>Avaliação fagos no controle de bactérias sésseis e planctônicas em biorreator de bancada.</i>	

5.9.2.1	Avaliação da periodicidade de adição de fagos.....	90
5.9.2.2	Efeito da adição diária de fagos no controle bacteriano.....	92
5.9.3	<i>Teste comparativo de aplicação diária do coquetel de fagos com diferentes títulos no controle de bactérias planctônicas e sésseis em sistema com adição contínua de água sintética enriquecida</i>	94
5.9.3.1	Efeitos da adição diária de fagos no controle das densidades de bactérias planctônicas e sésseis em sistemas de resfriamento em escala piloto .....	96
5.9.3.2	Ensaio comparativo de eficiência de controle bacteriano entre um sistema sem tratamento por fagos, um sistema com adição diária de bacteriófagos e um sistema com adição única de bacteriófagos .....	98
5.9.3.2.1	Avaliação da corrosão em corpo de provas por perda de massa .....	102
5.9.3.2.2	Microscopia de varredura dos biofilmes .....	103
5.9.3.3	Ensaio comparativo de eficiência de controle bacteriano em experimento com inóculo de 6 gêneros bacterianos e dosagem diária de fagos.....	104
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>115</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>116</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de resfriamento são amplamente utilizados em vários setores e processos industriais, apresentando caráter fundamental na dissipação do calor de equipamentos e manutenção do funcionamento deles, garantindo a continuidade de produção. Na indústria petrolífera, há ampla utilização de tais sistemas visando o controle das temperaturas da maquinaria industrial para que elas operem em temperaturas que as proporcionem obter maior eficiência em seus processos.

Além das características referentes a temperatura, as águas destes sistemas também podem apresentar nutrientes em sua composição. Estes nutrientes são advindos da adição de anticorrosivos e proporcionam um micro-habitat viável para o estabelecimento de diversos tipos microbianos, como algas, fungos e principalmente, uma variedade de bactérias na forma planctônica ou sésil organizadas em biofilmes. Os biofilmes de modo geral são compostos por comunidades microbianas aderidas em superfícies bióticas ou abióticas envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), que além de promoverem a manutenção da estrutura dos biofilmes, fornecem proteção às células contra estresses ambientais. Ademais, os biofilmes podem comprometer diretamente a eficiência de troca térmica dos sistemas de resfriamento, e com isso pode haver uma série de superaquecimentos que podem comprometer o funcionamento das máquinas presentes nas plantas industriais.

O controle dos biofilmes bacterianos nos sistemas de resfriamento industrial se dá de maneira convencional pela adição de compostos químicos denominados usualmente na indústria como biocidas, que tem como principal objetivo o controle das bactérias e biofilmes, presentes nas águas de resfriamento. Os biocidas mais utilizados são os oxidantes a base de cloro, na forma de cloro gasoso e hipoclorito de sódio, principalmente devido ao custo reduzido, em relação aos demais biocidas, bem como pela elevada experiência que as companhias tratadoras possuem advinda dos sistemas de tratamento de água para consumo humano. Porém, a organização estrutural dos biofilmes não permite que todas as células sésseis entrem em contato com as concentrações do biocida requeridas para o controle eficiente. Além disso, alguns estudos mostraram que células presentes no biofilme apresentam de 10 a 1000 vezes mais resistência ao cloro quando comparadas às células planctônicas e o uso

de cloro pode resultar na formação de subprodutos tóxicos para o ser humano, dentro os quais podem-se destacar os trihalometanos (THMs) e os ácidos haloacéticos (AHAs). Com isso, os biocidas são aplicados em altas concentrações e altas frequências para o controle eficiente de todas as células bacterianas de um biofilme. Porém, as concentrações elevadas de tais compostos podem propiciar a seleção de bactérias resistentes a tratamentos com cloro, além de contribuir para o aumento das taxas de corrosão de ligas de cobre, aço carbono, aço galvanizado, alumínio, e aço inoxidável no sistema. Tendo em vista tal problemática, o projeto em questão objetiva propor uma solução alternativa ao controle químico dos biofilmes baseada na utilização de bacteriófagos, que são vírus que infectam exclusivamente as bactérias.

De modo geral, os fagos apresentam maiores efetividades de controle de bactérias planctônicas, porém eles apresentam também o controle de bactérias sésseis. Os bacteriófagos evoluíram conjuntamente com as suas bactérias alvo, fazendo com que eles possuam uma série de mecanismos que estão em constante evolução para superar os mecanismos de defesa bacterianos. Um dos diversos mecanismos apresentados pelos fagos é a produção de enzimas, capazes de romper a matriz de SPE dos biofilmes, rompendo a estrutura do biofilme como um todo (CHAN, 2015).

Mesmo com as vantagens mencionadas, a utilização de bacteriófagos para o controle bacteriano em sistemas de resfriamento industrial pode apresentar uma série de limitações, dentre elas destacam-se: falta de referenciais metodológicos para aplicação de tais organismos no sistema; dificuldade de encontrar fagos que lisem todas as espécies de bactéria presente nos biofilmes; necessidade de administração de um coquetel de diferentes espécies virais no sistema.

A partir do exposto, podemos identificar o potencial uso da fagoterapia contra a formação de biofilmes, justificando assim a escolha da utilização de tais organismos para controle de biofilmes em sistemas de resfriamento industriais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Sistemas de resfriamento

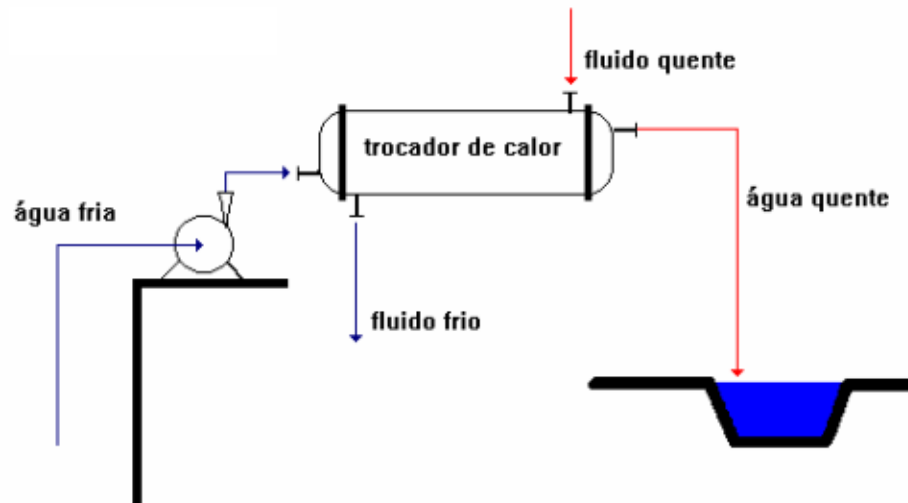
Em grande parte dos processos industriais, há uma intensa transformação de energia pelas máquinas presentes nas plantas industriais, especialmente de energia elétrica (aportada para os sistemas industriais pelos sistemas de transmissão elétrica) para energia cinética (responsável direta pela transformação de produtos industriais). Por sua vez, parte da energia cinética gerada é convertida em energia térmica. O acúmulo dessa energia no sistema faz com que haja também um superaquecimento dos equipamentos envolvidos na produção, comprometendo assim sua eficiência de maneira geral (RAJAGOPAL, 2012). Para evitar tais problemas, são utilizados sistemas de resfriamento, que tem como função promover a dissipação do calor das máquinas, mantendo a temperatura em níveis que não afetem de forma negativa o seu desempenho (DA SILVA, 2005). Nos sistemas de resfriamento das indústrias petrolíferas, a água é o fluido mais empregado, por conta de sua alta condutividade térmica e baixo valor quando comparado com outros fluidos (GENTIL, 2007).

Os sistemas de resfriamento podem ser compostos por ligas de cobre, aço carbono, aço galvanizado, alumínio, aço inoxidável e em alguns casos, poliestireno. Além disso, os sistemas são categorizados em três tipologias: sistemas abertos sem recirculação de água, sistemas fechados com recirculação de água e sistemas abertos com recirculação de água, ou sistemas semiabertos (MANCUSO, 2001), que foram alvo de estudo do projeto em questão.

Os sistemas fechados com recirculação de água se caracterizam por não apresentar evaporação. O sistema inclui um radiador e/ou trocadores de calor refrigerados por gases ou por água (GENTIL, 2007). Eles são normalmente utilizados em processos de pequena escala, como resfriamento de motores diesel, mancais de bombas, camisas do cilindro de compressor, turbinas a gás e sistemas de ar-condicionado (CORTINOVIS, 2006). Geralmente, o sistema fechado transfere o calor absorvido através de um trocador de calor para um sistema aberto, de onde será liberado para a atmosfera (ZHU, 2020). Devido a essa característica, esses sistemas são muitas vezes considerados como uma pequena parte de um sistema aberto de recirculação (ZHU, 2020). No sistema fechado, quase não existe perda de água, já que a água de resfriamento não entra em contato com o fluido refrigerante, assim toda



**Figura 2-** Esquema de funcionamento de um Sistema de resfriamento industrial abertos sem recirculação.

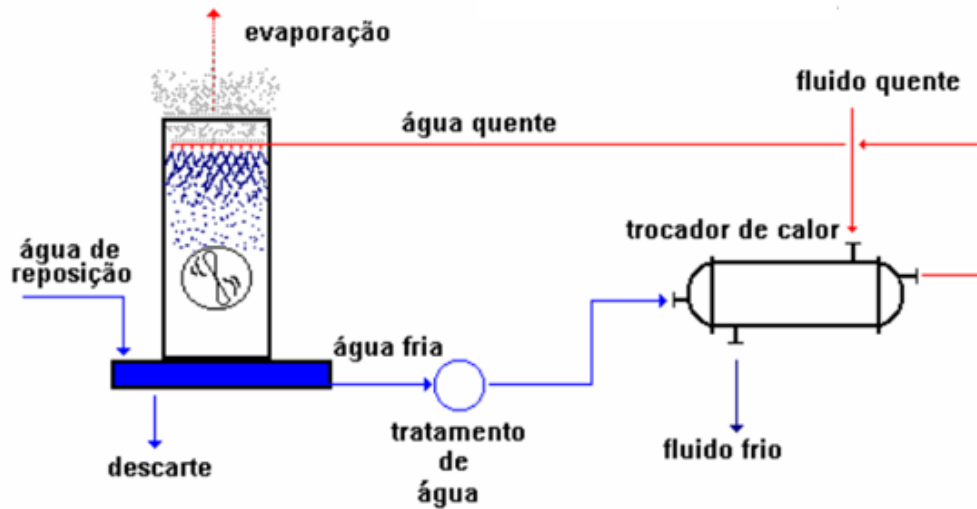


(MANCUSO,2001)

O sistema aberto é comumente utilizado em indústrias que possuem grande disponibilidade hídrica em sua localização, como refinarias de petróleo, usinas hidroelétricas e termoelétricas (GENTIL, 2007). Entretanto, esse sistema apresenta como principal ponto fraco a dificuldade de tratamento preventivo da água contra corrosão, incrustação e proliferação de microrganismos, devido à constante adição de produtos químicos necessários para esse tratamento. Além disso, o grande volume de água utilizado neste sistema apresenta uma série de potenciais impactos ambientais negativos, como o possível desabastecimento hídrico das populações presentes na zona de influência dos empreendimentos, além da perda de habitat por animais que dependam diretamente e indiretamente do recurso hídrico (DANTAS, 1988).

Já os sistemas de resfriamento semiabertos, com recirculação de água, apresentam vantagens em relação aos sistemas abertos sem circulação de água. Esses sistemas necessitam de uma menor quantidade de água para sua operação, já que não há a necessidade de um descarte massivo de água (Figura 3) (HILL, 2013). Além disso, nos sistemas de resfriamento semiabertos, é possível realizar uma série de procedimentos importantes para a obtenção de alta eficiência do sistema, como a clarificação da água de alimentação e o uso de inibidores de corrosão e de agentes dispersantes para controle microbiológico rígido (MACHADO, 2004).

**Figura 3**– Esquema de funcionamento de um Sistema de resfriamento semiaberto com circulação de água.

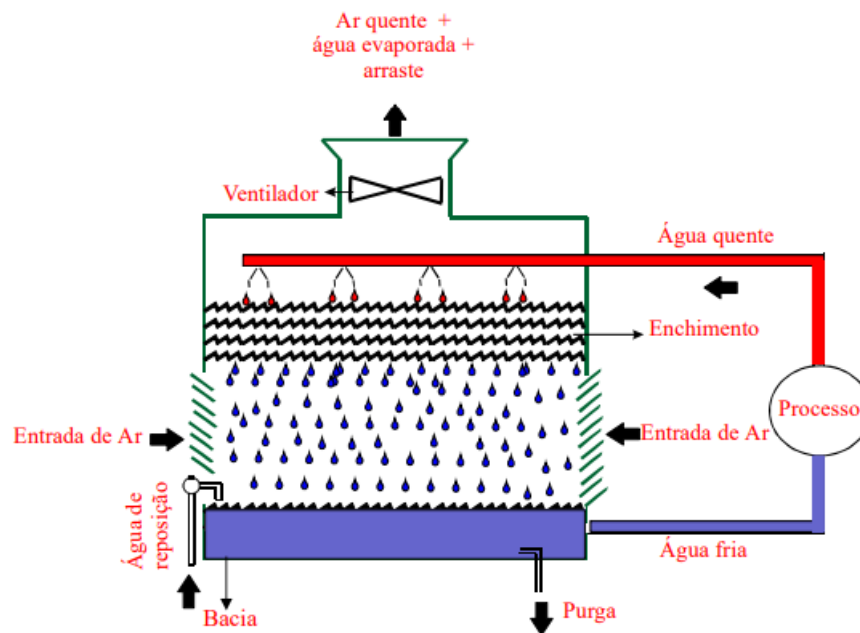


(Mancuso,2001)

Nos sistemas de resfriamento semiabertos, há a utilização de uma estrutura denominada torre de resfriamento (**Figura 4**), que tem por função o resfriamento da água quente resultante do sistema através da troca de calor com o ar atmosférico. Nesse processo, a água quente é jateada pela parte de cima da torre, e o fluxo de ar, gerado pelos ventiladores e entradas de ar, entra em contato com as partículas de água e a água perde calor para o ar, sendo resfriada (MANCUSO, 2001).

Existem dois tipos de torres de resfriamento amplamente utilizados em meio industrial: as torres de resfriamento com tiragem forçada e as torres de resfriamento com tiragem induzida (MANCUSO, 2001). As primeiras utilizam um ventilador situado na base ou nos lados da torre para forçar o ar a entrar horizontalmente no sistema, enquanto as segundas puxam o ar para o interior da torre por meio de um exaustor localizado em seu topo ou em sua base.

**Figura 4-** Esquema de funcionamento de uma torre de resfriamento de um sistema de refrigeração semiaberto com recirculação de água.



(MACHADO,2004).

O tratamento da água utilizada no sistema de resfriamento se torna necessário, pois, durante o funcionamento da torre, ocorre o aumento da concentração de sólidos dissolvidos na água, e em outros equipamentos do sistema, formando assim o *Fouling* (SOUZA, 2019).

Segundo Meng (2017), o *Fouling* se caracteriza como um acúmulo de materiais indesejáveis no sistema de resfriamento, sobretudo nos trocadores de calor. O *Fouling* é dividido em três tipos: *Fouling* orgânico que é composto por materiais de alto peso molecular, provindos de vazamentos de fluidos dos processos industriais, podendo possuir composição química variada; *Fouling* inorgânico que é composto por poeira atmosférica, depósitos de óxido de ferro provindos de corrosão, incrustações de carbonato de cálcio e lama de fosfato de cálcio; e o *Fouling* biológico ou *biofouling*, composto de algas, fungos e bactérias formadoras de biofilme que se aderem às superfícies metálicas (MANCUSO, 2001). Devido a isso, em grande parte destes sistemas, utiliza-se agentes anticorrosivos e dispersantes que atuam diretamente na manutenção das características estruturais dos sólidos dissolvidos do sistema, fazendo com que eles permaneçam dissolvidos em meio líquido, evitando assim uma possível precipitação e futura corrosão por depósito (MACHADO, 2004).

A temperatura elevada da água, aliada a um alto tempo de detenção hidráulica e ao contato direto com o ar atmosférico, propiciam a contaminação e crescimento microbiológico no sistema, que pode culminar na colmatação dos equipamentos de troca de calor, além de uma possível corrosão no sistema (FLYNN, 2009). Portanto, metodologias de controle microbiano, como a utilização de biocidas além da fagoterapia se tornam essenciais para a manutenção do sistema.

## **2.2 Estrutura e formação do biofilme em sistemas de resfriamento**

Biofilmes são compostos por comunidades microbianas complexas ligadas à superfície, cujas células estão inseridas em uma matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares (SPE), que formam uma rede de cadeias poliméricas estabilizadas por ligações intra e intermoleculares, que por sua vez apresenta uma alta capacidade de retenção de água (DECHO 2016). Além disso, esta estrutura organizada em forma de gel é a principal responsável pela estrutura tridimensional dos biofilmes e é um importante fator na formação do biofouling (FLEMMING e WINGENDER, 2010; MAYER et al., 1999; SUTHERLAND, 2001).

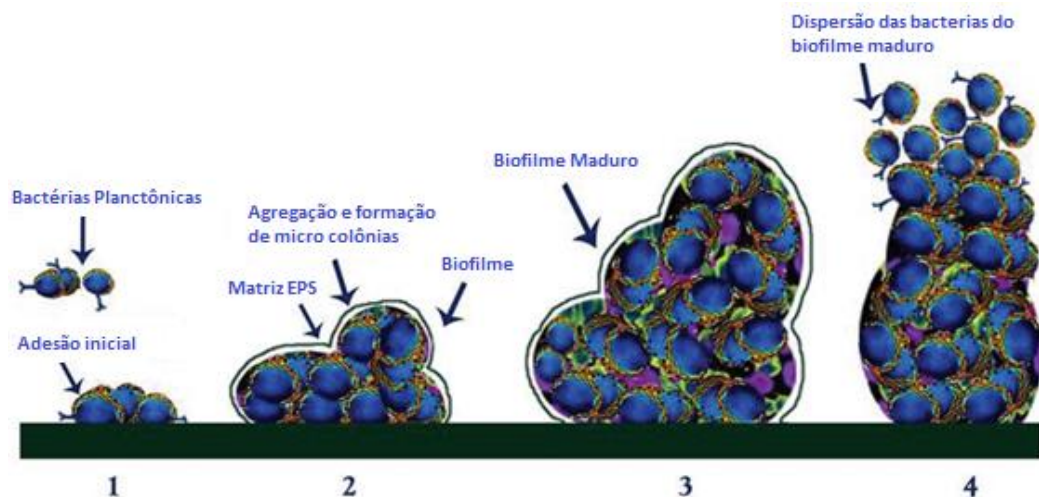
As comunidades microbianas presentes nos biofilmes mostram uma certa heterogeneidade em relação às condições ideais necessárias para a colonização de micro habitats (PANIAGUA, 2020). Portanto, diferentes microrganismos exigem condições variadas de temperatura, pH, luminosidade e oxigênio dissolvido para se estabelecerem nos sistemas de resfriamento. Além disso, essas condições abióticas podem variar dependendo do tipo de sistema de resfriamento e das diferentes condições dentro do mesmo sistema, assim como das características da água de entrada, resultando em uma distribuição espacial e/ou temporal das comunidades microbianas no sistema (DI PIPPO, 2020).

Por exemplo, as algas fotossintéticas têm seu crescimento favorecido em torres de resfriamento com aberturas laterais e superiores em comparação com as partes fechadas das torres, devido à alta incidência luminosa (SAMIMI, 2013). Em relação às comunidades de procariotos, as bactérias mesofílicas predominam nos microambientes do sistema que apresentam temperaturas entre 20°C e 45°C, enquanto as bactérias termofílicas requerem temperaturas médias entre 45°C e 75°C. No entanto, mesmo com as diferenças em relação ao metabolismo e às características

fisiológicas, tanto as bactérias mesofílicas quanto as termofílicas podem ser formadoras de biofilmes (ARCIOLA, 2012).

A formação do biofilme pode ser dividida em quatro principais etapas: adesão reversível, adesão irreversível, maturação e dispersão (**Figura 5**). A regulação do processo de adesão inicial envolve vários fatores, como a polaridade da superfície abiótica e da bactéria, além de ligações de London-van der Waals e interações hidrofóbicas, que são essenciais para a ligação entre as colônias bacterianas e a matriz SPE (DICKINSON,1989).

**Figura 5-** Esquema das quatro etapas de formação de biofilme: adesão reversível, adesão irreversível, maturação e dispersão.



Adaptado de:VEERACHAMY,2014.

Ademais, existe uma série de proteínas de membrana e estruturas superficiais que podem auxiliar na fase inicial de adesão à superfície alvo, como por exemplo as autolisinas, em células de *Staphylococcus* (ARCIOLA, 2012) e pili tipo IV células de *Pseudomonas spp.* (HERNANDEZ-MONTELONGO, 2021). Segundo Beaussart (2014), esses pili são fortes e flexíveis filamentos em forma de bastão com 5–8 nm de diâmetro e 1–2 µm de comprimento, formados por subunidades proteicas, formando um núcleo hidrofóbico no filamento que se acredita fornecer resistência mecânica extrema. Além disso, em *Acinetobacter baumannii* o polissacarídeo extracelular poli-β-(1,6)-N- funciona como uma adesina intercelular para o organismo, mediando sua adesão (CHOI et al., 2009; ORSINGER-JACOBSEN,2013).

Durante a etapa de adesão irreversível, ocorrem interações intercelulares que inibem a formação de flagelos e convertem o fenótipo de mobilidade para o estado sésil. Nessa etapa, há uma maior expressão de genes que codificam a síntese de adesinas e pili tipo IV, importantes para a coagregação intercelular, além do início da formação de componentes da matriz extracelular do biofilme, formando microcolônias (SAMIMI, 2013). Essas microcolônias progridem para macrocolônias, que são envolvidas pela matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos extracelulares, glicolípídeos e peptidolípídeos (ALISSON, 2003; K CHAN, 2015).

A matriz extracelular do biofilme atua como uma barreira de proteção, protegendo os micro-organismos presentes de predadores como protozoários, bacteriófagos, outras bactérias e agentes químicos, como biocidas oxidantes (CHAN, 2015). Dentro da matriz do biofilme, ocorre a sinalização intercelular, a partir do mecanismo de *quorum sensing* (QS), que desempenha um papel importante na fixação e desprendimento de células de biofilmes, coordena a formação de biofilme, motilidade e produção de estruturas responsáveis pela adesão das células bacterianas (DONLAN, 2002; PARSEK, 2005; VEERACHAMY, 2014; XIONG, 2010).

Após a adesão irreversível, ocorre a maturação do biofilme, na qual as células bacterianas começam a se multiplicar e produzir exopolissacarídeos, denotando uma conformação tridimensional ao biofilme. Dentro do biofilme, ocorre a retenção de moléculas de sinalização do QS, enzimas extracelulares e produtos metabólicos, que são importantes para a comunicação entre as células bacterianas (Hall-Stoodley, 2004). Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e outras espécies bacterianas podem formar canais de água abertos que facilitam a troca de nutrientes e produtos no biofilme (WILKING, 2013).

Após a maturação do biofilme, algumas células bacterianas alocadas em tal estrutura começam a se desprender e migrar para outras regiões. Tal etapa é denominada dispersão (VEERACHAMY, 2014). Tal processo se dá em resposta à falta de nutrientes no micro-habitat em questão e ao reconhecimento celular a agentes danosos ao biofilme (DI GIORGIO, 2007). As células desprendidas do biofilme original podem apresentar fenótipos diferentes, resultados de eventos de transferência gênica horizontal, como a conjugação e transformação, facilitados pela proximidade favorecida pela estrutura do biofilme (QIU, 2018). Assim, os novos biofilmes formados

podem apresentar diferenças morfológicas e fisiológicas quando comparados aos biofilmes originais (DI GIORGIO, 2007). Além disso, o tempo entre a colonização inicial e a dispersão dos biofilmes pode diferir em função das espécies bacterianas presentes. Em *Pseudomonas fluorescens*, há a dispersão e recolonização de uma superfície após aproximadamente 5 horas depois da fase 1 de formação de biofilme, em *Vibrio parahaemolyticus*, após 4 horas enquanto *Vibrio harveyi* recoloniza superfícies em um tempo bem menor após 2 horas (KORBER, 1995).

### 2.3 Biofilmes em sistemas de resfriamento

Os materiais que compõem os sistemas de resfriamento podem variar quanto aos seus vários componentes estruturais, tais como torres de resfriamento, bacias e trocadores de calor (HILL, 2013). Por sua vez, eles podem ser construídos de diferentes materiais que também podem influenciar na formação e composição do biofilme, uma vez que as características das superfícies, bem como dos fluidos circulantes afetam tais processos, especialmente na etapa de adesão inicial, que dependem também de características das células microbianas (Wang, 2020). Superfícies metálicas com cargas negativas, como por exemplo o aço, e superfícies bacterianas carregadas negativamente apresentam interações do tipo Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) negativas, o que faz com que haja uma forte repulsão entre o material e a célula, dificultando a adesão e formação de biofilmes (RYU, 2014). De acordo com esta teoria, a interação total entre uma superfície e uma célula bacteriana é a soma das forças atrativas de Lifshitz-van der Waals, e as interações eletrostáticas de Coulomb (HORI e MATSUMOTO, 2010). Segundo Matsumoto (2010), em baixa força iônica (ausência de sais dissolvidos), quando uma bactéria se aproxima de uma superfície, ela encontra uma barreira de energia que não pode ser superada apenas pela motilidade ou movimento browniano. Em alta força iônica (presença de sais dissolvidos), esta barreira de energia desaparece e as células bacterianas podem facilmente se aproximar da superfície e aderir irreversivelmente. Portanto, a adesão bacteriana e a posterior colonização da superfície irá depender da interação bactéria-superfície.

O biofilme pode causar sérios problemas nos processos de resfriamento, já que o acúmulo significativo de bactérias (*Fouling*) pode causar o bloqueio parcial dos tubos de condução da água para a troca de calor (WANG, 2013). Ele pode fazer com que o

sistema de resfriamento não funcione como foi dimensionado, resultando em uma menor troca de calor e consequente, superaquecimento da maquinaria, o que pode levar a potenciais prejuízos financeiros nos processos industriais (VEIGA, 2010).

A análise da literatura disponível revela que *Proteobacteria*, particularmente membros dos subgrupos *Alpha* e *Beta*, *Cyanobacteria* e *Acidobacteria* estão presentes em biofilmes de diversas plantas de resfriamento industrial (Wang et al., 2013; Di Gregorio et al., 2017) (**Tabela 1**).

**Tabela 1** Relação da comunidade bacteriana presente em plantas de resfriamento industrial segundo estudos analisados.

<b>Bactérias encontradas em sistemas de resfriamento industrial</b>		
<b>Alphaproteobacteria</b>	<b>Gammaproteobacteria</b>	<b>Betaproteobacteria</b>
<i>Aliihoeflea</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Cupriavidu</i> ssp.
<i>Bosea</i> sp.	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Delftia</i> sp.
<i>Brevundimonas</i> sp.	<i>Pseudoxanthomona</i> ssp.	<i>Hydrogenophaga</i> sp.
<i>Devosia</i> sp.	<i>Rhizobacter</i> sp.	<i>Massilia</i> sp.
<i>Erythrobacter</i> sp.	<b>Firmicutes</b>	<i>Rubrivivax</i> sp.
<i>Hyphomicrobium</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp.	<b>Planctomycetes</b>
<i>Methylobacterium</i> sp.	<i>Exiguobacterium</i> sp.	<i>Planctomycetes</i>
<i>Paracoccu</i> ssp.	<b>Actinobacteria</b>	<b>Acidobacteria</b>
<i>Porphyrabacter</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Acidobacterium</i> sp.
<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Microcella</i> sp.	<b>Bacteroidetes</b>
<i>Sphingopyxis</i> sp.	<i>Serinicoccus</i> sp.	<i>Arenibacter</i> sp.
<i>Paracoccus</i> sp.	<i>Actinobacter</i> sp.	<i>Flavobacterium</i> sp.
<i>Parvularcula</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Flexibacter</i> sp.
<i>Rhodobacter</i> sp.		
<i>Roseococcus</i> sp.		
<i>Rubellimicrobium</i> sp.		

**Adaptado de: Di Gregorio (2017); Pinel (2020); Narenkumar (2019)**

Estudos de diversidade realizados por Di Gregorio (2017), Pinel (2020) e Narenkumar (2019) baseados em sequenciamento de nova geração em diferentes plantas de resfriamento industrial denotaram que de maneira geral, os biofilmes são compostos por membros das famílias Sphingomonadaceae, Comamonadaceae, Hyphomicrobiaceae, Moraxellaceae e Bacillaceae. Além disso, tais estudos evidenciaram que os gêneros mais abundantes da

família Sphingomonadaceae identificados em tais estudos foram *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* e *Sphingopixis*. Já em relação a família Comamonadaceae, os gêneros predominantes são *Hydrogenophaga* e *Acidovorax*. Na família Hyphomicrobiaceae, a maioria das espécies são oligotróficas, adaptadas a baixas concentrações de nutrientes. No caso da família Bacillaceae, os principais membros encontrados pertencem ao gênero *Bacillus*, enquanto na família Moraxellaceae predominaram espécies do gênero *Actinobacter*.

Ademais, estudos também indicam que espécies de *Pseudomonas* frequentemente podem ser encontradas em biofilmes de sistemas de resfriamento. Os fatores principais para tal achado são que algumas espécies são produtoras ativas de SPE, que desempenham um papel na proteção das células contra íons metálicos (SINGH, 2017; PEREIRA, 2018; PARANJAPE 2020; ARULIAH, 2014). Em estudos realizados por Almeida (1998), *Flavobacterium* também foi encontrado nas águas de resfriamento, assim como espécies do gênero *Bacillus*, frequentemente associadas à microincrustação.

A colonização bacteriana em sistemas de resfriamento industrial pode ocorrer até mesmo em materiais compostos por ligas de cobre, que apresentam maior resistência a colonização microbiana, como por exemplo o latão (CHEN, 2019). Tal classe de metal apresenta propriedades ainda não muito bem elucidadas que resultam na lise celular; dentre tais mecanismos, destaca-se a geração de espécies reativas de oxigênio (CHATTERJEE, 2014).

## **2.4 Corrosão bacteriana**

Em geral, a corrosão é uma degradação espontânea de materiais como resultado de interação química ou físico-química com o meio ambiente, sendo que a principal causa da corrosão dos metais é sua instabilidade termodinâmica (CHIRKUNOV, 2015). Os equipamentos presentes em sistemas de resfriamento industriais normalmente incluem materiais com comportamento de corrosão diferente: aço carbono e aço inoxidável, cobre e suas ligas, ligas de alumínio, aço galvanizado e materiais não metálicos (FLYNN, 2009; CHIRKUNOV, 2014).

A corrosão é um problema comum em sistemas de resfriamento industrial, e a água utilizada nestes sistemas pode ser uma das principais causas desse problema.

A composição química e biológica, valor de pH, temperatura, regime hidrodinâmico e condutividade elétrica são alguns dos parâmetros físico-químicos que podem afetar as características corrosivas da água (WANG, 2016).

Várias substâncias dissolvidas na água podem afetar a corrosão dos metais de maneiras distintas. Por exemplo, íons cloreto e sulfato podem diminuir a resistência à corrosão da maioria dos metais, enquanto silicatos solúveis ou sais de metais alcalino-terrosos podem ajudar a formar uma película protetora contra fatores corrosivos (RAJALA, 2017).

O valor do pH também determina em grande parte o comportamento de corrosão de materiais e seus mecanismos associados. Além disso, o aumento da temperatura, geralmente, também acelera a corrosão dos metais (RAHMANI, 2016). Além disso, condições operacionais do sistema como a velocidade de fluxo do sistema afeta os processos de transferência de massa, precipitação e assim por diante. Portanto, sua mudança tem um efeito ambíguo na taxa de corrosão (DEYAB, 2016).

Devido à variedade de mecanismos de corrosão e às propriedades dos materiais, existem diferentes classificações de tipos de corrosão (CHIRKUNOV, 2016). Com relação aos sistemas de resfriamento de água, onde a corrosão é de natureza eletroquímica, há vários tipos de corrosão, dentre eles a corrosão microbiana ou biocorrosão (CMI) (CHANDRASATHEESH, 2019). Em condições de pH 4-9 e temperatura entre 10 e 50°C, vários microrganismos secretam polímeros/ácidos extracelulares que podem iniciar diferentes formas de corrosão, como *pitting*, corrosão galvânica, corrosão sob tensão e fragilização por hidrogênio (MARUTHAMUTHU et al., 2011). A biocorrosão é extremamente agressiva e pode levar à falha nos sistemas de trocadores de calor, sistemas de proteção contra incêndios, tubos de água de resfriamento, tubos de transmissão de petróleo e estruturas offshore (LI, 2018).

Entre os micro-organismos associados à corrosão, destacam-se as bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias oxidantes de sulfato (BOS), bactérias oxidantes de ferro, bactérias produtoras de ácido e bactérias produtoras de SPE (EXLEY et al., 2007; MELCHERS, 2018). As BRS são microrganismos anaeróbios que realizam redução dissimilatória de sulfato a H<sub>2</sub>S. Elas podem se desenvolver bem em habitats anaeróbicos, como sedimentos de solo, campos de petróleo, estações de tratamento de águas residuais e em águas de sistemas de resfriamento industriais (WERNER et

al., 1998). Esses microrganismos apresentam uma ampla faixa de tolerância a temperatura, pH, salinidade e pressão e são distribuídos em vários ambientes, incluindo reservatórios de petróleo (ZHOU et al., 2020). Embora sejam microrganismos estritamente anaeróbios, alguns grupos conseguem tolerar o oxigênio por algumas horas (CHANDRASATHEESH, 2019).

Modelos sugeridos de mecanismos de corrosão induzida por BRS incluem a formação de biofilmes, que afetam as características eletroquímicas de superfícies metálicas (STOECKER, 2001; LIU et al., 2009). Após a aderência das bactérias na superfície do metal, há a liberação de metabólitos que resultam em alterações no pH, bem como oxigênio dissolvido e concentrações de íons de cloreto e sulfeto na interface metal-biofilme (EDUOK, 2018).

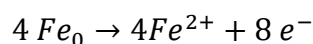
A contribuição das bactérias redutoras de sulfato (BRS) para o processo de corrosão pode ser explicada por diversos mecanismos. Um desses mecanismos é a despolarização catódica, que ocorre via hidrogenases produzidas pelas bactérias, levando a uma redução do potencial elétrico e conseqüentemente à corrosão do material (IVERSON et al., 1983). Além disso, a presença de metabólitos como o sulfeto de hidrogênio pode contribuir para a corrosão adicional do aço (HAMILTON, 2003). Outro fator relevante é a produção de compostos voláteis de fósforo pelas BRS, os quais também contribuem para o processo corrosivo (SILVA et al., 2002).

A presença de BRS pode ser caracterizada pela formação de minerais como troilita ( $\text{FeS}$ ), pirrotita ( $\text{Fe}_{0,875-1}\text{S}$ ), mackinawite ( $\text{FeS}_{0,93-0,96}$ ), greigite ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) ou sulfureto de ferro amorfo ( $\text{FeS}_{\text{amorph}}$ ) (LIU et al., 2000; DUBIEL et al., 2002). O sulfeto de hidrogênio produzido pelas bactérias é o principal produto da respiração desses microrganismos e pode contribuir para a corrosão adicional do aço, uma vez que é altamente corrosivo em presença de água e oxigênio (HAMILTON, 2003).

As reações químicas envolvidas no processo de corrosão em aço carbono em presença de BRS foram amplamente estudadas. De acordo com HERRO (1993), as principais reações envolvidas no processo de corrosão em aço carbono são a redução do oxigênio e a oxidação do ferro, as quais são mediadas pelas BRS. Essas reações levam à formação de compostos como  $\text{FeS}$ ,  $\text{FeS}_2$  e  $\text{FeCO}_3$ , os quais podem prejudicar a integridade do material.

De acordo com HERRO (1993), as principais reações envolvidas no processo de corrosão em aço carbono são:

- Anodo:



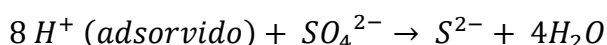
- Dissociação da água:



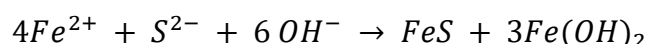
- Catodo:



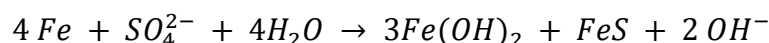
- Conversão do sulfato pela bactéria:



- Produtos finais de corrosão:



Reação global:



Além das BRS, as bactérias oxidantes de sulfato (BOS) também apresentam um papel importante na biocorrosão. BOS como *Thiobacillus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thermothrix* e *Sulfolobus* são geralmente aeróbicas, acidófilas ou neutrófilas por natureza (BEECH e GAYLARDE 2014). Esses microrganismos convertem sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) em enxofre elementar (S<sup>0</sup>) por oxidação parcial, ou sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), que em água forma ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), resultando assim em corrosão metálica. Além disso, segundo Chandrasatheesh (2019), BOS também podem ser encontradas em sistemas de injeção de água em reservatórios de óleo.

As bactérias oxidantes de ferro (BOF) são organismos microaerofílicos depositantes de metal que têm a capacidade de oxidar os íons de ferro ferroso (Fe<sup>2+</sup>) em ferro férrico (Fe<sup>3+</sup>) durante o seu metabolismo. Esse processo de oxidação resulta na formação de hidróxidos férricos hidratados, conhecidos como tubérculos, que são depósitos sólidos de cor avermelhada que podem se acumular nas superfícies das tubulações (PIRI, 2021). É importante destacar que a taxa de oxidação biótica do Fe

(II) é mais rápida do que em ambientes abióticos (TUHELA et al., 1992), o que torna a incrustação biológica um problema sério em vários sistemas de abastecimento de água (CHANDRASATHEESH, 2019). Dang (2011) aponta que os gêneros de BOF mais comumente associados à corrosão são *Sphaerotilus*, *Gallionella*, *Leptothrix*, *Clonothrix*, *Siderocapsa*, *Mariprofundus* e *Crenothrix*.

Além disso, outros gêneros de bactérias anaeróbias podem contribuir para processos de biocorrosão, como por exemplo o gênero *Clostridium*, que pode produzir ácidos orgânicos muito agressivos aos metais, sendo estas encontradas frequentemente sobre depósitos, nas proximidades das superfícies metálicas corroídas, e no interior de tubérculos (ILHAN, 2017).

Além dos tipos bacterianos mencionados anteriormente, outras bactérias formadoras de biofilme também desempenham um papel importante na corrosão (BAUTISTA, 2015). Esses organismos induzem a corrosão por meio de metabólitos secretados, como proteínas ou polissacarídeos, que podem dissolver-se e ter uma capacidade de se ligar em íons metálicos (JIN, 2014; ZHANG, 2015). Portanto, os microrganismos em questão criam um gradiente de concentração de oxigênio através da espessura da matriz do biofilme, o que pode induzir a formação de corrosão localizada na superfície do metal (CHANDRASATHEESH, 2019).

## 2.5 Controle microbiológico em torres de resfriamento

### 2.5.1 Métodos químicos de controle microbiológico

A utilização de biocidas em sistemas de resfriamento industrial é uma abordagem comum para combater microrganismos causadores de *biofouling* (CLOETE et al., 1998; BROUSE, 2017). Dentre tais agentes, o cloro é o biocida oxidante mais amplamente utilizado devido ao seu baixo custo e alta eficácia (FAGERLUND et al., 2016; GAN et al., 2016).

Além do cloro, outros biocidas oxidantes como, ozônio, cloreto de bromo, bromo estabilizado e peróxido de hidrogênio são também utilizados para controle microbiológico em torres de resfriamento (**Tabela 2**) (DI PIPPO, 2014; AL-BLOUSHI, 2017). Além dos biocidas oxidantes, os biocidas não oxidantes, compostos principalmente por aminas, aldeídos ou isotiazolona dispersantes e produtos à base

de enzimas são usados de forma combinada com os oxidantes para aumentar a eficácia do controle (PATHAK, 2021; ASHRAF, 2014).

Tanto os compostos biocidas oxidantes como os não oxidantes podem apresentar uma gama de vantagens, como por exemplo, o baixo custo operacional, alta efetividade no combate de biofilmes e baixo risco de toxicidade quando manipulados (VEIGA,2013). Porém, estes produtos também podem apresentar desvantagens como a formação de gases tóxicos, alto custo operacional, potencial corrosivo, potencial de formação de *Fouling* e baixa eficiência no combate de algas presentes nos biofilmes (DI PIPPO, 2018)). Portanto, a escolha do biocida para uso no sistema deve levar em conta todas as características supracitadas (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Principais agentes químicos utilizados em sistemas de resfriamento industriais para eliminação de biofouling

Biocidas oxidantes				
Tipo de Biocida	Forma	Concentração máxima recomendada	Vantagens	Desvantagens
Cl <sub>2</sub>	Gasosa	0.5 mg/L	Econômica; Alta efetividade	Preocupações com a segurança do gás tóxico; equipamentos caros
NaOCl	Líquida	N/A	Econômica; Alta efetividade	Baixa atividade, estabilidade limitada
Peróxido de Hidrogênio	Sólida	N/A	Econômica; Alta efetividade	Adiciona cálcio ao sistema
NaOCl + NaBr	Líquida	N/A	Efetividade; facilmente adaptável a maioria dos sistemas de cloração	Requer alimentação com dois produtos químicos
Cloreto de Bromo	Líquida	N/A	Forma mais econômica de bromo	Custo do alimentador, segurança e preocupação de manuseio
Bromo estabilizado		0.2 mg/L	Boa estabilidade, não tóxico	Custo mais alto, menos eficaz em algas e com alta carga orgânica
Ozônio	Gasosa	N/A	Efetivo contra organismos formadores de esporos	Muito reativo e volátil, corrosivo, baixa solubilidade, questões de segurança limitantes, perda rápida,
Peróxido de Hidrogênio	Líquida	N/A	Se degrada em água e oxigênio	Ação mais lenta, precisa de maior resíduo no sistema
Biocidas não oxidantes				
Tipo de Biocida	Organismos Alvo	Concentração máxima recomendada	Vantagens	Desvantagens
Glutaraldeído	Bactérias; Algas e Fungos	N/A	Alta eficácia em várias aplicações	Tóxico se inalado
Tiocianatos	Bactéria	N/A	Baixo custo	Baixa solubilidade

Isotiazolona	Bactérias; Algas e Fungos	N/A	Ampla espectro de ação, persistente	Pode causar irritação, sensibilização da pele
Compostos quaternários de amônia	Bactérias; Algas Moluscos	N/A	Ampla espectro, ação rápida	Ineficaz vs. fungos, pode causar espuma

Adaptado de Di Pippo (2018)

De modo geral, os mecanismos de ação dos biocidas consistem em ligação e inativação de função da parede celular, membrana citoplasmática, proteínas funcionais e estruturais e materiais genéticos dos microrganismos (RNA e DNA) (CLOETE et al., 1998). Ademais, tais compostos, como o hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio podem liberar radicais livres, que atacam componentes celulares essenciais, incluindo lipídeos, proteínas e DNA (PENNA, 2005;)

Devido à configuração estrutural dos biofilmes microbianos, os agentes oxidantes não obtêm grande sucesso no tocante a sua eliminação (CRITCHLEY, 2009). Segundo estudo em escala piloto conduzido por Kim e colaboradores (2002), bactérias sésseis (associadas a formação de biofilme) apresentam resistência 100 vezes maior a agentes oxidantes comparado às bactérias planctônicas devido aos mecanismos de defesa estruturais e da matriz do biofilme. Portanto, uma concentração muito maior de biocida aliada com uma maior frequência de aplicação é necessária para controlar a formação de biofilmes dos sistemas de resfriamento (MAH et al., 2001). Assim, a alta concentração de tais compostos levanta problemas operacionais e, como por exemplo, a corrosão de equipamentos do sistema graças a altas concentrações de cloro, que possui alto caráter corrosivo (RUBIO et al., 2015).

### 2.5.2 Métodos alternativos de controle microbiológico

Tendo em vista as lacunas apresentadas pela utilização de biocidas químicos, alternativas como os biodispersantes "verdes" e os detergentes à base de enzimas, principalmente proteases e enzimas de hidrólise de polissacarídeos (MEYER 2003), também podem apresentar papel importante no controle microbiano por atuarem na degradação dos principais componentes da matriz dos biofilmes (BRIDIER et al., 2011). Além disso, a utilização de bacteriófagos se apresenta como uma solução potencial para o controle de biofilmes em sistemas de resfriamento industriais.

Os bacteriófagos ou "fagos" são vírus que atuam especificamente sobre células bacterianas, e devido a essa atividade são eficazes no controle bacteriano em diversas situações (WITHEY, 2005). Com número estimado em  $10^{31}$  no planeta, os

fagos podem até ultrapassar o número de bactérias em aproximadamente dez vezes em alguns ecossistemas (SUTTLE, 2005). Eles são encontrados em todos os biomas explorados, como por exemplo, o trato gastrointestinal humano, solo e o oceano (DION, 2020).

Os fagos podem ser usados em diversos campos da ciência com o objetivo de controle bacteriano e controle de biofilme bacteriano (JAMAL, 2019). Dentre elas, a área da saúde apresenta diversos estudos referentes à utilização de fagos para o combate de bactérias resistentes a antibacterianos, além da utilização de fagos para o combate de biofilmes em infecções (WU, 2021; PRINCIPI, 2019; DANIS-WLODARCZYK, 2021)

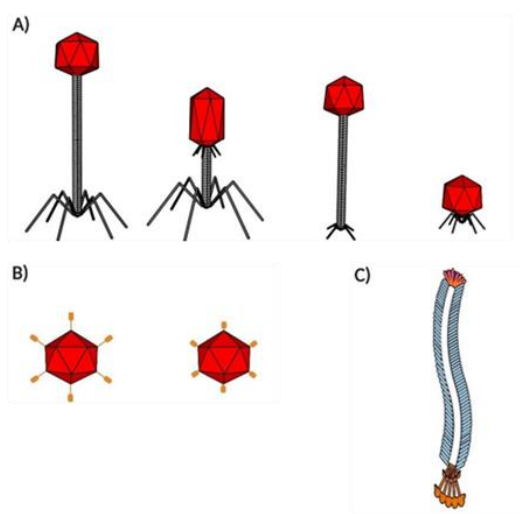
Além da área da saúde, a área ambiental também concentra uma gama de estudos relativos ao controle bacteriano. Dentre eles, há estudos que utilizaram bacteriófagos para controle bacteriano em sistemas de tratamento de água (ALI AL-KAABI, 2016; WU, 2017) e sistemas de tratamento de esgoto (DIAS, 2018; RUNA, 2021). Ademais, há uma série de estudos que caracterizam e identificam bacteriófagos presentes em sistemas de resfriamento industrial, demonstrando que pode haver a possibilidade de controle bacteriano através da utilização destes isolados (YAP, 2016; GRYGORCEWICZ, 2022; CAVALLARO, 2022).

## **2.6 Bacteriófagos**

### **2.6.1 Estrutura e Classificação de bacteriófagos**

Os bacteriófagos, assim como outros vírus, são parasitas intracelulares obrigatórios e podem ser encontrados em diversos ambientes. Esses organismos apresentam três tipos morfológicos distintos (**Figura 6**), sendo eles os fagos com calda, os fagos sem calda e os fagos filamentosos, os quais podem conter material genético de DNA, fita simples ou fita dupla, ou RNA (BAYAT, 2021). Ademais, os tamanhos dos fagos são variados, com dimensões que variam de 20 a 200 nm, podendo algumas vezes ultrapassar essa dimensão (DE JONGE, 2019).

**Figura 6-** Tipos de morfologias descritas de bacteriófagos. A) bacteriófagos com calda- B) bacteriófagos sem calda-C) bacteriófagos filamentosos.



Adaptado de: **Bayate colaboradores (2021)**.

Recentemente, o Comitê de Vírus da União Internacional de Sociedades Microbiológicas (ICTV) propôs uma nova classificação para os bacteriófagos, que inclui a abolição da nomenclatura baseada em morfologia e a adoção de nomes de espécies binomiais. A nova classificação é baseada em uma análise filogenética da composição do genoma viral (ss/ds, DNA ou RNA) (ZHU, 2022). Foram analisados 4.079 genomas bacterianos e de fagos relacionados. A análise resultou na organização de todos os fagos dentro da classe *Caudoviracetes*. Além disso, foram criadas 7 ordens (*Crassvirales*, *Juravirales*, *Kirjokansivirales*, *Magrovirales*, *Methanobavirales* e *Thumleimavirales*), 63 novas famílias, 109 novas subfamílias, 1360 novos gêneros e 4.079 espécies de fagos.

Essa nova abordagem permite que fagos com morfologias diferentes, mas que compartilham um ancestral comum, sejam agrupados juntos. A classificação anterior, se baseava na morfologia, e muitas vezes colocava fagos com características semelhantes em grupos diferentes, dificultando a comparação entre diferentes estudos e a compreensão da evolução dos fagos.

## 2.6.2 Ciclo de infecção dos bacteriófagos

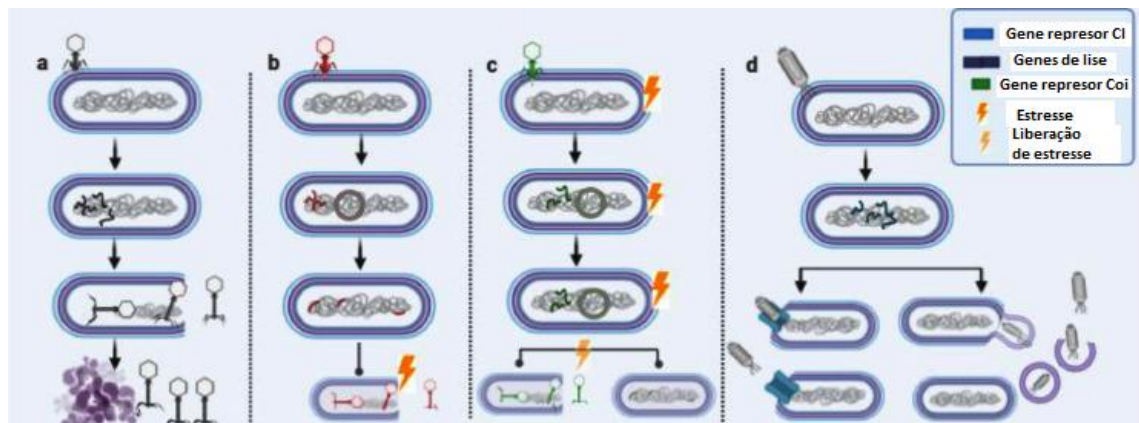
Tal como acontece com outros vírus de maneira geral, os bacteriófagos reconhecem moléculas específicas na superfície da célula hospedeira, através de receptores primários, como o peptidoglicano, lipopolissacarídeo, e receptores secundários, como flagelos e açúcares de superfície que compõem as cápsulas e camadas de biofilme (BERTOZZI, 2016).

Após o reconhecimento do hospedeiro, o bacteriófago inicia a infecção através da ligação irreversível na parede celular bacteriana. Essa ligação é mediada por um ou mais componentes da placa-base, que é composta por proteínas que interagem de forma específica com os receptores presentes na parede celular da bactéria hospedeira, permitindo a fixação e o início da infecção (LACQUA, 2006).

Após a ligação irreversível, o fago injeta seu material genético, que pode ser composto por DNA ou RNA, no lúmen celular bacteriano. Esse processo é mediado por uma estrutura especializada no fago, denominada "cauda contrátil". Essa estrutura é capaz de se contrair, permitindo que o DNA ou RNA seja injetado na célula bacteriana. (DOSS, 2017).

Existem quatro tipos de ciclos virais de replicação descritos atualmente, que são os ciclos líticos, lisogênicos, os ciclos pseudo-lisogênicos e o ciclo de vida crônico (ŁOŚ, 2012) (Figura 7).

**Figura 7** – Tipos de ciclos de multiplicação de bacteriófagos descritos. A) Ciclo lítico; B) Ciclo lisogênico; C) Ciclo pseudo-lisogênico; D) Ciclo crônico



Adaptado de MAKKY, 2021

O ciclo lítico é característico dos fagos virulentos, enquanto os fagos temperados apresentam atividade lisogênica, conforme descrito por Makky (2021). Ao final do ciclo lítico, os fagos expressam genes que codificam holinas, lisinas e depolimerases, os quais desmontam os envoltórios celulares bacterianos e rompem as camadas de peptidoglicanos. Isso transforma a célula hospedeira em uma fábrica para a síntese de novos fagos, que por sua vez, causam a lise da célula hospedeira. Após a lise, os fagos podem infectar e matar outras células próximas, como explicado por Young (2014).

Já no ciclo lisogênico, os fagos temperados integram seus materiais genéticos no cromossomo bacteriano, sendo transmitidos verticalmente para as células filhas nas divisões celulares subsequentes, sem causar lise celular (MAKKY, 2021). Os fagos que utilizam tal ciclo de vida podem integrar seu material genético de forma aleatória ou em sítios específicos, chamados de “*attachment sites*”, por meio de transposição ou recombinação de sítio específico, respectivamente (MAKKY, 2021).

De acordo com Howard-Varona et al. (2017), o ciclo lisogênico do fago pode ser dividido em três etapas principais: estabelecimento, manutenção e indução. Na etapa de estabelecimento, o fago incorpora seu material genético no genoma do hospedeiro e se replica juntamente com ele. Na etapa de manutenção, os genes do fago são transmitidos verticalmente para as células filhas do hospedeiro e são mantidos na forma latente. Já na etapa de indução, ocorre a ativação dos genes líticos do fago, resultando na saída do ciclo lisogênico e entrada no ciclo lítico. Durante o ciclo lisogênico, os fagos lisogênicos geralmente aparecem na forma de placas turvas em placas de Petri devido à lise incompleta, como resultado do bloqueio dos genes das proteínas líticas pelos repressores de lise (por exemplo, repressores CI, CII, CIII), que dominam a lisogenicidade (MCCULLOR, 2018).

De acordo com Cenens et al. (2013), o ciclo pseudo-lisogênico é um dos modos de interação fago-bactéria que ocorre em condições de crescimento estressantes, como baixos níveis de nutrientes. Nesse ciclo, os fagos pseudo-lisogênicos não realizam a replicação (ciclo lítico) nem integram o seu genoma aos genomas bacterianos (ciclo lisogênico). Quando o ciclo de vida se estabiliza na pseudo-lisogenia, os fagos podem retornar a um dos ciclos de replicação mais comuns, assim que um ambiente mais favorável estiver disponível (ŁOŚ, 2012).

Em geral, os fagos que seguem o ciclo pseudo-lisogênico, como os fagos temperados, podem oferecer benefícios mutualísticos entre o fago e seu hospedeiro bacteriano. De acordo com Makky (2021), os fagos que seguem o ciclo pseudo-lisogênico podem oferecer benefícios ao hospedeiro bacteriano, como a regulação da expressão gênica e o aumento da resistência a estresses ambientais. Isso ocorre porque, durante a pseudo-lisogenia, o fago pode modular a expressão gênica da bactéria hospedeira e induzir a produção de proteínas protetoras que ajudam a aumentar a resistência da célula hospedeira a condições adversas. Além disso, a presença do fago pode ajudar a aumentar a diversidade genética da população bacteriana, o que pode ser benéfico em ambientes variáveis e imprevisíveis.

Os fagos podem apresentar diferentes modos de interação com as células hospedeiras, incluindo os fagos líticos, lisogênicos, pseudo-lisogênicos e crônicos. Os fagos virulentos são capazes de causar a lise bacteriana assim que entram na célula, enquanto os fagos lisogênicos se integram e replicam juntamente com o cromossomo bacteriano até que os sistemas responsáveis pela sua excisão sejam ativados, levando ao início do ciclo lítico. Já os fagos crônicos, diferentemente dos demais, brotam da membrana bacteriana sem causar a lise celular durante o seu ciclo de multiplicação. (LAWRENCE, 2019; MAKKY, 2021).

## **2.7 Controle bacteriano por utilização de fagos**

Desde a sua descoberta há mais de um século pelos pesquisadores Frederick Twort e Felix D'Herelle (SALMOND e FINERAN, 2015), os bacteriófagos têm sido amplamente utilizados em países da Europa Oriental como uma abordagem terapêutica para o tratamento de infecções bacterianas. Essa preferência é baseada tanto em considerações tecnológicas quanto no valor terapêutico dos fagos. Em contrapartida, no resto do mundo, o uso de antibióticos tem sido o método predominante de combate a infecções bacterianas, desde meados do século XX (MYELNIKOV, 2018). O primeiro relato de uso clínico bem-sucedido de fagos foi em 1921, em um caso de furúnculos causados por *Staphylococcus* spp., como relatado por Bruynoghe e Maisin (1921).

Além da descoberta dos antibióticos, vários outros fatores contribuíram para o abandono da fagoterapia, incluindo a falta de conhecimento sobre os ciclos de vida e as características gerais dos bacteriófagos, como sua especificidade de hospedeiro,

bem como a falta de protocolos padronizados para o isolamento, cultura e aplicação dos fagos, levando a diversos erros técnicos em relação à sua aplicabilidade (VISPO e PUCHADES, 2001). No entanto, com o surgimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos a partir dos anos 80, a fagoterapia ressurgiu como uma possível alternativa terapêutica em países orientais, enquanto os países ocidentais continuaram buscando novos antibacterianos (WEINBAUER, 2004).

Segundo Shute (2013), 70% das bactérias presentes no planeta já desenvolveram resistência aos antibióticos. Como consequência disso, houve o surgimento de genes bacterianos de resistência a antibióticos que por sua vez são passados horizontalmente pelas bactérias, impactando nos processos de controle bacteriano em processos de tratamento de efluentes e tratamento de água (BERENDONK, 2015; STEWART, 2001; KARKMAN, 2018).

A fagoterapia surge como uma alternativa promissora para o controle biológico de bactérias, diante das dificuldades apresentadas no uso de agentes antibacterianos químicos. Sua utilização pode reduzir a dependência desses biocidas químicos para o controle bacteriano, além de apresentar outras vantagens em relação a eles. Estudos comparativos e contrastantes têm demonstrado a eficácia dos fagos contra bactérias resistentes a antibióticos, sua facilidade de isolamento e propagação, além da possibilidade de uso conjunto com outros fagos e biocidas. Outras vantagens incluem a eficácia no combate aos biofilmes bacterianos e baixa toxicidade. Com sua aplicabilidade em diversos segmentos, os fagos têm potencial para serem amplamente utilizados como agentes de controle bacteriano (SULAKVELIDZE e KUTTER, 2005; LOCCARRILLO e ABEDON, 2011; JASSIM e LIMOGES, 2014; KONOPACKI et al., 2020; FUJIWARA et al., 2011).

A área da saúde de uma maneira geral é onde se concentra a maior parte dos estudos relacionados ao uso de fagos, principalmente se tratando do combate de bactérias resistentes à antibacterianos (KREMMER, 2017). Alguns estudos vêm demonstrando taxas de sucesso da fagoterapia de cerca de 90% ao combate de agentes bacterianos em pacientes acometidos por bactérias resistentes (KONOPACKI, et.al., 2020; DANIS-WLODARCZYK, et.al., 2015). Harada e colaboradores (2018) citam vários exemplos de aplicações do uso de fagos no tratamento de infecções bacterianas como na doença pulmonar obstrutiva crônica (enfisema), peritonite (inflamação do peritônio), osteomielite (inflamação dos ossos)

entre outras, em humanos. Os fagos utilizados para o tratamento dessas infecções foram administrados por via oral, prévio tratamento dos pacientes com antiácidos e gelatina, para proteger aos fagos da acidez gástrica e posteriormente se comprovou que os fagos chegavam à corrente sanguínea (LÓPEZ, 2005). Nesse estudo, os investigadores reportaram que 90% dos pacientes tratados se recuperaram satisfatoriamente com a cura da doença, sarando as feridas e as fístulas (VISPO & PUCHADES, 2001;).

Dentre os autores que apresentam estudos referentes a fagoterapia, destaque-se, ZHANG e colaboradores (2017), que em seus estudos caracterizaram um fago lítico (PS2) que tinha ação contra isolados clínicos de *Serratia marcescens*. Haddad e colaboradores, (2019) descreveram estudos de usos eficazes de fagos no controle e prevenção de organismos multirresistentes (MDROs) e do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*). A maioria dos estudos mostrou eficácia (87%) e segurança (67%) dos fagos testados. Porém, existem poucos estudos examinando a porcentagem de resistência bacteriana a fagos.

Além disso, há vários centros de pesquisa distribuídos em vários países que possuem como o foco a utilização de bacteriófagos em pacientes, como o Instituto Eliava de Bacteriófagos, o instituto de Microbiologia e Virologia, em Tbilisi, Geórgia, que por sua vez apresenta a mais longa experiência em fagoterapia segundo Kutateladze (2008), e na Unidade de bacteriofagoterapia do Instituto Ludwik Hirsfeld de Imunologia e Terapia Experimental em Wrocław, Polônia (MIĘDZYBRODZKI et al., 2012). A aplicação de bacteriófagos pode ser não apenas uma solução valiosa no setor médico, mas também em outros campos onde as bactérias podem ter um impacto negativo, como por exemplo nos setores industriais de maneira geral.

O controle biológico por bacteriófagos em escala industrial e agroindustrial vêm se tornando cada vez mais frequente. Diversos estudos vêm sendo conduzidos, como por exemplo, a utilização de fagos para tratamento de fitopatógenos em tomates (WANG, 2019; BALGH, 2018), utilização de fagos para controle de *E.coli* e *Salmonella* em carnes de frango e boi (PELYUNTHA, 2021; WANG 2017), utilização de fagos para combate de *P. aeruginosa* e *Vibrio alginolyticus* em aquacultura (CAFORA, 2019;

KALATZIS, 2016), utilização de fagos para tratamento de águas residuárias (MATHIEU, 2019), utilização de fagos para tratamento controle bacteriano em plantas de estação de tratamento de efluentes (JASSIM, 2016), e utilização de fagos juntamente com adição de cloro para tratamento de biofilmes (ZHANG, 2013). Porém, não há relatos de trabalhos que envolvam a utilização de bacteriófagos em sistemas de resfriamento industrial para controle de bactérias.

Entre os trabalhos relacionados ao uso de bacteriófagos para o controle de biofilmes industriais, há uma série de estudos que demonstram a capacidade desses vírus em produzir enzimas que hidrolisam a matriz polimérica do biofilme (MOTLAGH et al., 2016; PIRES et al., 2016; GONZÁLEZ-GÓMEZ et al., 2021). Essas enzimas, como as despolimerases, atuam na dispersão e quebra da matriz do biofilme, comprometendo sua estrutura (POŁASKA et al., 2019). Além das despolimerases, alguns fagos também produzem enzimas líticas conhecidas como VAPGHs, que atuam na fase inicial do processo de adsorção (YANG et al., 2018).

Porém, alguns fatores como, a temperatura e o pH estão frequentemente relacionados a sucessos ou não da utilização de bacteriófagos (SCARASCIA, 2018; HU, 2016; BUJAK, 2020). A desnaturação proteica do material genético, das estruturas dos fagos e das enzimas despolimerases secretadas são os principais fatores relacionados a perda de eficiência lítica (OLSZAK, 2015; AL-WRAFY, 2019)

Com o conhecimento do papel das enzimas bacteriófagas na ação contra biofilmes bacterianos, várias pesquisas têm se concentrado na edição genética dos fagos para aumentar a expressão de proteínas destinadas a aumentar suas propriedades anti-biofilme (MOTLAGH et al., 2016; SANTOS et al., 2018).

A produção em larga escala de produtos que apresentam fagos em sua composição principal vem se tornando mais comuns. Em 2006, o Food And Drug Administration (FDA) aprovou o uso e a preparação de bacteriófagos como Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) como aditivos alimentares para o controle da bactéria patogênica *Listeria monocytogenes* em carne de aves e derivados. Algumas empresas Estadunidenses, como OmniLytics Inc. (Sandy, UT, Estados Unidos) e Intralytix Inc. (Baltimore, MD, Estados Unidos) desenvolveram diferentes produtos bacteriófagos para aplicação como desinfetantes na indústria de alimentos que podem ser utilizados contra uma variedade de bactérias, tais como

*Salmonella*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. A utilização de produtos que têm como base os bacteriófagos também foi aprovado para uso no processamento de alimentos pelo Food Standards Australia e Nova Zelândia (FSANZ, 2012). Dentre as companhias que produzem e comercializam estes produtos, a empresa holandesa Microcos BV (Wageningen, Holanda) é um dos destaques, pois comercializa produtos à base de bacteriófagos contra *Salmonella* e *E. coli*.

### **2.7.1 Estudos referentes ao controle bacteriano por utilização de fagos no Brasil**

No Brasil, atualmente não existem produtos à base de bacteriófagos registrados ou regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portanto, a comercialização de produtos contendo bacteriófagos não é permitida. A aplicação de bacteriófagos no país é principalmente restrita a trabalhos acadêmicos e pesquisas científicas.

As pesquisas referentes a utilização de bacteriófagos no Brasil são em grande parte voltadas para as áreas médicas e agropecuária. Os estudos da área agropecuária são: utilização de bacteriófagos para redução de *Salmonella heidelberg* em frangos (VAZ, 2022); utilização de bacteriófagos na indústria de alimentos (SOUTELINO, 2021); sensibilidade de *Salmonella gallinarum* a tratamentos com bacteriófagos (RIZZO, 2017); caracterização de bacteriófagos de *S. aureus* oriundos do leite bovino (BARASUOL, 2021).

Ademais, também há estudos que utilizaram bacteriófagos para o controle bacteriano na agricultura como: utilização de bacteriófagos no controle de *Xanthomonas campestris* em repolho (MARRONI, 2013); isolamento e caracterização de bacteriófagos com foco na sua utilização para controle da mancha bacteriana do tomateiro (SOUSA, 2020). Em relação a pesquisas que utilizam bacteriófagos para tratamento de biofilme em área industrial, há menos publicações, dentre eles destaca-se o trabalho de Dias (2014), que avaliou a viabilidade de utilização de bacteriófagos no controle de biofilmes em membranas de osmose inversa.

### 3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso de fagoterapia no controle do crescimento bacteriano de forma planctônica e séssil e monitoramento de taxas de corrosão associadas em um biorreator em escala de bancada.

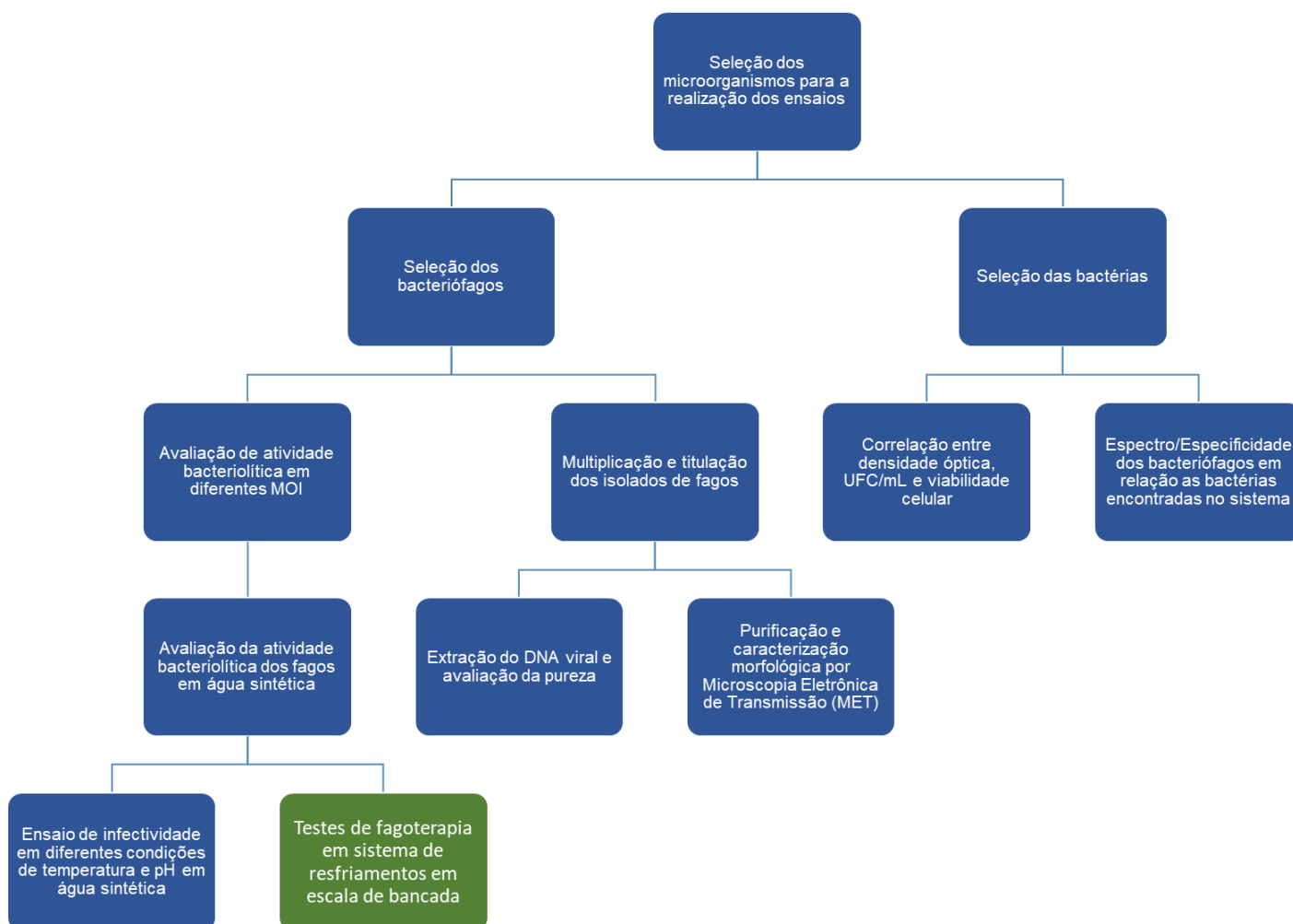
#### 3.1 Objetivos específicos

- Testar o perfil lítico dos fagos isolados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Aplicada - LMA/UFMG sobre as bactérias isoladas do sistema de resfriamento da REGAP- PETROBRÁS.
- Avaliar das possíveis interferências físico-químicas como pH e temperatura em relação aos perfis líticos dos fagos analisados.
- Caracterizar morfológica dos bacteriófagos através de microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar a manutenção das densidades bacterianas em biorreator em escala de bancada em duas diferentes composições de águas de reposição;
- Testar a utilização de bacteriófagos para a eliminação de bactérias sésseis e planctônicas em biorreator em escala de bancada.
- Verificar a presença ou não de bacteriófagos nos biofilmes dos reatores de bancada através de microscopia de varredura

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para melhor entendimento da sequência dos experimentos realizados pelo trabalho, o fluxograma abaixo (**Figura 8**) visa clarificar o processo científico do presente trabalho.

**Figura 8-** Fluxograma dos experimentos realizados durante a dissertação.



### 4.1 Seleção dos microrganismos utilizados no estudo

As bactérias e bacteriófagos usados no estudo, foram selecionados a partir de representantes depositados na coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Tais microrganismos foram isolados de amostras de águas provenientes de diferentes locais da planta industrial da Refinaria Gabriel Passos (REGAP) Unidade do Coque – MG:: bacia de torre de resfriamento, lagoa aerada, lagoa de Ibitaré, e saídas de tratamento secundário e terciário. Ademais, no

teste de avaliação de espectro de hospedeiros utilizou-se também espécies bacterianas isoladas do sistema de nanofiltração utilizado pela Petrobrás em uma Unidade de Remoção de Sulfato (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Identificação das bactérias utilizadas no trabalho e locais de coleta dos isolados

<b>Identificação bacteriana</b>	<b>Local de isolamento</b>
<i>Acidovorax temperans</i> M188	Bacia da torre de resfriamento
<i>Acidovorax temperans</i> M198	
<i>Acidovorax temperans</i> M189	
<i>Bacillus vallisnolis</i> M4	
<i>Ochrobactrum tritici</i> M3	
<i>Pseudomonas acauliphila</i> M183	
<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i> M119	
<i>Ralstonia</i> sp. M180	
<i>Serratia marcescens</i> M8	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> M178	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> M6	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 94	
<i>Serratia marcescens</i> RLA 17	
<i>Serratia marcescens</i> PLA5	
<i>Serratia marcescens</i> RLA12	
<i>Acinetobacter</i> sp. M241	Lagoa de Ibitité
<i>Chryseobacterium</i> sp. M125	
<i>Bacillus pumilus</i> RLI21	
<i>Bacillus cereus</i> M18	
<i>Bacillus pumilus</i> RLI16.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RLI17	
<i>Acidovorax temperans</i> RLI 22	
<i>Serratia marcescens</i> RLI33	
<i>Bacillus</i> sp. AB1	Membrana de Nanofiltração
<i>Brevibacillus choshinensis</i> BA56	
<i>Lysinibacillus</i> sp AA51	
<i>Microbacterium</i> sp. B2A	
<i>Ochrobactrum anthropi</i> BA5	
<i>Ochrobactrum intermedium</i> BB51	
<i>Serratia liquefaciens</i> BB41	Saída do tratamento secundário
<i>Streptomyces griseus</i> BA14	
<i>Ochrobactrum</i> sp M12	
<i>Paenibacillus alugiana</i> M121	Saída do tratameto terciário
<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i> M199	

Os trinta e quatro fagos isolados pelo grupo de pesquisa apresentam sua origem distribuída entre várias localidades da planta, como: Lagoa de Ibitité, Lagoa aerada da estação de tratamento de efluentes da REGAP e Bacia da torre de resfriamento (**Tabela 4**). Para isolar os bacteriófagos, foram utilizadas bactérias de

espécies encontradas em alta densidade nesses locais como hospedeiras, são elas: *P. aeruginosa* RLI17, *S. marcescens* (PLA5, RLA12, RLI33) e *S. maltophilia* 94.

**Tabela 4** - Relação dos bacteriófagos isolados de diversas estruturas pertencentes aos sistemas de resfriamento da REGAP pela equipe do LMA (UFMG) e as suas respectivas bactérias hospedeiras

Código do bacteriófago	Bactéria hospedeira	Local de isolamento
3.1	<i>S. maltophilia</i>	Bacia da Torre de resfriamento
17.1.1		
17.1.2	<i>P. aeruginosa</i>	
17.1.4		
17.2		
10		Lagoa aerada
11.1.1		
11.2.1	<i>S. marcescens</i>	
11.2.2		
P2		
18.1.1		
18.1.2		
18.1.3		
18.1.4		
18.2.2		
18.2.3		
18.2.4		
18C	<i>P. aeruginosa</i>	
B1		
B6		
P1		
P2		Lagoa de Ibirité
P2		
P3		
P4M		
P4P		
12.1		
12.2.1		
12.2.2		
12.2.3	<i>S. marcescens</i>	
B2		
B3		
B4		
B5		

#### 4.2 Espectro/Especificidade dos bacteriófagos em relação as bactérias encontradas no sistema

Com o objetivo de verificar quais fagos isolados apresentavam efeitos líticos sobre as bactérias isoladas, foi avaliado o espectro de hospedeiro pela técnica de

*spot*. em triplicata. Nos ensaios foram utilizados os isolados bacterianos e isolados de fagos apresentados respectivamente nas tabelas **Tabela 3** e **Tabela 4**.

Uma alíquota de 0,1 mL de cultura de cada bactéria a densidade óptica de 0,024 D.O. (600nm) foi misturada com 2,5 mL de meio Luria Bertani (LB, KASVI, Brasil) semissólido (0,6% de ágar) fundido e resfriado a aproximadamente 45°C. Esta mistura foi vertida em placas contendo 20 mL de Tryptic Soy Agar (TSA, KASVI, Brasil) sólido de forma a obter um tapete uniforme de bactérias. Após solidificação da sobrecamada, 4 µL de cada suspensão contendo fagos em concentração de 10<sup>6</sup> UFP/mL foram depositados sobre a sobrecamada. Assim, cada bactéria recebeu em cada placa 34 alíquotas (correspondem aos 34 extratos purificados de fagos em estudo) de 10 µL, através da técnica de microgota.

Após secagem das gotas à temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e avaliadas quanto à presença ou ausência de placa de lise, representadas por um halo claro nas áreas dos “spots”. Os resultados obtidos foram usados para agrupar os fagos de forma hierárquica considerando o espectro de hospedeiros usando *software online* Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>, Broad Institute).

### **4.3 Multiplicação dos Bacteriófagos**

A multiplicação dos fagos foi feita para obtenção de extratos com altos títulos para uso posterior em ensaios de estabilidade, atividade bacteriolítica e experimentos envolvendo o reator de bancada.

Para isso, uma alíquota de 100 µL de cada bactéria hospedeira crescida em meio LB, na fase exponencial (D.O.<sub>600nm</sub> de 0,165), foi transferida para um Erlenmeyer de 150 mL contendo 80 mL do mesmo meio. Os frascos foram incubados a 37°C até alcançar a fase exponencial (D.O.<sub>600nm</sub> de 0,165). A seguir, os frascos foram adicionados de 2 mL de cada fago purificado em concentração de 10<sup>7</sup>UFC/mL e incubados a 37 °C por 24 horas ou até a observação da lise celular evidenciada pela limpidez da cultura. O conteúdo foi então centrifugado a 10.700 x g por 20 minutos a 4 °C em centrífuga refrigerada (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fischer Scientific, Alemanha). O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana de 0,22 µm de

diâmetro de poro (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemanha). Posteriormente, os fagos foram quantificados em UFP/mL seguindo a metodologia disposta no item seguinte (item 4.4), e posteriormente a isso, foram armazenados a 4°C até seu uso.

#### 4.4 Titulação de Bacteriófagos

A fim de estabelecer a concentração dos fagos provindos das etapas de multiplicação foi necessário realizar a titulação. Para tanto, foram realizadas diluições seriadas em proporções de 1:10 até a ordem de  $10^{-10}$  da suspensão de fagos. Em seguida, alíquotas de 100  $\mu$ L de cada uma das diluições foram transferidas para microtubos de polipropileno de 2 mL contendo 100  $\mu$ L da bactéria hospedeira em fase logarítmica de crescimento (D.O.  $_{600nm}$  em torno de 0,165). Os microtubos foram então incubados por 15 minutos a 37 °C. Em seguida, a mistura foi transferida para tubos de vidro contendo 2,5 mL de meio LB semissólido (6 % ágar) fundido e resfriado a aproximadamente 45 °C. A mistura foi homogeneizada e imediatamente vertida sobre uma nova placa de meio TSA sólido. As placas foram então incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após a incubação, foi realizada a contagem das placas de lise que se formaram, respeitando os limites estabelecidos de 30 a 300 placas de lise (BROCK, 1964). O número de unidades virais infecciosas (título de fagos) foi expresso como unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL), que é determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{UFP}{mL} = n * FC * FD$$

Tendo em vista que:

*n* : número de placa de lises contadas;

*FC*: Fator de correção (valor do inóculo multiplicado para que se obtenha o número de fagos em 1 mL);

*FD*: Fator de diluição (inverso da diluição).

## 4.5 Caracterização dos Bacteriófagos

Após os testes de especificidade de hospedeiro e avaliação bacteriolítica em água sintética, foram escolhidos os bacteriófagos que apresentaram maiores atividades líticas sobre as bactérias isoladas das torres de resfriamento. Os fagos purificados foram caracterizados em diversos parâmetros para o melhor entendimento a respeito ao perfil de infecção e susceptibilidade de infecção em diferentes condições temperatura quanto pH. Para a avaliação quanto a multiplicidades de infecção (MOI) ideal para uma maior atividade bacteriolítica, foram utilizados os fagos: B1 isolado a partir de *P. aeruginosa* RLI17; 12.1.2 isolado a partir de *S. marcescens* PLA5, 18.1.4 isolado a partir de *P. aeruginosa* RLI17.

No experimento de avaliação das influências de diferentes condições de pH e temperatura na infecção viral, foram utilizados seis bacteriófagos isolados de *S. marcescens* PLA5 (12.2.2, 12.1, 12.2.3, 12.1,2, 11.2.1) e quatro fagos (B1, 18C, P2, 18.1.4) isolados a partir de *P. aeruginosa* RLI17, os quais foram escolhidos para os demais testes do presente estudo. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi empregada para elucidar os aspectos morfológicos dos fagos em estudo, incluindo o bacteriófago 3.1, isolado a partir de *S. maltophilia* 94.

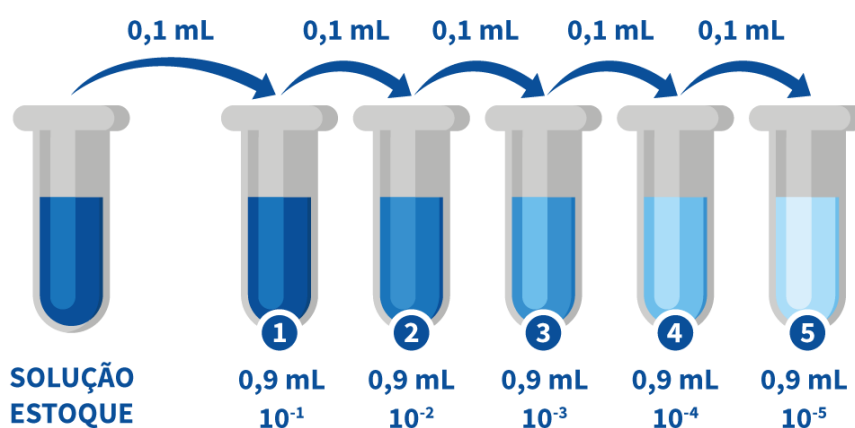
### 4.5.1 Correlação entre densidade óptica e UFC/mL e viabilidade usando o corante resazurina

O experimento em questão teve como objetivo estabelecer uma correspondência válida entre as densidades ópticas das suspensões bacterianas e seus respectivos valores de UFC/mL importantes nas etapas de padronização de inóculo. Para tanto, as bactérias, *S. marcescens*, *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *S. macrogoltabida*, *B. pumilus*, *Aciinetobacter* sp foram reativadas por meio da sementeira em placas contendo meio LB sólido (KASVI, Brasil), que foram incubadas a 37°C por 16h. Em seguida, 2 a 3 colônias foram transferidas para frascos do tipo Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de caldo Luria Bertani (LB) (KASVI, Brasil). Os frascos foram incubados por 16 h em shaker (Marconi, Brasil) sob agitação de 200 rpm e temperatura de 37°C.

Após a retirada dos frascos do agitador, mediu-se a densidade óptica da suspensão bacteriana, de modo a obter as densidades: 0,024; 0,05 e 0,165 a D.O.<sub>600nm</sub>. Posteriormente a isso, foi realizado o procedimento de aferição de UFC/ml.

Para tanto, inicialmente, foram alocados 900 µL de salina em sete micro tubos de 2mL, os quais foram numerados de 1 a 6. Em seguida, os micro tubos que continham as amostras das densidades ópticas testadas foram agitados com o objetivo de homogeneizar a alíquota, utilizando-se um vortex a 3000 rpm por 5 segundos. Posteriormente, 100 µL da amostra foram transferidos para o primeiro micro tubo numerado (**Figura 9**). Após essa etapa, o procedimento de homogeneização foi repetido e mais 100 µL da amostra foram transferidos para o segundo micro tubo enumerado. Esse processo foi repetido até o sexto micro tubo numerado.

**Figura 9** – Representação gráfica da metodologia de diluição seriada, no qual visa a diluição de uma amostra de forma exponencial.



fonte: <https://encurtador.com.br/exH78>

Para a realização do plaqueamento, uma placa de petri contendo 15 mL de TSA solidificado foi dividida em seis partes iguais. Em seguida, os frascos contendo as diluições seriadas foram agitados com o objetivo de homogeneizar a alíquota, com auxílio do vórtex modelo AG230 AT da fabricante INBRAS a 3000 rpm por 5 segundos, conforme descrito por GAO et al. (2015). Posteriormente, em regime de triplicata, três gotas de 10 µL cada de cada diluição foram alocadas nas divisões correspondentes a cada diluição. As placas de Petri foram incubadas em B.O.D. por 16 horas a 37°C,

seguindo o procedimento descrito por LIAO *et al.* (2015) e GUO *et al.* (2018). Após a incubação, realizou-se a contagem de bactérias e determinação de UFC/mL, conforme descrito por Amorim *et al.* (2017) e Maciel *et al.* (2016).

Para a aferição dos valores de viabilidade bacteriana, foi utilizado o método de medição de fluorescência através da adição de resazurina (0,1 g/L). Em uma placa de 96 poços, foram alocados 180  $\mu$ L de cada amostra correspondente aos valores de densidades óptica obtidos, em regime de quadruplicata. Após a adição das amostras, alíquotas de 20  $\mu$ L de solução de resazurina (0,1 g/L) foram adicionadas aos poços. Em seguida a adição de resazurina, a placa de 96 poços foi incubada a 37°C por 40 minutos e posteriormente analisadas em fluorímetro (Varioskan, ThermoFischer) com  $\lambda_{\text{excitação}}$ : 570 nm e  $\lambda_{\text{emissão}}$ : 600 nm. O método baseia-se na quantificação da fluorescência da resorufina (rosa), produto gerado na redução da resazurina (azul). Como controle, utilizou-se solução salina (0,06% NaCl) adicionada de resazurina nas mesmas proporções citadas e em quatro repetições. Os resultados obtidos foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

#### 4.6 Avaliação da atividade bacteriolítica com diferentes MOIs

O experimento de atividade bacteriolítica com diferentes multiplicidades de infecção (MOI) foi realizado a fim de definir as relações bactéria/ bacteriófago que resultem em maior decréscimo de crescimento bacteriano.

Nos ensaios, foram utilizadas as bactérias *S. marcescens* PLA5, hospedeira do fago B1, *S. maltophilia* 94, alvo do fago 12.1.2 e *P. aeruginosa* RLI17, hospedeira do fago: 18.1.4. Foi realizado também um teste com a adição das três bactérias mencionadas anteriormente juntamente com os três bacteriófagos indicados. Os testes foram feitos em placas de poliestireno de 96 poços não tratada (Kasvi, Brasil). Cada poço recebeu 100  $\mu$ L de caldo LB enriquecido com 0,1 mol/L de  $\text{MgSO}_4$  e 0,01 mol/L de  $\text{CaCl}_2$  adicionado de células bacterianas, numa concentração final de 0,024 (D.O.  $_{600\text{nm}}$ ) de cada suspensão bacteriana.

Os poços foram acrescentados de 100  $\mu$ L de fagos com diferentes títulos (UFP/mL), de modo que no volume final de 200  $\mu$ L fossem obtidos MOIs de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10. A placa foi incubada a 37 °C sob agitação de 100 rpm (Varioskan® Flash, Thermo Scientific, Finlândia) com leituras de D.O. $_{600\text{nm}}$  realizadas de 10 em 10

min após o início da incubação, durante 16 horas. O controle negativo do experimento continha somente caldo LB, sem adição de inóculo e fago, e o controle positivo, somente inóculo bacteriano sem fago.

#### **4.7 Avaliação da atividade bacteriolítica em água sintética**

O experimento teve como objetivo principal a avaliar a atividade do fago contra as células planctônicas em maior volume em águas com características composicionais semelhantes às águas das torres de resfriamento. Para tanto, frascos Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados de 50 mL de água sintética (contendo 250 mg/L de NaCl, 155,4 mg/L de CaCl<sub>2</sub>, 130,3 mg/L de KNO<sub>3</sub>, 215, 8 mg/L de MgCl<sub>2</sub> e 500 mg/L de extrato de levedura) foram inoculados com a bactéria hospedeira do fago em fase logarítmica de crescimento numa densidade ótica final de 0,024 (D.O<sub>600nm</sub>). Após reservados frascos para os controles (frascos contendo somente a bactéria), testou-se a MOI 0,001 a partir da inoculação de 1 mL dos diferentes fagos em título de 1x10<sup>8</sup> UFP/mL. Em seguida, medidas de D.O. a 600 nm foram realizadas nos tempos de 2h, 4h, 6h, 8h, 10h 12h e 24h e traçado o perfil cinético de lise bacteriana.

#### **4.8 Ensaio de infectividade em diferentes condições de pH**

O ensaio em questão visou estabelecer dados referentes aos possíveis perfis de lise bacteriana que os fagos poderiam apresentar em diferentes condições de pH. Com isso, será possível entender se os diferentes níveis de pH em um sistema de resfriamento industrial poderiam alterar a eficiência de controle bacteriano pelos fagos. Considerando que em sistema de resfriamento industrial, o pH pode variar de 6,5 a 8 (VEIGA (2013), testamos os pH 6,5 ;7 ;7,5, 8 e 8,5.

Para tanto, utilizamos uma solução de água sintética (250 mg/L de NaCl, 155,4 mg/L de CaCl<sub>2</sub>, 130,3 mg/L de KNO<sub>3</sub> e 215, 8 mg/L de MgCl<sub>2</sub>; 500 mg/L de extrato de levedura) adicionado de 0,1 mol/L de tampão SM (5,8g de NaCl, 2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 50mL de Tris-HCl 1mol/L pH 7,5; 5 ml de gelatina 2%; e H<sub>2</sub>O para 1000mL) e posteriormente o pH foi corrigido para os valores utilizados no teste, através da adição de uma solução de 0,1 mol/L de HCl ou 0,1 mol/L de NaOH .

Os microrganismos utilizados no teste foram os mesmos microrganismos utilizados no ítem 4.6 :*S. marcescens* PLA5 (fago: B1), *S. maltophilia* 94 (fago: 12.1.2), *P. aeruginosa* RLI17(fago: 18.1.4). A MOI 0,001 foi utilizada no experimento, pois

segundo os resultados, apresentou-se como a melhor MOI no teste com o qual houve a adição das três bactérias estudadas além dos seus respectivos fagos. Tal MOI também foi escolhida, pois foi a utilizada para conduzir os experimentos de reator de bancada.

O experimento foi realizado em uma placa de 96 poços. Cada poço foi preenchido com 180  $\mu\text{L}$  de uma suspensão bacteriana apresentando 0,024 (D.O.<sub>600nm</sub>) ( $10^8$  UFC/mL) em água sintética enriquecida com os relativos pH de teste (6,5;7;7,5;8 e 8,5). Posteriormente, foram acrescentados 20  $\mu\text{L}$  das suspensões dos bacteriófagos com um título conhecido (UFP/mL) a fim de estabelecer uma MOI de 0,001. A placa foi incubada a 37 °C sob agitação de 100 rpm (Varioskan® Flash, Thermo Scientific, Finlândia) com leituras de D.O.<sub>600nm</sub> realizadas de 10 em 10 minutos após o início da incubação até o tempo de 18 horas. O experimento foi realizado em quadruplicata técnica e o controle foi realizado adicionando apenas a suspensão bacteriana adicionada 20 $\mu\text{L}$  de tampão SM (pH=7).

#### **4.9 Ensaio de infectividade em diferentes condições de temperatura**

O ensaio em questão visou estabelecer dados referentes aos possíveis perfis bacteriológicos que os fagos poderiam apresentar em diferentes condições de temperatura. Com isso, foi possível entender se os diferentes níveis de temperatura em um sistema de resfriamento industrial poderiam alterar a eficiência de controle bacteriano pelos fagos.

Em um sistema de resfriamento industrial, a temperatura pode variar de 30°C a 60°C, segundo estudos de VEIGA (2013). Visando estabelecer uma relação de proximidade real com a condição supracitada, foram testadas as temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e 45°C. As temperaturas acima de 45°C não foram testadas pois a temperatura de 45°C era o limite máximo para incubação de experimentos no equipamento utilizado (Varioskan® Flash, Thermo Scientific, Finlândia).

Para tanto, utilizamos uma água sintética enriquecida apresentando as mesmas características dos ensaios que serão posteriormente apresentados no item 4.7. Tais águas sintéticas apresentaram a seguinte formulação: 250 mg/L de NaCl, 155,4 mg/L de CaCl<sub>2</sub>, 130,3 mg/L de KNO<sub>3</sub> e 215,8 mg/L de MgCl<sub>2</sub>; 500 mg/L de extrato de levedura.

Os microrganismos utilizados no teste foram os mesmos microrganismos utilizados no teste testes de MOI (item 4.6) (*S. marcescens* PLA5 (fago: B1), *S. maltophilia* 94 (fago: 12.1.2), *P. aeruginosa* RLI 17(fago: 18.1.4)). A MOI 0,001 foi utilizada no experimento, pois segundo os resultados, apresentou-se como a melhor MOI no teste com o qual houve a adição das três bactérias estudadas além dos seus respectivos fagos. Tal MOI também foi escolhida, pois foi a utilizada para conduzir os experimentos de reator de bancada

O experimento foi realizado em uma placa de 96 poços. Cada poço foi preenchido com 180  $\mu$ L de uma suspensão bacteriana apresentando 0,024 D.O.<sub>600nm</sub> ( $10^8$  UFC/mL) em água sintética enriquecida, apresentando o pH de 7. Posteriormente, foram acrescentados 20  $\mu$ L uma suspensão de bacteriófagos com um título conhecido (UFP/mL) a fim de estabelecer uma MOI de 0,001. As placas foram incubadas a temperaturas variáveis dependendo do experimento, podendo ser de 25°C, 30°C, 35°C ,40°C ou 45°C, sob agitação de 100 rpm (Varioskan® Flash, Thermo Scientific, Finlândia) com leituras de D.O.<sub>600nm</sub> realizadas de 10 em 10 minutos após o início da incubação, durante 18 horas. O experimento foi realizado em quadruplicata técnica e o controle foi realizado adicionando apenas a suspensão bacteriana adicionada 20 $\mu$ L de solução SM (pH=7).

#### **4.10 Purificação e caracterização morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

As suspensões de fagos de 30 mL a um título de  $10^{10}$  UFP/mL foram ultracentrifugadas a 28.000 g por 60 minutos a temperatura de 4 °C em centrífuga (Sorvall UltraPro80, rotorT880, Wilmington, USA) de ângulo fixo. Ressuspendeu-se o *pellet* em 30 mL de solução de acetato de amônio (0,1 mol/L, pH 7,0) e centrifugado novamente. Repetiu-se a centrifugação mais uma veze posteriormente, ressuspendeu-se o *pellet* em 2 mL da mesma solução de acetato de amônio. Em seguida, para verificar a eficácia do processo, a suspensão viral foi titulada usando a metodologia descrita no item 4.4. As amostras foram mantidas a 4 °C por 48 horas (Ackermann, 2009), até a análise da morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET), realizada no Centro de Microscopia da UFMG.

Para a análise, um volume de 10  $\mu$ L da amostra foi pipetada sobre um *grid* (200 *mesh*) previamente coberto com Formvar. Incubou-se o *grid* então, por 5 minutos em

temperatura ambiente retirando em seguida o líquido sobressalente com auxílio de papel de filtro. As amostras foram contrastadas por 20 segundos com acetato de uranila a 2 % e analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI – operando a 120 kV.

#### 4.11 Extração do DNA viral e avaliação da pureza

. Primeiramente, visando a concentração das partículas fágicas, 25 mL das suspensões dos fagos, provenientes da etapa de multiplicação foram tratados com 500 µL de uma solução de ZnCl<sub>2</sub> (2 mol/L). O conteúdo foi incubado a 37°C por 5 minutos e posteriormente centrifugado a 8500 x g por 10 minutos, sendo o precipitado obtido ressuspensão em 450µL de tampão SM (Adaptado de Santos et al., 1991).

Em uma segunda etapa visando remover o DNA e RNA bacteriano residual, o conteúdo ressuspensão foi adicionado de 50 µL de tampão da enzima DNase I (10x), 1 µL de DNase I (1 U/µL) e 1 µL RNase A (10 mg/mL) e, em seguida, incubado por 1,5 hora a 37°C em banho maria, sem agitação. Após esse tempo, foram adicionados 20 µL de EDTA (de 0,5 mol/L) para inativação das enzimas (JAKOČIŪNĚ et al., 2018).

Posteriormente, o conteúdo foi tratado com 1,25 µL de Proteinase K (20 mg/mL), e incubado por 1,5 horas a 56°C. Após o período de incubação, adicionou-se 200µL de solução de precipitação de proteína do kit Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit), seguido de homogeneização e incubação no gelo por 5 minutos.

Após centrifugação por 10 minutos a 14000 x g, o sobrenadante foi transferido para tubo contendo 600 µL de isopropanol e mantido por 20 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, uma nova centrifugação foi realizada na mesma condição anterior, mas dessa vez o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado gentilmente com 600 µL de etanol 70%. Após nova centrifugação (14000 x RPM por 10 minutos), o etanol foi aspirado e após o precipitado secar, ele foi gentilmente homogeneizado com 50 µL de solução de reidratação (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Estados Unidos).

O DNA extraído teve a sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% e foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher, Estados Unidos) por absorvância a 260 nm.

#### 4.12 Descrição do aparato experimental dos testes simulando sistemas de resfriamento industrial em escala de bancada

Os sistemas do presente estudo se caracterizam como biorreatores fechados de fluxo contínuo. Eles consistem em dois sistemas individuais de fluxo fechado, cada um com volume total de 5,77 L, acoplados com bombas recirculadoras, mangueiras, suporte de lâminas de vidro, (26mm x 76mm) (**Figura 10**) (para mensuração de biofilme) e reservatórios. Ambos os sistemas compartilham apenas o banho maria, que se mantém na temperatura de 40°C, porém o sistema em sí se mantém a 37 °C graças a perda de calor.

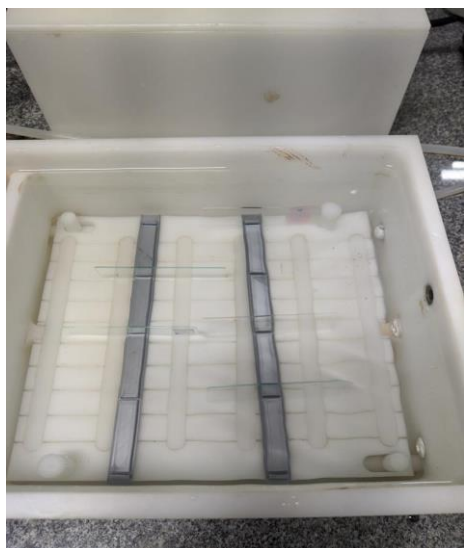
O funcionamento do reator ocorre em fluxo unidirecional com recirculação do efluente continuamente, do reservatório para o reator e novamente para o reservatório (**Figura 10**). A vazão do sistema foi estabelecida em 240 mL/min, a temperatura em 37°C, para equiparar as condições laboratoriais com as do sistema de resfriamento real.

Além disso, foram realizadas purgas nos experimentos a seguir. Tanto o volume quanto a periodicidade delas variaram de experimento em experimento, até que fosse encontrada a condição que resultasse na estabilidade das densidades bacterianas.

**Figura 10-** Equipamentos pertencentes ao sistema de resfriamento de bancada confeccionado pelo grupo de pesquisa, A) Suporte com lâminas de vidro alocados dentro dos reatores; B) Reatores utilizados no experimento.

A)

B)



Para início dos experimentos, foi realizada a limpeza mecânica dos reatores, bombas de recirculação, banho maria, lâminas de vidro e suporte de lâminas de vidro através da utilização de esponjas e sabão neutro. Após a limpeza inicial, as lâminas de vidro foram autoclavadas por 20 minutos a 121°C, enquanto o restante dos aparatos experimentais fora submerso em uma solução de 2% de hipoclorito de sódio por 24 horas. Após tal período, a solução de hipoclorito de sódio foi retirada e os equipamentos foram lavados com água destilada. Posteriormente à desinfecção, o experimento foi conduzido.

Objetivando simular águas de sistemas de resfriamento com presença de bactérias, os reatores foram inoculados com bactérias isoladas de um sistema de resfriamento industrial de uma refinaria de petróleo da Petrobrás (REGAP). Foram escolhidos os isolados: *S. marcescens* PLA5, *S. maltophilia* 94 e *P. aeruginosa* RLI 17. A escolha de tais microrganismos foi devido a resultados de estudos prévios relacionados ao sistema de resfriamento da REGAP, os quais apontam a ampla distribuição de tais bactérias nos sistemas de resfriamento. Além disso, as bactérias em questão apresentam macromorfologias distintas, característica importante para que se possa realizar a contagem de forma individualizada das colônias de bactérias planctônicas e sésseis pelos métodos de determinações das densidades expressas por UFC/mL ou UFC/cm<sup>2</sup>.

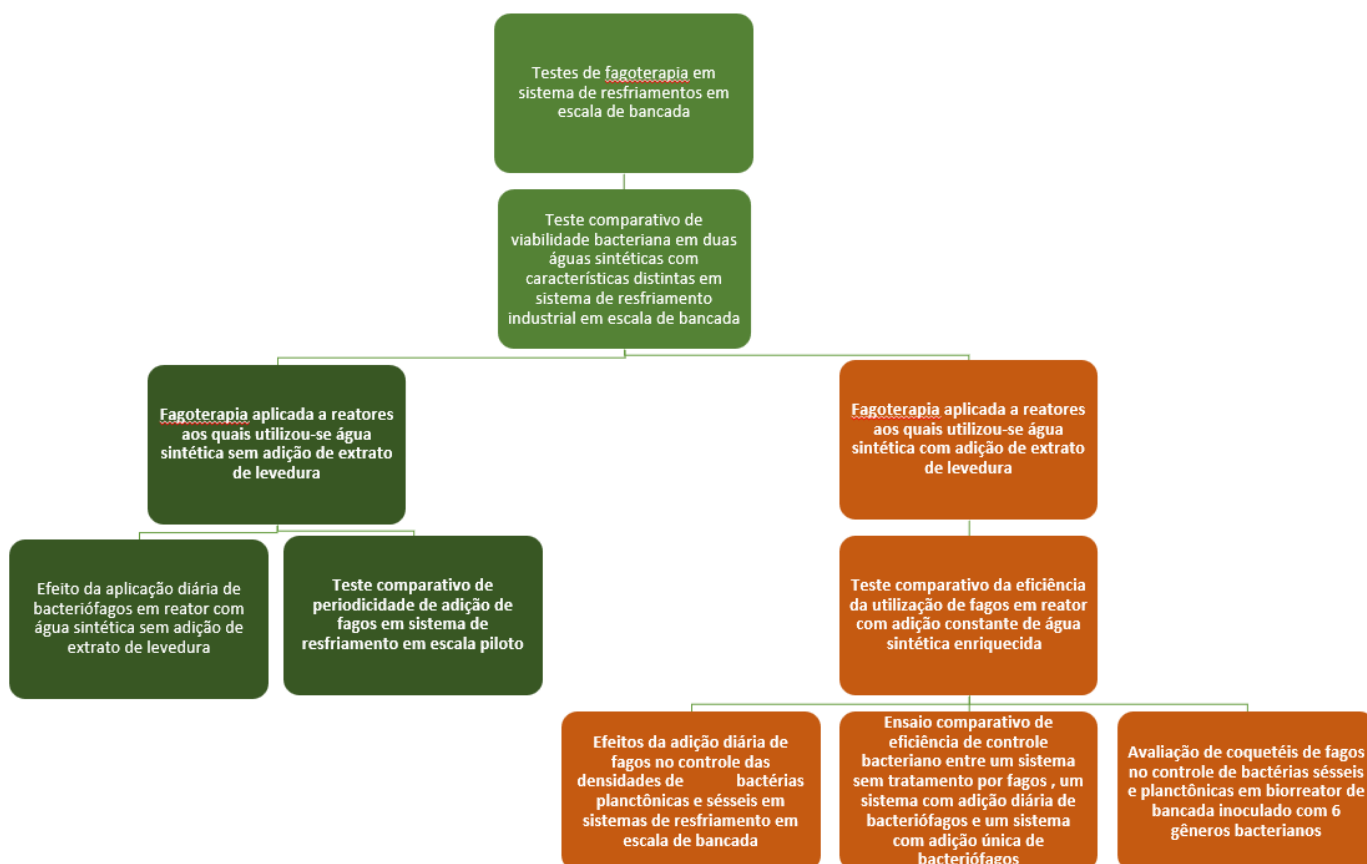
Para o preparo do inóculo, as bactérias *S. marcescens* PLA5, *S. maltophilia* 94 e *P. aeruginosa* RLI 17 reativadas por meio da semeadura em placas contendo meio LB sólido (Diffco, USA), que foram incubadas a 37°C por 16h. Em seguida, 2 a 3

colônias foram transferidas para frascos do tipo Erlenmeyer de 1L contendo 500 mL caldo Luria Bertani (LB) (Diffco, USA ). Os frascos foram incubados por 16 h em shaker (Marconi, Brasil) sob agitação de 200 rpm e temperatura de 37°C e avaliados quanto a densidade celular por meio da medida da D.O. a 600 nm. Os valores obtidos foram usados para determinação do volume a ser adicionado nos reatores para obter a densidade celular de interesse na água sintética (0,024).

O volume definido deste inóculo foi centrifugado por 40 minutos a 11.000 x *RPM* a 4°C para separar as células do meio de cultivo, de forma que apenas os *pellets* das células fossem adicionados aos reatores. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* bacteriano foi suspenso em 50mL da água sintética e adicionado nos reatores.

As águas sintéticas utilizadas nos experimentos a seguir apresentaram duas formulações. Em alguns experimentos utilizou-se água sintética sem enriquecimento com extrato de levedura. Já as águas sintéticas enriquecidas com extrato de levedura apresentaram a mesma composição da água sintética mencionado anteriormente, porém, com adição de 500 mg/L de extrato de levedura em sua composição. O fluxograma a seguir (**Figura 11**) demonstra a sequência de experimentos realizada pelo trabalho.

**Figura 11** - Fluxograma relativo aos experimentos realizados em reatores em escala de bancada durante a realização do trabalho



#### 4.12.1 Metodologias de monitoramento de parâmetros químicos e biológicos dos reatores

##### 4.12.1.1 Quantificação e Viabilidade de bactérias planctônicas pelo método de resazurina

Entre os dias 1 e 9 do experimento, foram retirados 1mL de cada reator com o auxílio de uma pipeta. Após centrifugação a 11.000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 1mL de solução PBS (NaCl 8,0 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g/L, e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L, pH 7,2).

Em seguida, 180 µL de cada amostra foram transferidos para poços de uma placa de 96 poços (em quadruplicata) e adicionadas de 20 µL de solução de resazurina (0,1 g/L). Posteriormente, a placa de 96 poços foi incubada a 37°C por 40 minutos no escuro e analisada em fluorímetro (Varioskan, ThermoFischer) com  $\lambda_{excitação}$ : 570 nm e  $\lambda_{emissão}$ : 600 nm. O método baseia-se na quantificação da

fluorescência da resorufina (rosa), produto gerado na redução da resazurina (azul). Como controle, utilizou-se solução PBS estéril adicionada de resazurina nas mesmas proporções citadas e em quatro repetições. Os resultados obtidos foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

#### **4.12.1.2 Análise quantitativa de bactérias plantônicas**

Para avaliar a densidade bacteriana planctônica, retirou-se um volume de 1 mL de cada reator através de uma pipeta. Posteriormente, o volume retirado do reator foi vertido em microtubo de volume máximo de 2mL. Em seguida, a amostra foi submetida ao procedimento de diluição seriada, seguido de plaqueamento, incubação da amostra e contagem de colônias para a determinação de UFC, seguindo a metodologia descrita no item 4.5.

#### **4.12.1.3 Análise quantitativa de bactérias sésseis**

Para avaliar a densidade de bactérias sésseis, foram usadas como corpo de prova lâminas de vidro (26 x 76 x 1 mm) esterilizadas por autoclavagem a 1 atm por 15 minutos (BROCK, 2019). As lâminas foram inseridas diariamente nos suportes e mantidas ali por 3 dias para que houvesse a formação de biofilme.

O biofilme foi desprendido das superfícies das lâminas por meio de raspagem com auxílio de uma alça de Drigalski estéril (VIEIRA et al., 2017). Em seguida, o material foi suspenso em 2 mL de tampão SM e agitado em um vórtex modelo AG230 AT da fabricante INBRAS durante 5 minutos a 300 rpm.

Posteriormente, 100µL do material suspenso foi diluído seguindo a metodologia de diluição seriada seguida ao plaqueamento das alíquotas utilizando a metodologia, descritas no item **Erro! Fonte de referência não encontrada**. As densidades foram expressas UFC/cm<sup>2</sup>, conforme a equação:

$$\text{UFC/cm}^2 = (\text{Número de colônias} \times \text{Fator de diluição}) / \text{Área total da lâmina}$$

Onde:

Número de colônias = x

Fator de Diluição = 100

Área total da lâmina = 4156 mm<sup>2</sup>

#### **4.12.1.4 Análise quantitativa de bacteriófagos planctônicos**

Com o objetivo de determinar o título de bacteriófagos planctônicos do sistema, foi retirado uma amostra de 5mL dos reatores que utilizaram a fagoterapia como controle bacteriano. Posteriormente a isso, o volume foi filtrado através de uma membrana de nitrocelulose com 0,22 µm de diâmetro de poro (Milipore, E.U.A.). Após isso utilizou-se a metodologia de titulação de bacteriófagos (item 4.4) para determinar a densidade de fagos da amostra filtrada.

#### **4.12.1.5 Avaliação da corrosão em corpo de provas por perda de massa**

Com a finalidade de avaliar a corrosividade do sistema, foram adicionados nos três sistemas em um novo suporte para cupons, alocado no reservatório do experimento três cupons de prova compostos por aço carbono AISI 1030. Os cupons foram adicionados no dia 1 do experimento e retirados no dia 22 do experimento nos três reatores em análise.

Cupons previamente limpos, secos, medidos e pesados, e ausente de possíveis marcas de gordura e de oxidação foram colocados nos reatores. Depois de 21 dias de operação do reator, os cupons foram retirados e secos em estufa na temperatura de 80 °C (± 5°C) por um período mínimo de 30 minutos. Em seguida, foram transferidos para dessecador e mantidos até atingimento de temperatura ambiente. Após isso, eles foram pesados em balança analítica, quantificando assim a "massa de deposição" (MI).

Após a quantificação da MI, o excesso de depósito dos corpos de prova foi retirado dos cupons sob água corrente com o auxílio de uma lã de aço ou esponja. Posteriormente tais cupons foram colocados em tubos de ensaio e cobertos com solução específica para cada material, conforme recomendações da Norma ASTM G1-03. Para aço carbono, preparou-se solução de 500 mL de ácido clorídrico (HCl, sp gr 1,19), 3,5 g de hexametileno tetramina, e água tipo II para fazer 1 litro da solução. Deixando o metal na solução por 10 minutos em temperatura ambiente (20 °C - 25 °C). Após descartar a solução decapante, foi colocada água potável nos tubos de ensaio contendo os corpos de prova, a fim de evitar a oxidação. Posteriormente os corpos de prova foram lavados em água corrente e secos com auxílio de papel absorvente e mantidos em estufa na temperatura de 80 °C (± 5 °C) por um período

mínimo de 30 minutos. Após resfriamento em dessecador à temperatura ambiente por 45 minutos, os corpos de prova foram pesados em balança analítica obtendo assim a "massa final" (MF). Para se obter os valores de perda de massa do cupom (W) foi usada a Equação 1:

$$W = MF - MI$$

Onde:

W = perda de massa do cupom (mg)

MF = massa do cupom após limpeza (mg)

MI = massa do cupom antes da limpeza (mg)

Tal procedimento foi repetido em 3 cupons não corroídos para metodologia de controle do experimento.

Após a mensuração da taxa de corrosão dos cupons, foi calculado o desvio padrão experimental, o qual é definido por Triola (1999) como sendo a medida da variação dos valores experimentais em relação à média, podendo este ser calculado pela Equação 2

$$S^2 = [\sum(X_i - X_m)^2 / (n - 1)]$$

Onde:

S = Desvio padrão;

X<sub>i</sub> = Valor experimental;

X<sub>m</sub> = média;

n = número de valores experimentais (cupons)

Para a verificação da homogeneidade dos valores, foi calculado o Coeficiente de Variação de Pearson (CVP), definido por Triola (1999) como sendo a razão entre o desvio padrão e a média. O CVP fornece uma estimativa da dispersão e variabilidade dos dados, sendo estes dados tão mais homogêneos quanto menor for o valor de CVP. O CVP pode ser calculado pela Equação 3:

$$CVP = \frac{S}{X_m} \times 100$$

Onde:

S = Desvio padrão;

$X_m$  = média;

Após a majoração das corrosões, ocorreu a classificação do grau de corrosão a partir da classificação proposta por Dantas (1988) e Machado (2004) segundo a **Tabela 5**.

**Tabela 5**- Metodologia de análise das previsões de vida em anos dos metais e os controles de corrosão através das taxas de corrosão em aço carbono.

Taxa de Corrosão em Aço Carbono		
Taxa (mpy)	Previsão de Vida (anos)	Controle Corrosão
0 a 2	Acima de 70	Excelente
2 a 5	De 28 a 70	Bom
5 a 8	De 17 a 28	Fraco
8 a 10	De 14 a 17	Pobre
Acima de 10	Abaixo de 14	Intolerável

#### 4.12.1.6 Análise por microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes presentes nas lâminas teste dos reatores

Com o objetivo de comprovar se os bacteriófagos estavam presentes nos biofilmes bacterianos localizados nos reatores de bancada, biofilmes presentes em lâminas de vidro de microscopia (25 x 75 x 1 mm) mantidas nos três reatores por um período de 7 dias foram removidos através da retirada do suporte das lâminas de dentro dos reatores. Em seguida, o material foi fixado usando solução de glutaraldeído (2,5%) em solução salina tamponada com cacodilato 0,1 mol/L (PBS; pH 7,0) durante 1,5 h. Após este período a solução fixadora foi retirada e realizada a lavagem com tampão cacodilato 0,1 mol/L.

As amostras foram então enviadas ao centro de microscopia eletrônica da UFMG, onde posteriormente foram fixadas com tetróxido de ósmio durante o período de 1h a temperatura ambiente (25°C). Após a segunda fixação, as amostras foram lavadas três vezes com tampão cacodilato 0,1 mol/L e imersas em ácido tânico a 0,1% durante 20 minutos. Em seguida o material foi seco utilizando CO<sub>2</sub> e colocados em suportes, onde foram metalizados com uma camada de ouro de 5 nm. As análises

foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (FEG Quanta 200 FEI).

#### **4.12.2 Teste comparativo de viabilidade bacteriana em duas águas sintéticas com características distintas em sistema de resfriamento industrial em escala de bancada**

O presente experimento tem por objetivo principal definir a melhor condição para o estabelecimento das bactérias no sistema, de forma a obter densidade constante ao longo do período experimental. Para tanto, foram adicionados no reator 1 a água sintética sem adição de extrato de levedura. Enquanto no reator 2, foi adicionado água sintética enriquecida com extrato de levedura.

Ademais, foi realizado duas purgas no sistema no volume de 55 mL nos dias 4 e 8 do experimento. A retirada da água sintética foi realizada nos dois reatores, nas mesmas profundidades e locais. As purgas tiveram o objetivo de aproximar o experimento à escala real.

Os reatores foram monitorados ao longo do período experimental quando a medida da densidade ótica a 600nm e viabilidade pelo método da resazurina.

#### **4.12.3 Fagoterapia aplicada a reatores aos quais utilizou-se água sintética sem adição de extrato de levedura**

Em todos os experimentos a seguir, foram utilizadas águas sintéticas sem adição de extrato de levedura, uma vez que se demonstrou no experimento anterior que houve uma maior estabilidade das densidades bacterianas no experimento ao qual foi utilizado tal água sintética.

Além disso, em todos os experimentos a seguir, avaliou-se a fagoterapia como uma alternativa de controle bacteriano. Foram utilizados os bacteriófagos B1: ativo contra *S. marcescens* PLA5; Bacteriófago 12.1.2: ativo contra *S. maltophilia* 94 e; Bacteriófago 18.1.4: ativo contra *P. aeruginosa* RLI 17.

##### **4.12.3.1 Teste comparativo de periodicidade de adição de fagos em sistema de resfriamento em escala piloto**

No reator 1 (R1), os fagos foram adicionados somente no dia 1 do experimento no título final no sistema de  $10^6$  UFP/mL de cada bacteriófago, enquanto o Reator 2, foram adicionados de mesmas doses de fagos no dia 1 e no dia 2. Tal experimento visou elucidar qual seria a melhor periodicidade de adição de bacteriófagos para o controle mais eficaz de bactérias planctônicas do sistema.

Ademais, a partir dos resultados do experimento anterior, verificou-se que seria necessária a purga em maiores frequências, a fim de estabelecer a estabilidade da densidade bacteriana no sistema. Portanto, foi realizado duas purgas no sistema no volume de 310mL nos dias 2 e 5 do experimento. A retirada da água sintética foi realizada nos dois reatores, nas mesmas profundidades e locais, seguida da adição de mesm volume de água sintética retirado. As purgas tiveram o objetivo de tentar aproximar o experimento a escala real. O monitoramento das condições biológicas do experimento foi feito através da medida diária da densidade celular expressa em UFC/mL.

#### **4.12.3.2 Efeito da aplicação diária de bacteriófagos em reator com água sintética sem adição de extrato de levedura**

A partir dos resultados do experimento anterior, o presente experimento teve como objetivo testar a adição de fagos em maior frequência. Além disso, segundo os dados obtidos no experimento 4.12.3.1, foi verificado que a densidade bacteriana não se manteve estável. Portanto, foi adotado um regime de purga diário com o objetivo de fornecer maior quantidade de nutrientes para a manutenção das densidades bacterianas.

No presente experimento, utilizou-se o mesmo aparato experimental anterior. Além disso, a formulação das águas sintéticas também se manteve, assim como as espécies bacterianas e bacteriófagos. No presente experimento, somente um reator foi tratado com bacteriófagos (Reator 2), enquanto o outro reator (Reator 1) não apresentou qualquer tratamento antibacteriano. Foi adicionado diariamente ao reator 2 a partir do dia 1, uma suspensão de fagos de modo a atingir a concentração final de  $10^6$  UFP/mL no sistema. Tal metodologia foi adotada a fim de estabelecer uma análise comparativa a respeito de se há controle bacteriano pelos bacteriófagos.

Para tanto, o monitoramento das condições biológicas do experimento foi feito através da determinação de UFC/mL (regime diário de análise), UFC/cm<sup>2</sup>

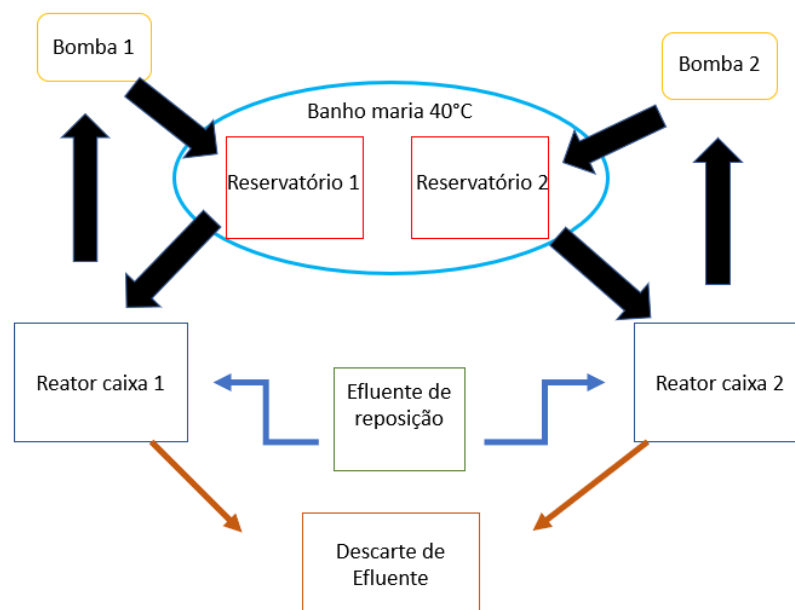
(amostragem a partir do dia 3), UFP/mL (análise a partir do dia 3) e ensaio de viabilidade celular (análise diária) (item 4.12).

#### 4.12.4 Fagoterapia aplicada a reatores aos quais utilizou-se água sintética com adição de extrato de levedura

A partir dos resultados dos experimentos anteriores, foram utilizadas águas sintéticas enriquecidas com extrato de levedura na concentração de 500mg/L, com o objetivo de obter uma maior estabilidade na densidade bacteriana durante todo o experimento.

Além disso, foi adicionado a cada sistema, uma bomba dosadora que permitiu a adição constante de água sintética, como acontece em um sistema de resfriamento convencional. Tais bombas aportaram uma vazão de 38,4 mL/h de água sintética para cada reator. Com a objetivo da conservação do volume inicial nos reatores, houve descarte simultâneo de água sintéticas de 38,4 mL/h, simulando as purgas de sistema de resfriamento real (**Figura 12**).

**Figura 12-** Fluxograma simplificado da circulação de água (representado pelas setas) e dos componentes do reator de bancada, tais quais, as bombas, reatores, banho maria e reservatórios.



#### **4.12.4.1 Teste comparativo da eficiência da utilização de fagos em reator com adição constante de água sintética enriquecida**

Como os experimentos anteriores, no presente experimento inicialmente foi utilizado a água sintética não enriquecida. Porém a partir do segundo dia de ensaio, observou-se que houve decréscimo significativo da densidade bacteriana em ambos os reatores. Portanto, foi adicionado no sistema através das bombas dosadoras água sintética enriquecida com 500 mg/L de extrato de levedura.

Somente um reator foi tratado com bacteriófagos (Reator 2), enquanto o outro reator (Reator 1) não apresentou qualquer tratamento antibacteriano. A aplicação de fagos no reator 2 ocorreu diariamente, adicionando um volume que variou entre 50µL a 5mL de cada espécie escolhida no título de  $1 \times 10^{11}$  UFP/mL no qual a concentração final de partículas virais no efluente do reator se mantivesse em  $1 \times 10^6$  UFP/mL no início do experimento e fosse aumentando paulatinamente até  $1 \times 10^8$  UFP/mL. Tal metodologia foi adotada a fim de estabelecer uma análise comparativa a respeito de se há controle bacteriano pelos bacteriófagos.

Os reatores foram monitorados diariamente quanto ao título de fagos, além do monitoramento diário das densidades de bactérias planctônicas e sésseis.

#### **4.12.4.2 Efeitos da adição diária de fagos no controle das densidades de bactérias planctônicas e sésseis em sistemas de resfriamento em escala de bancada**

A partir dos resultados do experimento anterior (4.12.4.1), adotou-se para a realização deste e dos demais experimentos envolvendo os reatores que simulam os sistemas de resfriamento industrial a seguir, águas sintéticas enriquecidas com extrato de levedura.

Os reatores foram monitorados diariamente quanto ao título de fagos, além do monitoramento diário das densidades de bactérias planctônicas e sésseis.

#### **4.12.4.3 Ensaio comparativo de eficiência de controle bacteriano entre um sistema sem tratamento por fagos, um sistema com adição diária de bacteriófagos e um sistema com adição única de bacteriófagos**

O presente experimento teve como objetivo analisar a dinâmica comparativa de crescimento bacteriano em diferentes condições, sendo elas: um reator controle (sem tratamento antibacteriano), um reator com adição de bacteriófagos somente no dia 1 (Reator 1) e um reator com adição de bacteriófagos desde o dia 1 até o final do experimento (Reator 2). No entanto, devido à limitação de recursos para operar simultaneamente três reatores, foi realizada a etapa de fagoterapia primeiramente, onde os dois reatores foram operados simultaneamente. Após a conclusão do experimento, os equipamentos foram desinfetados e a operação do reator controle foi iniciada, sem a adição de bacteriófagos.

As únicas diferenças do experimento anterior para o presente experimento foram a diferença de periodicidade de adição dos fagos, além do monitoramento das condições de pH e ORP e avaliação da taxa de corrosão. Com o objetivo de elucidar se os bacteriófagos também estão presentes nos biofilmes bacterianos do sistema, foi realizado uma microscopia de varredura de lâminas de vidro mantidas nos três reatores.

#### **4.12.4.4 Avaliação de coquetéis de fagos no controle de bactérias sésseis e planctônicas em biorreator de bancada inoculado com 6 gêneros bacterianos**

Com o objetivo de aproximar ainda mais o experimento às condições reais relativas à composição bacteriana no sistema, além das três bactérias e fagos utilizados nos ensaios anteriores (*S. marcescens* PLA5 e fago B1, *S. maltophilia* 94 e fago 12.1.2 e *P. aeruginosa* RLI 17 e fago: 18.1.4), foram adicionadas a estes ensaios três outras bactérias e três outros fagos isolados. A escolha das novas bactérias baseou-se no fato de serem de gêneros frequentes nos ambientes de refinarias de Petróleo e de serem alvos de fagos isolados do mesmo ambiente. Os novos fagos e as respectivas novas bactérias alvo foram: bactéria *S. macrogoltabida* M199 fago: RLI17 P2; fago: PLA5 12.2.2 e bactéria alvo *B. pumilus*; e fago PLA5 12.3.3 e bactéria alvo *Acinetobacter* sp.

O experimento utilizou o mesmo aparato experimental descrito no item 4.12.4, apesar de utilizar mais espécies bacterianas e bacteriófagas. Para o monitoramento do sistema, foram avaliados a densidade bacteriana sésil e planctônica e densidade bacteriófaga diariamente.

#### 4.13 Análises estatísticas

Os resultados dos experimentos da avaliação do uso de fagos para controle microbiano a partir dos testes de MOI (item 4.6), além do teste de infectividade em diferentes pH e temperaturas (itens 4.8 e 4.9), foram analisados utilizando o *Software S/Var*. Primeiramente, foi avaliado se os dados obtidos seguiram distribuição normal por meio do teste *Shapiro-Wilk* ( $\alpha=5\%$ ). Posteriormente, para resultados que apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste ANOVA para comparação das medianas dos resultados obtidos ( $\alpha=5\%$ ). Além disso, também se analisou estatisticamente se as condições testadas de MOI, pH e temperatura presente nos experimentos mencionados influenciaram nos resultados obtidos.

Além das análises de variâncias mencionadas, também foram conduzidas análises de correlação através do teste de correlação de Pearson nos experimentos de correlação de densidade óptica e UFC/mL(item 5.2).

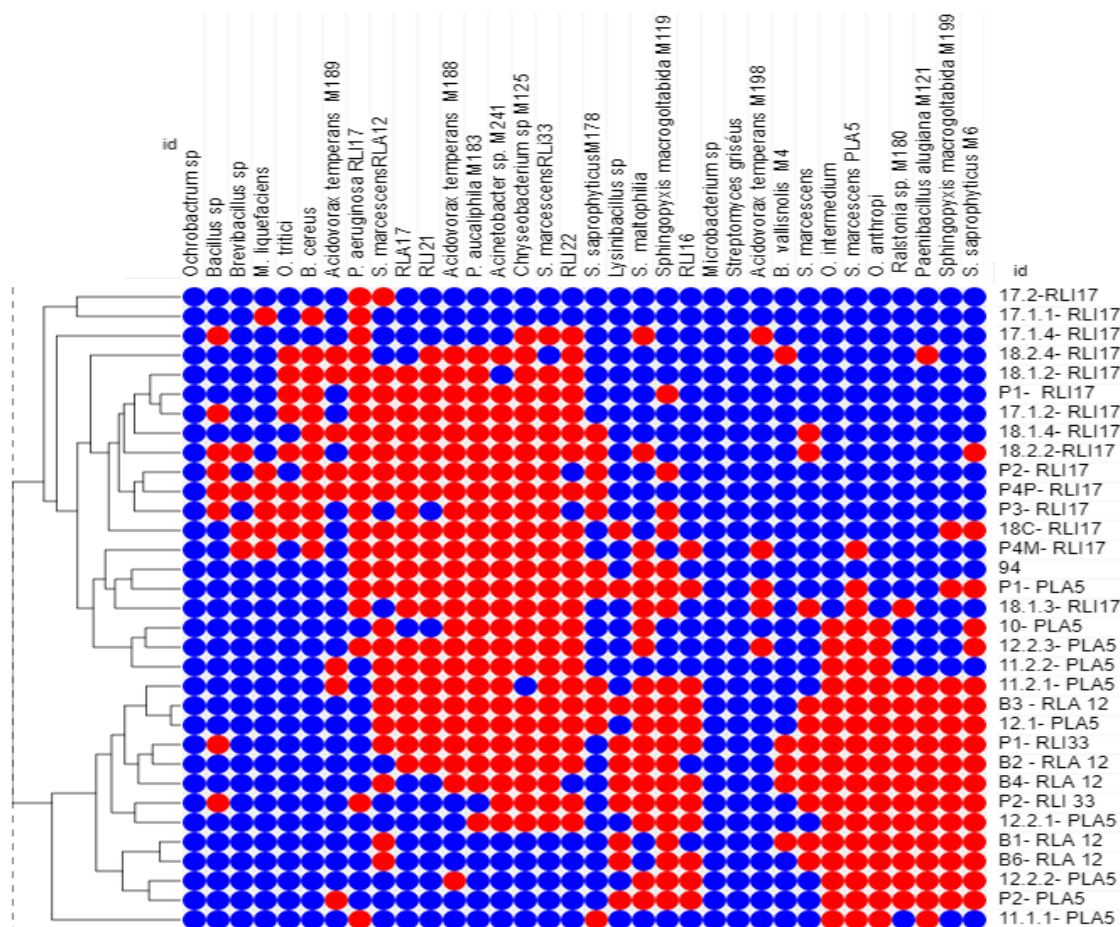
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Espectro de hospedeiro

No teste, foram avaliados quinze gêneros bacterianos (*Acidovorax*; *Acinetobacter*; *Bacillus*; *Brevibacillus*; *Lysinibacillus*; *Mycobacterium*; *Ochrobactrum*; *Paenibacillus*; *Pseudomonas*; *Chryseobacterium*; *Ralstonia*; *Staphylococcus*; *Serratia*; *Sphingopyxis*; *Streptomyces*) representados por trinta e quatro isolados bacterianos e trinta e três fagos. Dentre todos os gêneros bacterianos analisados, somente *Mycobacterium*, *Ochrobactrum* e *Streptomyces* não foram afetados pela atividade lítica por nenhum dos bacteriófagos. O padrão de lise foi variado para os diferentes fagos testados. De modo geral, os bacteriófagos foram capazes de lisar pelo menos dois gêneros bacterianos. Além disso, trinta e um bacteriófagos lisaram mais de quatro gêneros bacterianos, destacando-se o fago P4P, que lisou bactérias de 9 gêneros diferentes e o fago B3 que foi ativo contra quinze gêneros.

O agrupamento dos bacteriófagos com base em seu espectro de hospedeiro usando o software *Morpheus* (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>, (Broad Institute) resultou na formação de 9 subgrupos (Figura 13). De maneira geral, os bacteriófagos isolados das mesmas espécies bacterianas foram agrupados nos mesmos subgrupos, como os fagos 17.2 e 17.1.1 (*P. aeruginosa*), e os fagos 12.2.3 e 10 (*S. marcescens*). Porém, houve também o agrupamento de fagos isolados a partir de diferentes espécies em um mesmo subgrupo, como por exemplo os fagos 94 e P1 (*S. maltophilia* e *P. aeruginosa*), P1 e 18.1.3 (*S. maltophilia* e *P. aeruginosa*). Além disso, os resultados também apontaram que também houve o agrupamento em um mesmo subgrupo para fagos isolados de locais diferentes, como os fagos 12.2.2 e P2 (*S. marcescens*). Segundo os resultados apresentados, é possível inferir que os bacteriófagos presentes no estudo possibilitam uma cobertura quase completa em relação ao controle dos gêneros testados.

Figura 13- Representação em gráfico de dispersão relativa ao ensaio de espectro de hospedeiros utilizando os trinta e três bacteriófagos isolados e as trinta e quatro espécies bacterianas.



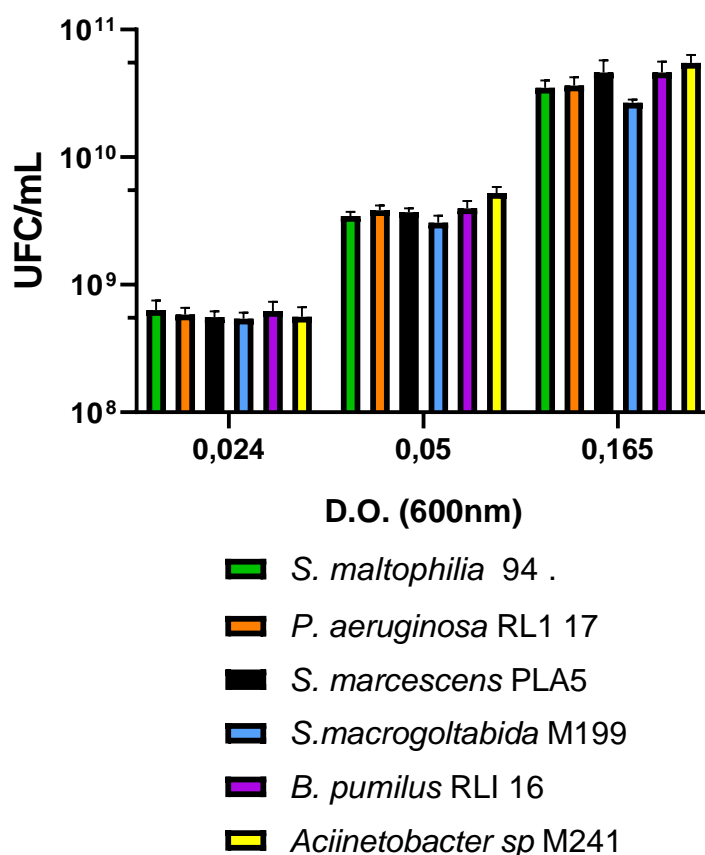
**Azul:** bacteriófago não apresentou atividade lítica sobre a bactéria; **Vermelho:** Bacteriófago apresentou atividade lítica sobre a bactéria

## 5.2 Correlação entre densidade óptica e UFC/mL

O experimento em questão teve como foco principal, a tentativa de estabelecimento de correlações entre de densidades ópticas e UFC/mL entre as bactérias escolhidas através dos testes anteriores. Com base nos resultados do experimento, foi observado que as bactérias utilizadas nos sistemas de resfriamento em escala piloto (*S. marcescens*, *S. maltophilia*, *S. macrogoltabida*, *B. pumilus*, *Acinetobacter sp* e *P. aeruginosa*) apresentaram semelhança na relação entre densidade óptica (600 nm) e densidade celular expressa em UFC/mL.

As suspensões com densidade óptica correspondente a 0,024 (D.O.<sub>600nm</sub>) apresentaram densidades expressas em UFC/mL variando de  $3,2 \times 10^8$  a  $6,3 \times 10^8$ . Além disso, segundo o **Gráfico 1** é possível observar que os valores de  $r^2$  de todas as relações entre bactérias e densidade ópticas ficaram entre 0,9 e 0,99.

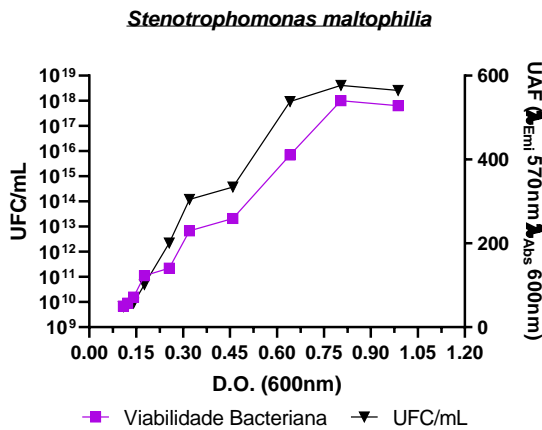
**Gráfico 1-** Teste de determinação das UFC/mL correspondentes aos valores de densidade optica :0024; 0,05; 0,165 entre as bactérias *S. marcescens*, *S. maltophilia*, *S. macrogoltabida*, *B. pumilus*, *Aciinetobacter sp* e *P. aeruginosa*



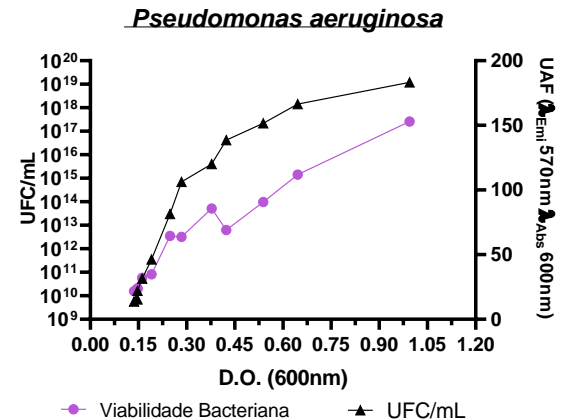
A **Figura 14** mostra a relação entre os valores de densidade celular expressa em unidades de D.O<sub>600nm</sub>, e em UFC/mL e viabilidade celular avaliada pelo método da resazurina (UAF) de três bactérias (*S. marcescens*, *S. maltophilia* e *P. aeruginosa*) analisadas. A escolha de tais bactérias para o presente experimento se deu em razão de que tais microorganismos serão utilizados nos testes envolvendo sistemas de resfriamento em escala de bancada.

**Figura 14** – Resultados referentes às relações entre os valores de densidade bacteriana (UFC/mL), densidade óptica (D.O<sub>600NM</sub>) e viabilidade bacteriana (UAF) das bactérias *S. maltophilia* (A); *P. aeruginosa* (B) e *S. marcescens* PLA5 (C).

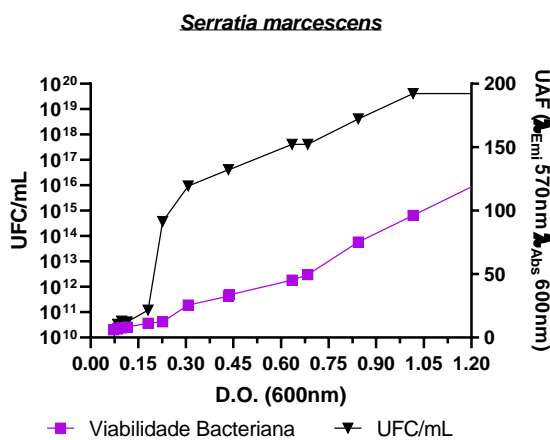
A)



B)



C)



A análise de correlação de Pearson dos dados mostrou que de modo geral, as correlações foram altas e positivas ( $p < 0,05$ ) e significativa entre os dados de

densidade óptica, UFC/mL, e viabilidade celular (Tabela 6, 7 e 8). Tal resultado indica que as metodologias de viabilidade celular pelo método de resazurina e mensuração de densidades ópticas podem ser utilizados como parâmetros de monitoramento das densidades bacterianas, nos experimentos seguintes.

**Tabela 6-** Coeficientes de correlação de Pearson sobre os parâmetros Densidade óptica, viabilidade celular e densidade bacteriana da bactéria *S. maltophilia*.

	Densidade óptica (D.O. <sub>600nm</sub> )	Viabilidade Celular	Densidade Bacteriana (UFC/mL)
Densidade óptica (D.O. <sub>600nm</sub> )		0,983 ( $p=3,55 \times 10^{-7}$ )*	0,841 ( $p=0,002$ )*
Viabilidade Celular	0,983 ( $p=3,55 \times 10^{-7}$ )*		0,867 ( $p=0,001$ )*
Densidade Bacteriana (UFC/mL)	0,841 ( $p=0,002$ )*	0,867 ( $p=0,001$ )*	

\* $p < 0,05$

**Tabela 7 -** Coeficientes de correlação de Pearson sobre os parâmetros Densidade óptica, viabilidade celular e densidade bacteriana da bactéria *S. marcescens*

	Densidade óptica (D.O. <sub>600nm</sub> )	Viabilidade Celular	Densidade Bacteriana (UFC/mL)
Densidade óptica (D.O. <sub>600nm</sub> )	1 ( $p=0,00$ )*	0,987 ( $p=4,28 \times 10^{-11}$ )*	0,810 ( $p=4,35 \times 10^{-4}$ )*
Viabilidade Celular	0,987 ( $p=4,28 \times 10^{-11}$ )*	1 ( $p=0,00$ )*	0,865 ( $p=6,46 \times 10^{-5}$ )*
Densidade Bacteriana (UFC/mL)	0,810 ( $p=4,35 \times 10^{-4}$ )*	0,865 ( $p=6,46 \times 10^{-5}$ )*	1 ( $p=0,00$ )*

\* $p < 0,05$

**Tabela 8-** Coeficientes de correlação de Pearson sobre os parâmetros Densidade óptica, viabilidade celular e densidade bacteriana da bactéria *P. aeruginosa*

	Densidade óptica (D.O. <sub>600nm</sub> )	Viabilidade Celular	Densidade Bacteriana (UFC/mL)
Densidade óptica (D.O. <sub>600nm</sub> )	1 ( $p=0,00$ )*	0,969 ( $p=1,9 \times 10^{-7}$ )*	0,819 ( $p=0,011$ )*
Viabilidade Celular	0,969 ( $p=1,9 \times 10^{-7}$ )*	1 ( $p=0,00$ )*	0,734 ( $p=0,065$ )*
Densidade Bacteriana (UFC/mL)	0,819 ( $p=0,011$ )*	0,734 ( $p=0,0065$ )*	1 ( $p=0,00$ )*

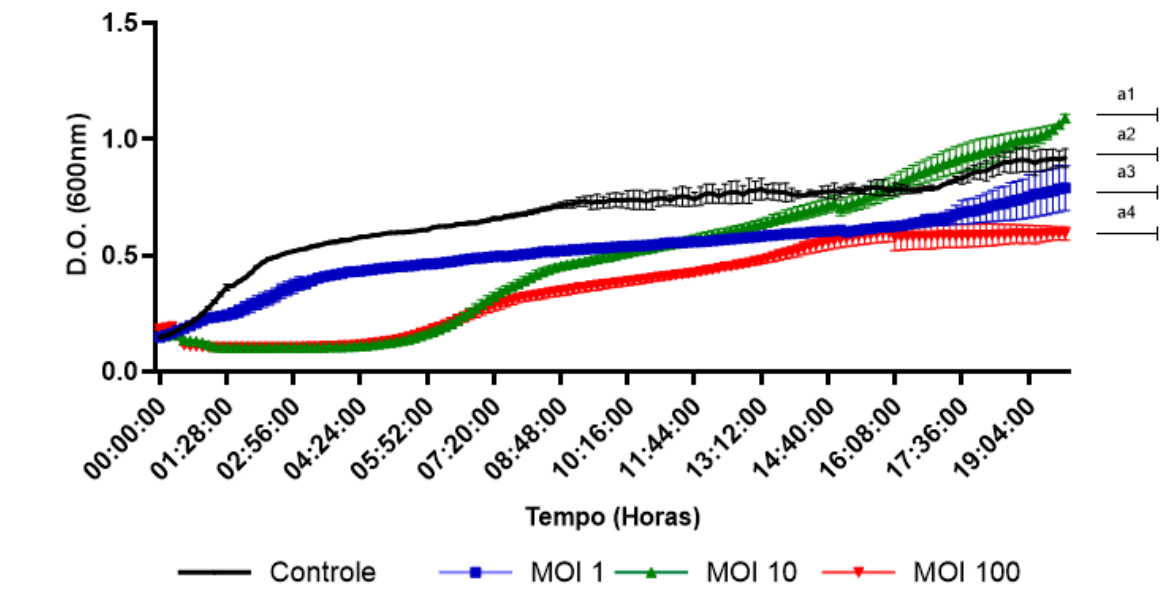
### 5.3 Avaliação da atividade bacteriolítica com diferentes MOIs

A partir dos testes de espectro de hospedeiro, observou-se que as bactérias *S. maltophilia*, *S. marcescens* e *P. aeruginosa* apresentavam baixo perfil de crescimento em meio sólido (evidenciado pela presença de placas de lise límpidas) quando na presença dos fagos 18.1.4, 12.1.2 e B1. Portanto, tal experimento visou estabelecer se tal controle bacteriano se mantém em meio líquido e qual a melhor Multiplicidade de infecção (MOI).

A partir dos resultados apresentados na **Figura 26**, foi observado efeito significativo da adição dos fagos 18.1.4, 12.1.2 e B1 em diferentes MOI ( $p<0,001$ ) na redução da densidade das bactérias *S. maltophilia*, *S. marcescens* e *P. aeruginosa*. Os decréscimos na densidade óptica variaram com a espécie e bacteriófagos utilizados. Nos ensaios com *S. maltophilia* (**Figura 26 b**), a infecção com o fago 12.1.2 na MOI 1 levou a uma redução máxima na densidade bacteriana de cerca de 30% em comparação com o controle. Já os experimentos aos quais testou-se as MOI 10 e MOI 100, as reduções máximas na densidade bacteriana foram de cerca de 81% ( $p<0,05$ ) quando comparados com o experimento sem tratamento com fagos.

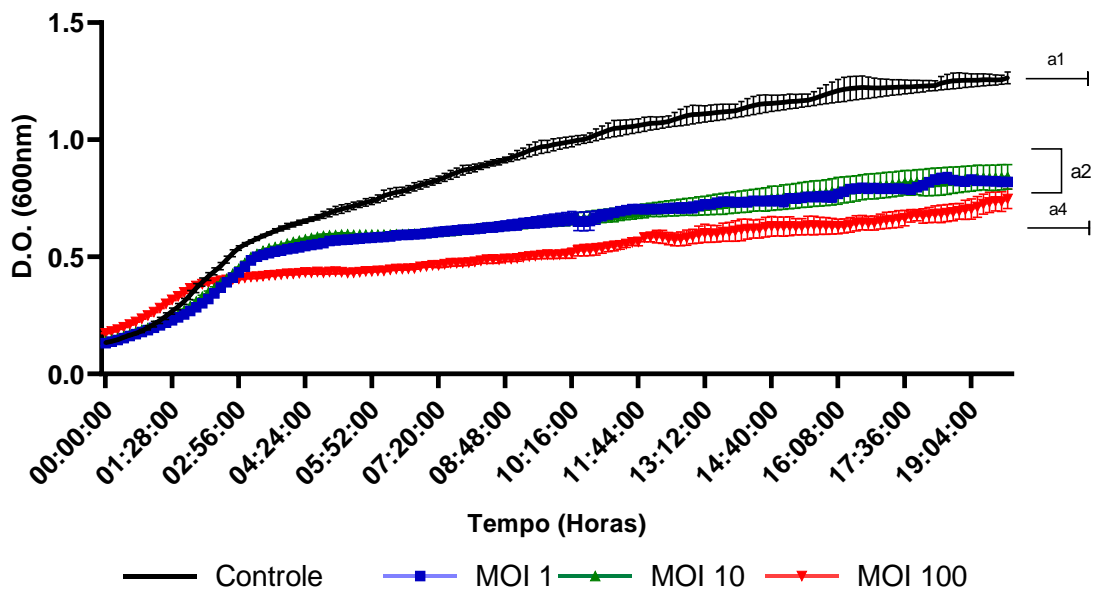
**Figura 15** Resultados referentes aos padrões de crescimento da densidade óptica bacteriana em meio líquido quando submetida a concentrações distintas de bacteriófagos (Diferentes MOI) (a) *S. maltophilia* 94 e o fago 12.1.2. (b) *S. marcescens* PLA5 e o fago B1 e (c) *P. aeruginosa* RLI 17 e o fago 18.1.4. d) *S. maltophilia* 94, *S. marcescens* PLA5, *P. aeruginosa* RLI 17 e os fagos 12.1.2, B1 e 18.1.4.

a)

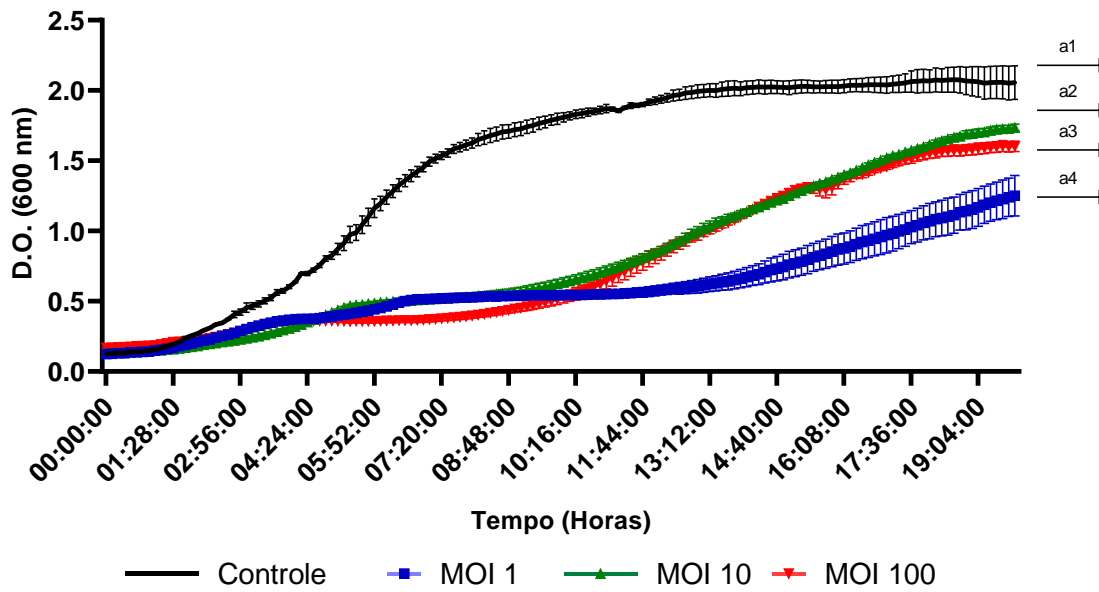


co

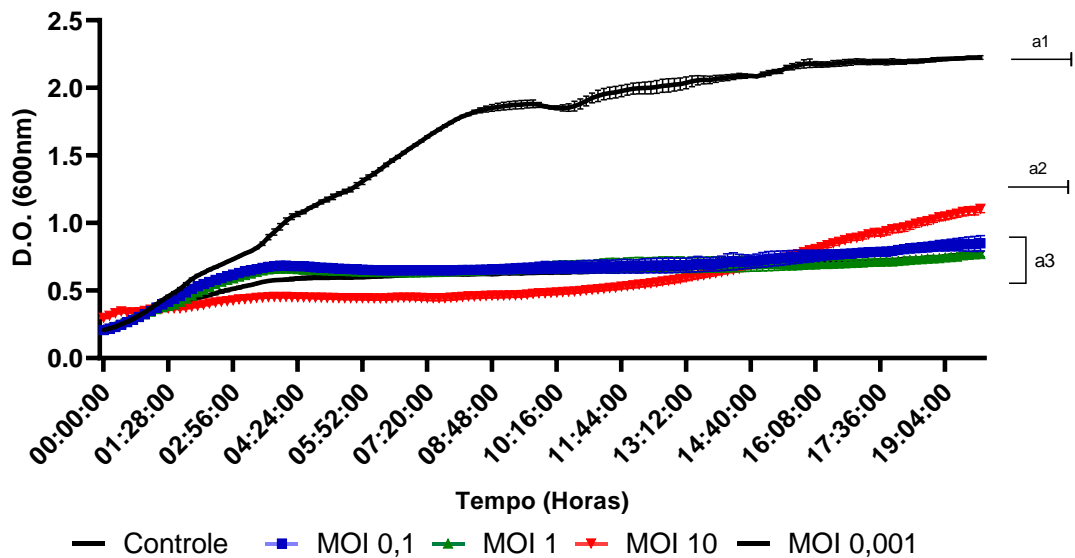
b)



c)



d)



Nos testes com *S. marcescens* PLA5 infectada com o fago B1 ( **Figura 26 b** ), os percentuais de reduções das densidades bacterianas em relação ao experimento controle (sem adição de fago) aumentaram de forma significativa com o aumento da MOI ( $p < 0,05$ ) usada na infecção. O experimento ao qual testou-se a MOI 100 apresentou redução máxima de densidade óptica de cerca de 41% quando comparado ao controle. Já o teste ao qual utilizou-se a MOI 10 apresentou redução máxima de 35% e o teste ao qual utilizou-se a MOI 1 obteve-se redução máxima de

33%. Além disso, pode-se observar que os efeitos das MOI 1 e 10 não foram estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ). A infecção de *P. aeruginosa* RLI 17 com o fago 18.1.4 em diferentes MOI influenciou significativamente ( $p < 0,001$ ) o crescimento expresso pela medida da densidade ótica (

**Figura 15 c).** Em todas as multiplicidades de infecção analisadas, houve o decaimento do crescimento bacteriano. A redução máxima correspondeu a cerca de 65,5 % nos testes com MOI 1 e MOI 10 e de 75 % no teste com MOI 100.

Por sua vez, nos experimentos ao qual utilizou-se os três fagos nas MOI 1, 0,1 e 0,001 conjuntamente as três bactérias hospedeiras, *S. marcescens* PLA5 (fago: B1), *S. maltophilia* 94 (fago: 12.1.2), *P. aeruginosa* RLI17 (fago: 18.1.4)), houve reduções máximas da densidade bacteriana em cerca de 65%.

#### **5.4 Avaliação da atividade bacteriolítica em água sintética**

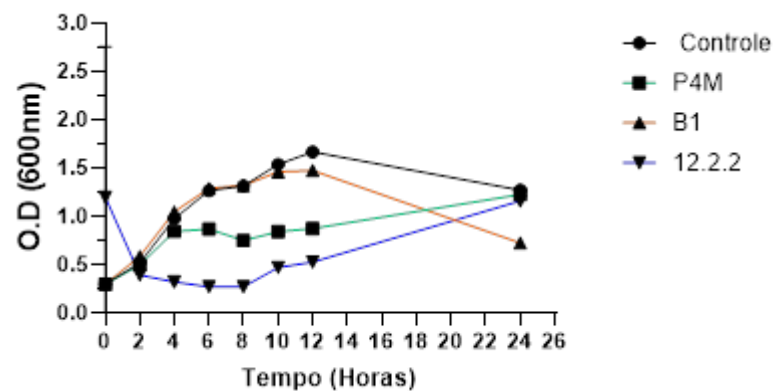
A partir dos ensaios de espectro de hospedeiro, buscou-se selecionar os isolados bacterianos alvos dos fagos. Dentre as doze bactérias selecionadas, somente *S. saprophyticus* não apresentou decaimento do crescimento nos tempos analisados, quando comparado ao controle. Porém, todas as outras onze bactérias apresentaram lise celular tendo como medida indireta a diminuição da densidade ótica no experimento quando infectadas com os fagos em estudo (Figura 16).

Os ensaios relativos às bactérias *S. macrogoltabida*, *Bacillus sp.*; *B. pumilus*; *Ralstonia sp.*; *A. temperans* e *S. maltophilia* 94 apresentaram aumento de densidade ótica após cerca de dez horas do início de tratamento com as diversas espécies de bacteriófagos, porém os valores finais de densidade ótica dos experimentos tratados com fagos se mantiveram menores quando comparados ao experimento controle (Figura 12 a, c,d,e,f,g).

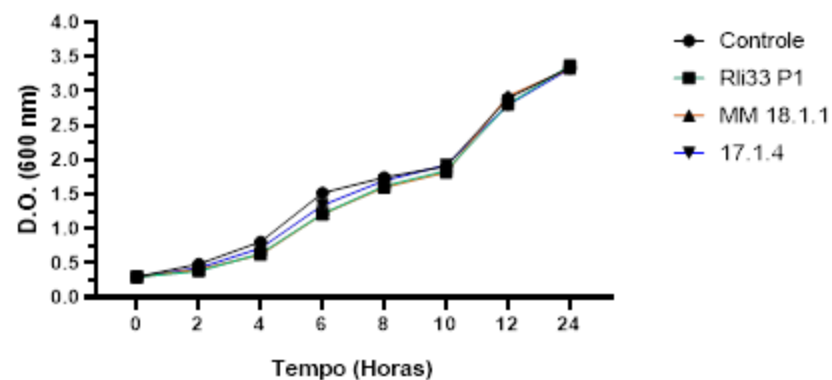
Já os ensaios relativos às bactérias *Acinetobacter sp.*, *S. marcescens* PLA5, *P. aeruginosa* RLI 17 e *P. acauliphila* apresentaram diminuição de densidade ótica constante ao decorrer do tempo (Figura 12 h, i, j,l).

**Figura 16** – Resultados dos monitoramentos das densidades ópticas durante os tempos os períodos de 24 horas, evidenciado o de crésicmo de tais densidades a partir da de atividade dos bacteriófagos analisados. A) *S. macrogoitabida*; B) *S. saprophyticus*; C) *Bacillus* sp; D) *B. pumilus*; E) *Raltonia* sp.; F) *A. temperans*; G) *Acinetobacter* sp; H) *S.maltophilia*; I) *S.marcescens*; J) *P. aeruginosa*; K) *P. alcaliphila*; L) *Chryseobacterium* sp

A)

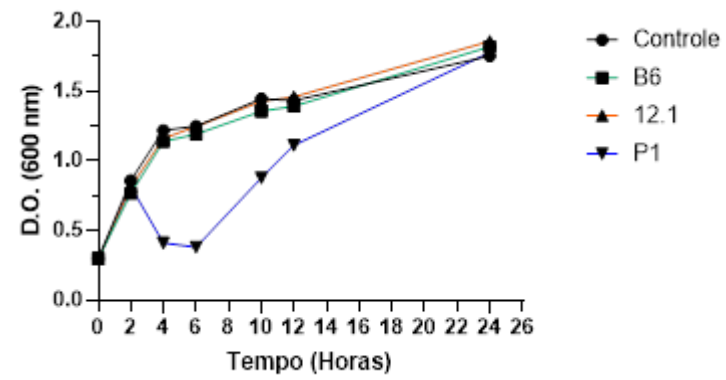
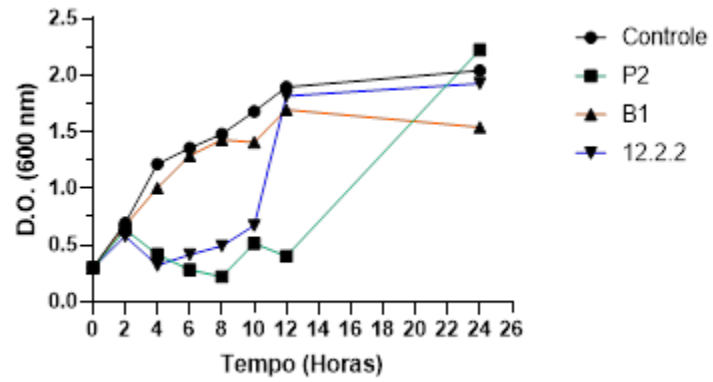


B)

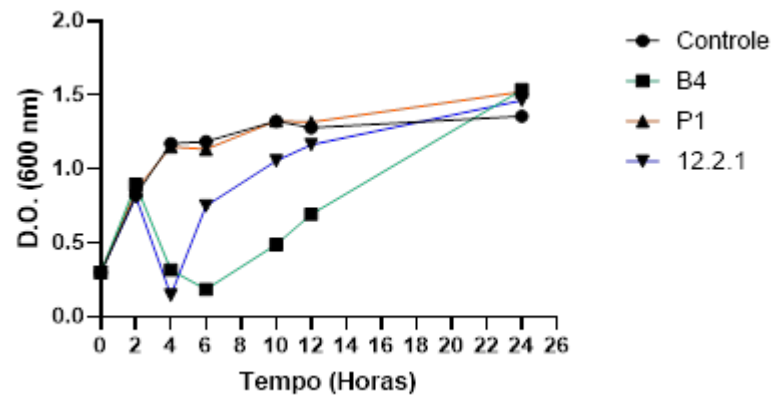


C)

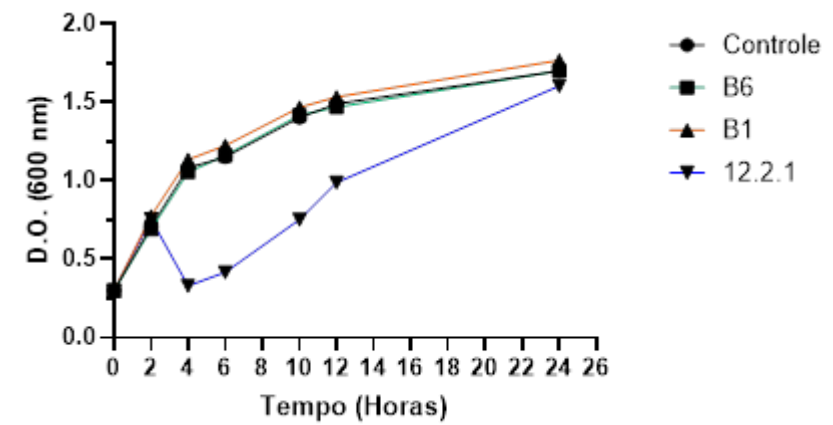
D)



E)

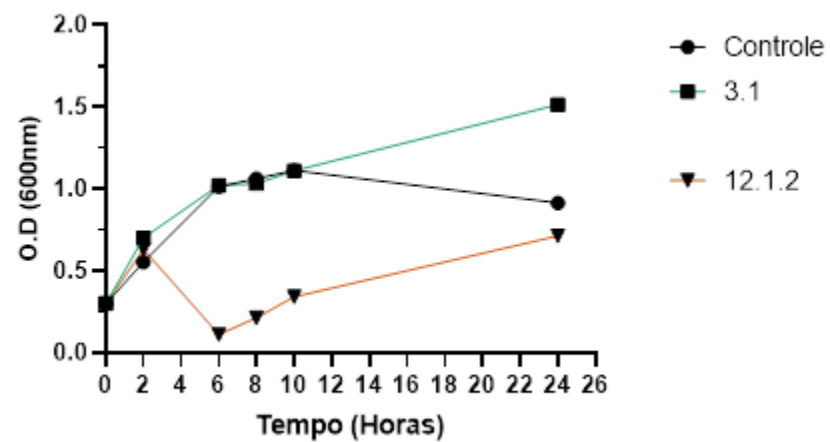
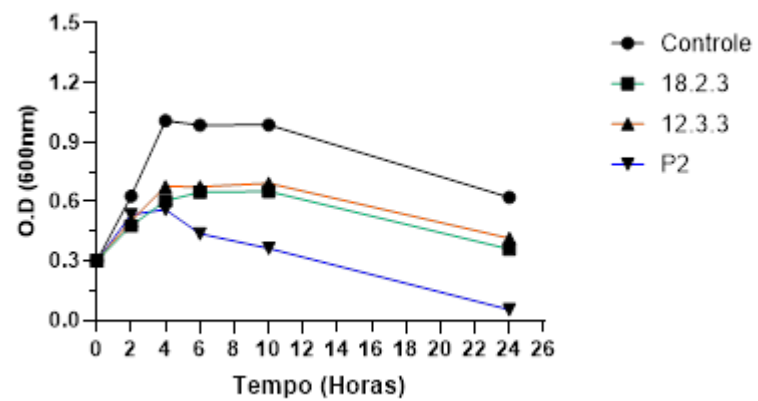


F)

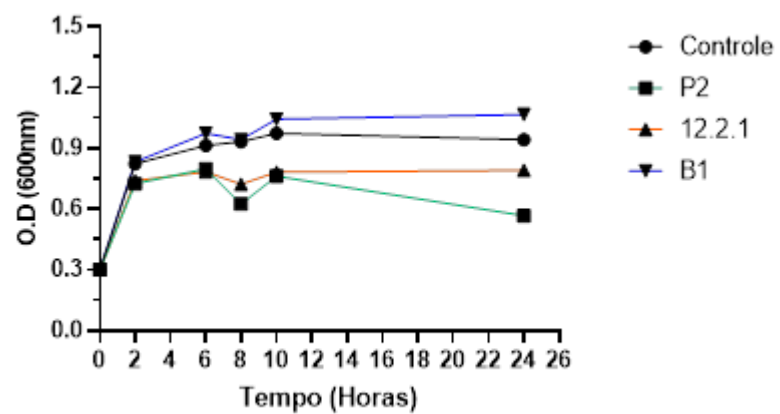


G)

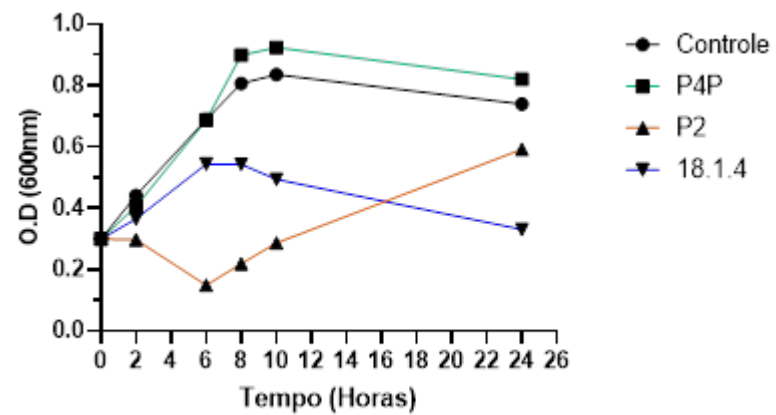
H)



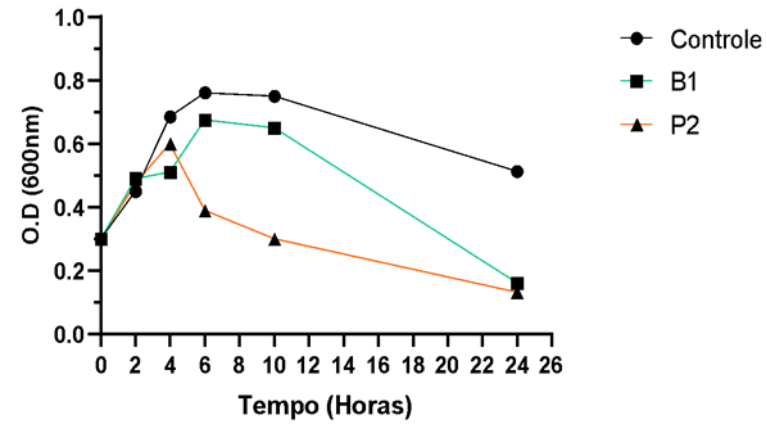
I)



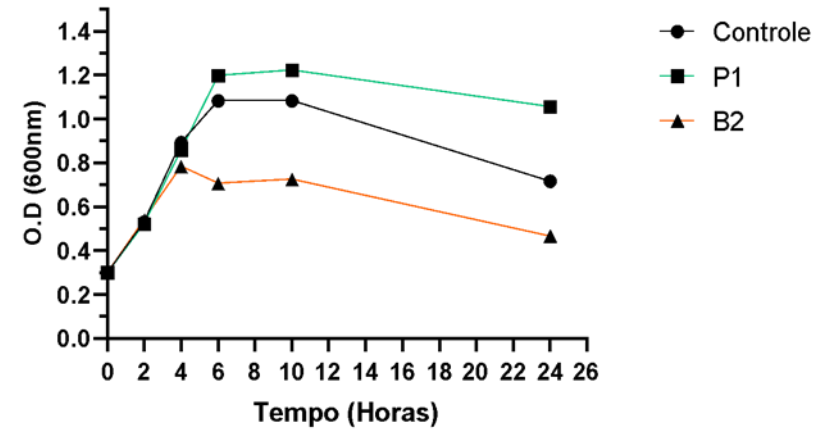
J)



K)



L)



## 5.5 Ensaio de infectividade em diferentes condições de pH

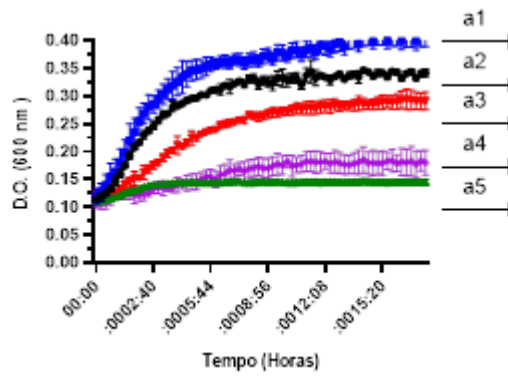
A partir dos ensaios de especificidade de hospedeiros e de atividade lítica em água sintética, foram escolhidos os bacteriófagos que apresentaram maiores atividades líticas sobre as bactérias testadas. Tais bactérias e bacteriófagos serão utilizados nos testes de reator de bancada, e o presente experimento visa entender como as bactérias e os fagos irão se comportar em diferentes faixas de pH que podem ocorrer nos testes de bancada.

Nos ensaios de avaliação do efeito do pH no crescimento de *S. marcescens* PLA5 e infectividade dos fagos (B1, 12.2.2, 11.2.1, 12.1, 12.2.3 e 12.1.2), foi observado que o pH afetou de forma significativa o crescimento bacteriano ( $p < 0,001$ ). Segundo a **Figura 17**, a bactéria em questão apresentou as maiores taxas de crescimento, evidenciado pelo aumento de densidade óptica como tempo de cultivo, quando submetido aos pH 7, 6,5 e 7,5.

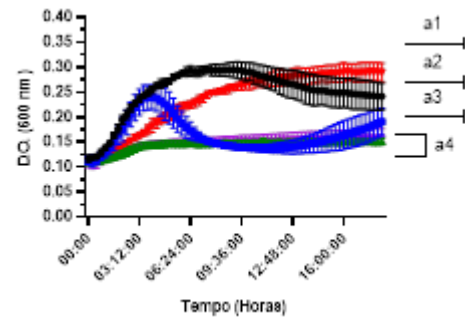
Ao compararmos os perfis de controle microbiano dos fagos nos diferentes valores de pH, foi possível observar respostas diferentes. Nenhum fago apresentou atividade lítica nos ensaios com pH 8,5, uma vez que não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de densidade óptica dos testes controle e os testes com bactérias infectadas com fagos. O fago 12.2.3 apresentou atividade lítica em quatro níveis de pH testadas (6,5; 7; 7,5 e 8), os fagos B1 e 11.2.1 em três níveis (6,5; 7; 7,5) e os fagos 12.1; 12.2.2; e 12.1.2 somente em um dos níveis de pH analisados (7,5)(**Figura 17**).

**Figura 17** – Resultados de monitoramento das densidades ópticas por 16 horas em quatro faixas de pH distintas (6,5; 7; 7,5 e 8), evidenciando os perfis de crescimento bacteriano nos experimentos controle e tratamento por bacteriófagos. A) Controle; experimentos tratados com bacteriófagos: B) B1; C) 12.2.2; D) 11.2.1; E) 12.1; F) 12.2.3; G) 12.1.2

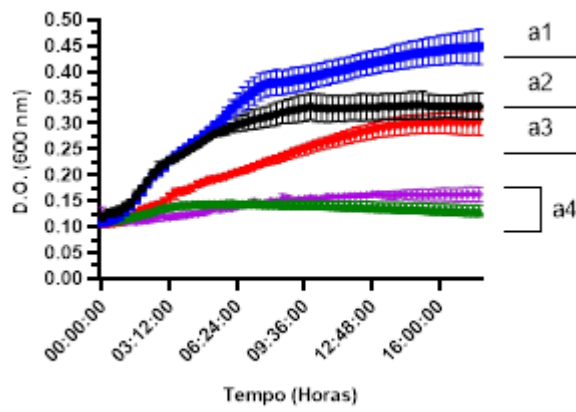
A)



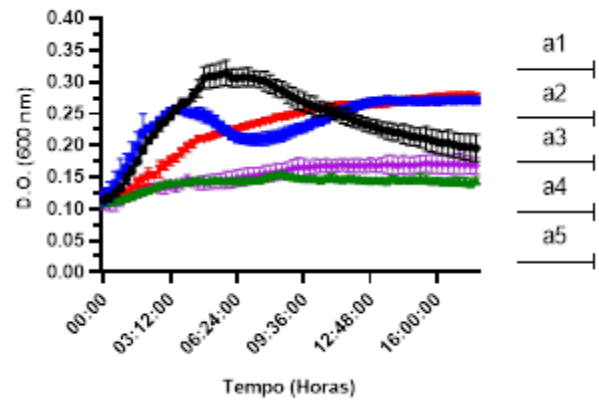
B)



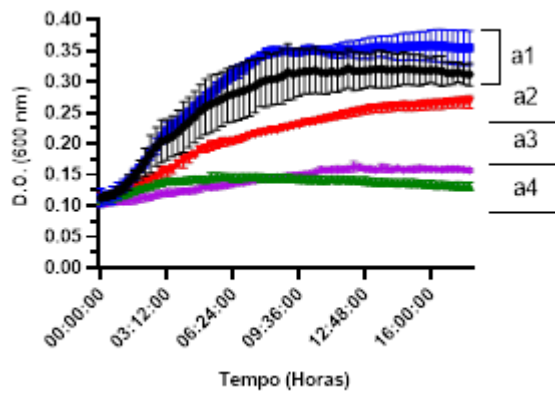
C)



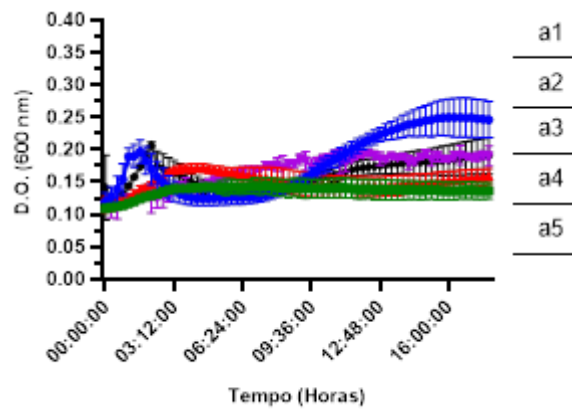
D)



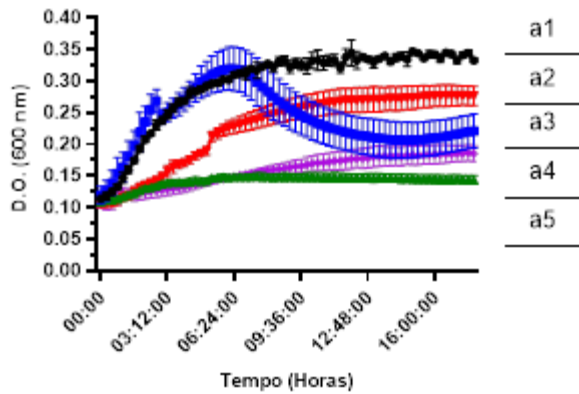
E)



F)



G)



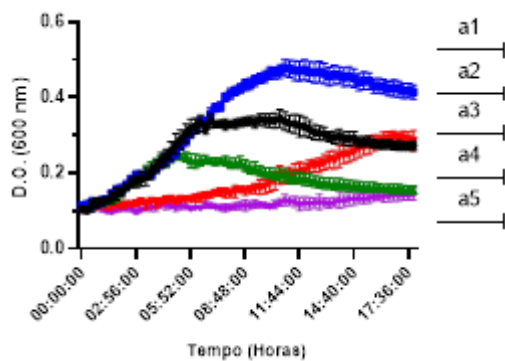
**Legenda: Preto -pH 6,5 ; Azul- pH7; verde- pH 7,5 ;vermelho - pH 8 ; roxo - pH 8,5**

Os bacteriófagos B1, 12.2.2 e 11.2.1 apresentaram maiores porcentagens de controle bacteriano quando submetidos a pH 7 (**Figura 17**), com reduções máximas das densidades ópticas de 51% a 53%, em relação ao controle. Já os experimentos tratados com fagos e submetidos a pH 6,5 e 7,5 apresentaram reduções máximas de densidade óptica entre 45% e 35% e 10% a 5% respectivamente.

Já o experimento ao qual testou-se o crescimento de *P. aeruginosa* RLI 17 em diferentes pH (6,5; 7; 7,5; 8 e 8,5) observou-se que houve maior crescimento bacteriano, evidenciado pelo aumento de densidade óptica quando experimento foi submetido aos pH 7, 6,5 e 8 (**Figura 18**).

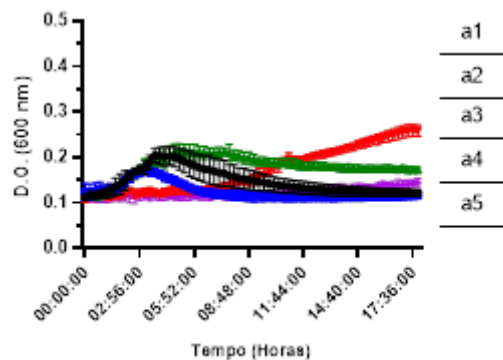
**Figura 18** - Perfis de crescimento de *P. aeruginosa* em relação ao tempo entre os experimentos controle e tratamento por bacteriófagos. A) Controle; experimentos tratados com bacteriófagos: B) 18.1.4; C) 18C; D) P2.

A)

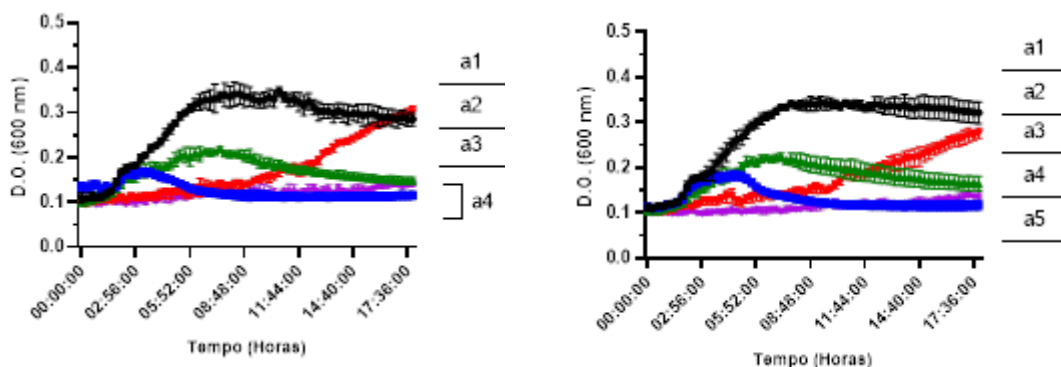


C)

B)



D)



**Legenda: Azul- pH7; preto -pH 6,5 ; verde- pH 7,5 ;vermelho - pH 8 ; roxo - pH 8,5**

Os bacteriófagos foram eficazes no controle bacteriano apenas em duas situações de pH: 6,5 e 7, evidenciadae pela diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) das densidades ópticas quando comparados ao experimento controle. Já em condições em que o pH apresentava condições mais alcalinas (pH: 7,5; 8 e 8,5), não se observou o decaimento das densidades bacterianas, evidenciando a baixa atividades líticas dos fagos em análise ( $P > 0,999$ ). As reduções de crescimento promovidas pelos fagos P2, 18C e 18.1.4 variaram entre 71% e 73% quando comparado ao experimento controle. Além disso, os testes em pH 6,5 apresentaram os segundos maiores percentuais de remoção bacteriana, apresentando redução máxima de densidade óptica de 55% quando comparado ao controle (fago 18.1.4).

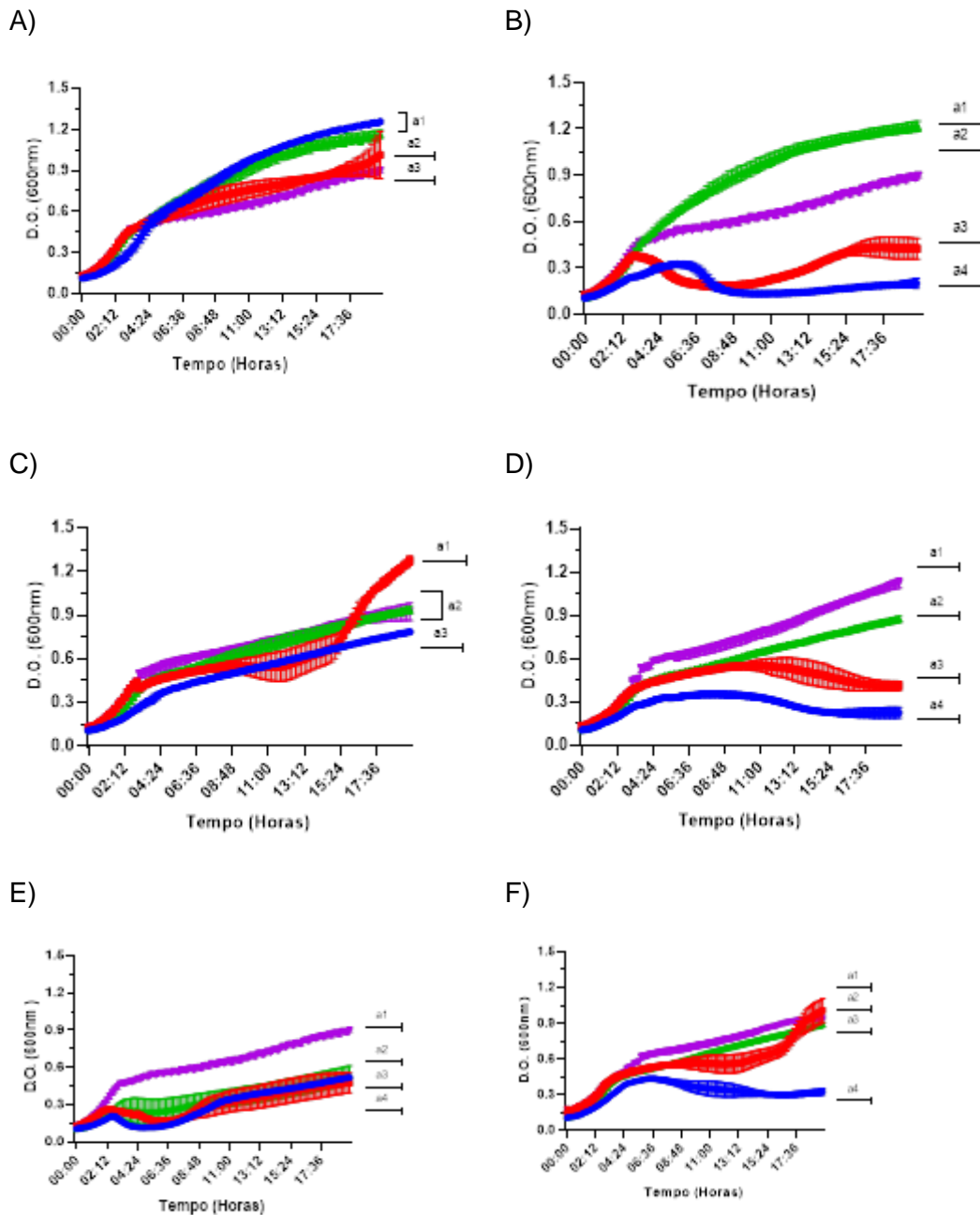
## 5.6 Ensaio de infectividade em diferentes condições de temperatura

A partir dos ensaios de especificidade de hospedeiros e de atividade lítica em água sintética, foram escolhidos os bacteriófagos que apresentaram maiores atividades líticas sobre as bactérias testadas. Tais bactérias e bacteriófagos serão utilizados nos testes de reator de bancada, e o presente experimento visa entender como as bactérias e os fagos irão se comportar em diferentes faixas de temperatura que podem ocorrer nos testes de bancada.

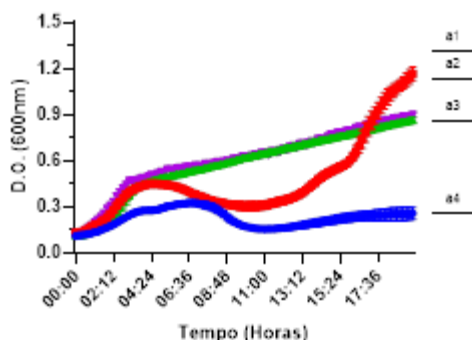
Os resultados obtidos a partir dos perfis de crescimento da bactéria *S. marcescens* PLA5 (**Figura 19**) evidenciaram a interferência significativa da temperatura sobre o padrão de crescimento ( $p < 0,05$ ). A incubação nas temperaturas de 30 e 40°C resultou nos maiores valores de densidade óptica, evidenciando que tais condições de temperatura são as melhores para o crescimento bacteriano (**Figura 19**).

As bactérias incubadas a 35 °C apresentaram o terceiro maior valor de densidade óptica, enquanto as bactérias incubadas à temperatura de 45°C apresentaram os menores valores de densidade óptica.

**Figura 19-** Perfis de crescimento de *S. marcescens* em diferentes temperaturas, tratados ou não com bacteriófagos. A) Controle; experimentos tratados com bacteriófagos: B) B1; C) 12.2.2; D) 11.2.1; E) 12.1; F) 12.2.3; G) 12.1.2.



G)



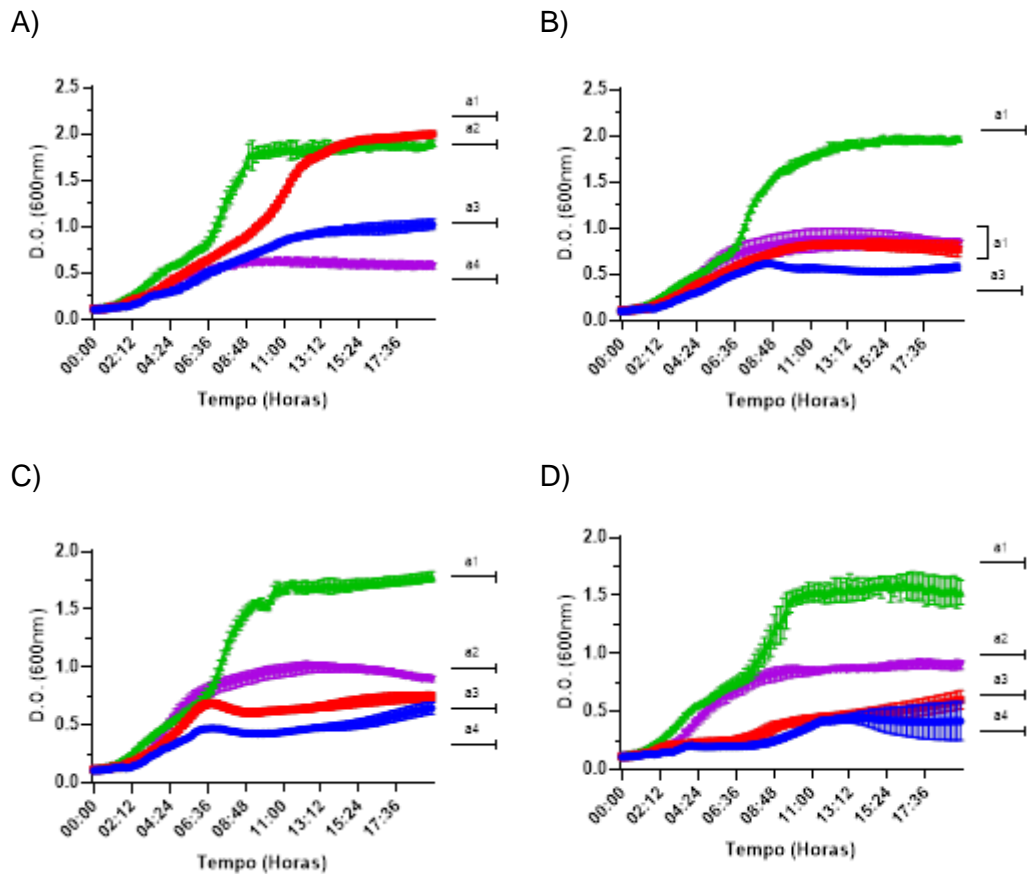
**Legenda= Azul : Temperatura 30°C; Vermelho: Temperatura 35°C; Verde: Temperatura 40°C; Roxo: Temperatura 45°C**

Verificou-se que de modo geral, as infecções conduzidas a 30°C apresentaram os maiores percentuais de redução de crescimento bacteriano, variando entre 37% e 84% em relação ao controle (**Figura 20**). Já os fagos submetidos às temperaturas de 40°C apresentaram os segundos maiores percentuais de remoção, variando entre 20% e 54%, embora tenha sido observado que o fago B1 não apresenta lise sobre a bactéria alvo em tal temperatura.

As infecções conduzidas a 35°C apresentaram resultados heterogêneos, já que houve diminuição de densidade óptica máxima de cerca de 47% nos experimentos aos quais houve a adição dos fagos 12.2.3 e B1; porém, os demais fagos não apresentaram decréscimo de densidade óptica (**Figura 20**). Além disso, foi observado que na temperatura a 45°C não houve redução na densidade óptica nos cultivos adicionados de fagos, demonstrando a ineficiência desses agentes nessa temperatura.

Os resultados das infecções com *P. aeruginosa* RLI 17 demonstraram que as maiores densidades óticas foram observadas nos experimentos realizados a 40°C, seguido pelas temperaturas de 35°C, 30°C e 45°C.

**Figura 20-** Perfis de crescimento bacteriano em relação ao tempo entre os experimentos controle e tratamento por bacteriófagos. A) Controle; experimentos tratados com bacteriófagos: A) Controle experimentos tratados com bacteriófagos: B) 18.1.4; C) 18C; D) P2;



Legenda= **Azul** : Temperatura 30°C; **Vermelho**: Temperatura 35°C; **Verde**: Temperatura 40°C; **Roxo**: Temperatura 45°C

Os experimentos incubados a 35°C apresentaram a maior eficiência de controle bacteriano, como demonstrado pelo decréscimo da densidade óptica. Nesses testes, os bacteriófagos presentes apresentaram atividade lítica sobre as bactérias alvo, culminando em uma redução na densidade óptica máxima de cerca de 70% em comparação com o teste controle.

Os experimentos incubados a 30°C apresentaram o segundo melhor resultado em relação ao controle bacteriano pelos fagos (**Figura 20**), com uma diminuição máxima da densidade óptica variando entre 37% (P2) a 61% (18.1.4) em relação ao controle. Já os experimentos incubados a 40°C apresentaram o terceiro melhor desempenho em relação ao controle bacteriano pelos bacteriófagos, com um

decréscimo máximo na densidade óptica de cerca de 20% (18.1.4) em relação ao controle. No entanto, os demais fagos (P2 e 18C) não apresentaram efeito significativo sobre o controle de crescimento bacteriano em tal temperatura testada ( $p > 0,05$ ).

## 5.7 Extração de material genético

Os rendimentos das extrações, bem como a qualidade dos materiais genéticos avaliados pela relação dos valores de absorvância a 260 e 280 variaram com o fago. De modo geral, a qualidade foi boa, com relação DO 260/280 superior a 1,8. Porém, os valores foram inferiores a 1,8 nas amostras dos fagos P2 (RLI 17) e B1, indicando que necessidade de incluir etapas adicionais na purificação para retirada dos possíveis contaminantes.

**Tabela 9-** Resultados obtidos referentes a quantificação e eficácia de extração do material genético viral

Bactéria Hospedeira	Fago	[DNA] (ng/ $\mu$ L)	Absorvância (260/280)	Absorvância (260/230)
<u>Stenotrophomonas maltophilia</u>	3.1	58.9	2.00	1.31
<u>Serratia marcescens</u>	12.2.2	12.6	2.57	0.33
<u>Serratia marcescens</u>	12.1	303.1	1.81	0.67
<u>Serratia marcescens</u>	12.2.3	27.1	1.91	0.56
<u>Serratia marcescens</u>	12.2.1	108.7	1.94	1.44
<u>Serratia marcescens</u>	11.2.1	324	1.69	0.79
<u>Serratia marcescens</u>	B1	193.5	1.52	0.68
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	P2	136.8	1.44	0.54
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	18C	578.6	1.92	1.29
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	18.1.4	660.1	1.87	0.93

## 5.8 Análise morfológica dos bacteriófagos

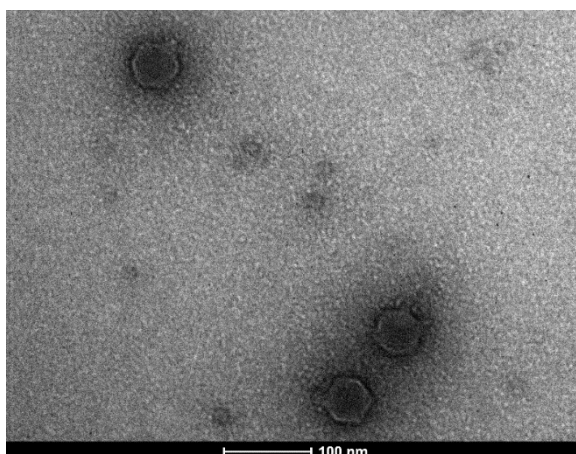
Após a obtenção das imagens por MET de cada amostra dos isolados bacteriófagos, os fagos foram majorados através do software IMAGE J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) e posteriormente caracterizados morfológicamente (**Tabela 10**).

**Tabela 10** – Resultados das dimensões dos fagos, mensuradas do software IMAGE J em resultados da microscopia eletrônica de transmissão

Bactéria Hospedeira	Identificação do bacteriófago	Comprimento total do bacteriófago (nm)	Comprimento do capsídeo (nm)	Largura do capsídeo (nm)
<i>S. maltophilia</i>	3.1	62,75 ± 1,758	55,46 ± 2,945	55,46 ± 4,762
<i>S. marcescens</i>	12.2.2	173,75 ± 2,157	47,57 ± 4,482	48,76 ± 1,075
	12.1	199,67 ± 2,358	72,56 ± 3,901	73,84 ± 2,047
	12.2.3	199,75 ± 2,357	64,37 ± 2,912	64,67 ± 4,168
	12.2.1	198,45 ± 5,468	78,67 ± 3,491	79,84 ± 2,1850
	11.2.1	173,94 ± 4,218	73,64 ± 2,781	74,67 ± 3,014
<i>P. aeruginosa</i>	18C	48,75 ± 2,397	37,64 ± 4,196	39,67 ± 2,042
	B1	199,64 ± 3,394	65,67 ± 5,149	65,46 ± 1,047
	P2	57,68 ± 3,197	49,67 ± 3,179	48,67 ± 3,715
	18.1.4	222,34 ± 2,349	87,64 ± 5,186	59,67 ± 2,479

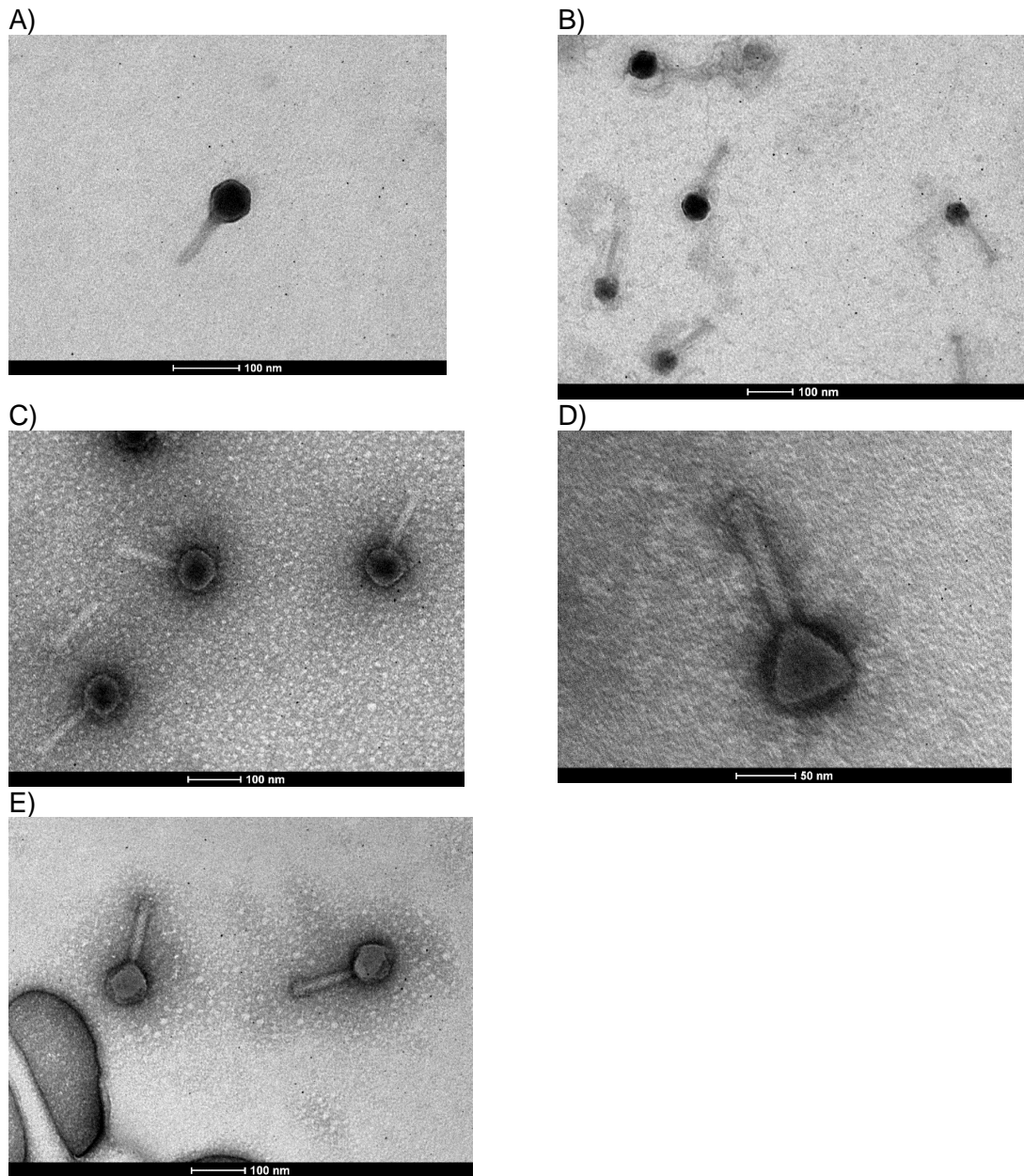
Foi identificado que o bacteriófago 3.1, proveniente da bactéria *S. maltophilia* 94, possui um capsídeo com formato icosaédrico, medindo 55,46 nm de comprimento e 55,46 nm de largura e cauda apresentando 62,75 nm de comprimento.

**Figura 21-** Microscopia de transmissão do fago 3.1



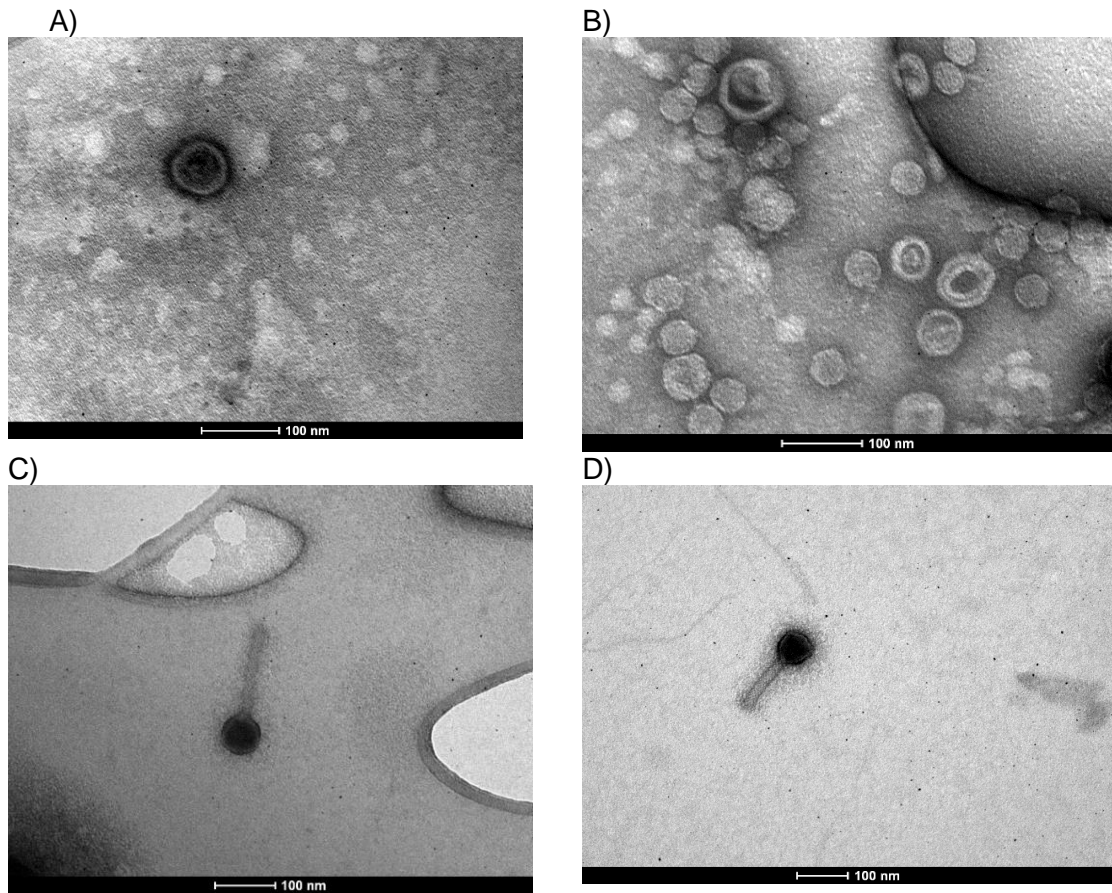
Os fagos obtidos a partir da bactéria *S. marcescens* PLA5 apresentaram comprimento total entre 173 nm (12.2.2 e 11.2.1) e 199 nm (12.1; 12.2.3; 12.1.2), enquanto as dimensões dos capsídeos variaram entre 47 nm (12.2.2) e entre 64 a 78 nm (12.1; 12.2.3; 12.1.2 e 11,2,1). Todos os fagos analisados apresentaram capsídeo com formato icosaédrico, acompanhado de uma calda aparentemente não contrátil.

**Figura 22-** microscopia de transmissão dos fagos 12.2.2 (A), 11.2.1(B), 12.1 (C), 12.2.3 (D) E 12.1.2 (E)



Os fagos derivados da bactéria *P. aeruginosa* RLI 17 apresentaram comprimento total variando entre 48 nm (18C), 57 nm (P2) e entre 199 a 222 nm (18.1.4 e B1), enquanto as dimensões dos capsídeos foram de 37 nm (18C), 49 nm (P2), 65,67nm (B1) e 87 nm (18.1.4). Todos os fagos analisados apresentaram uma estrutura icosaédrica do capsídeo acompanhada de uma cauda aparentemente não contrátil.

Figura 23- Microscopias de transmissão dos bacteriófagos 18C (A), P2 (B), 18.1.4 (C), B1 (D).



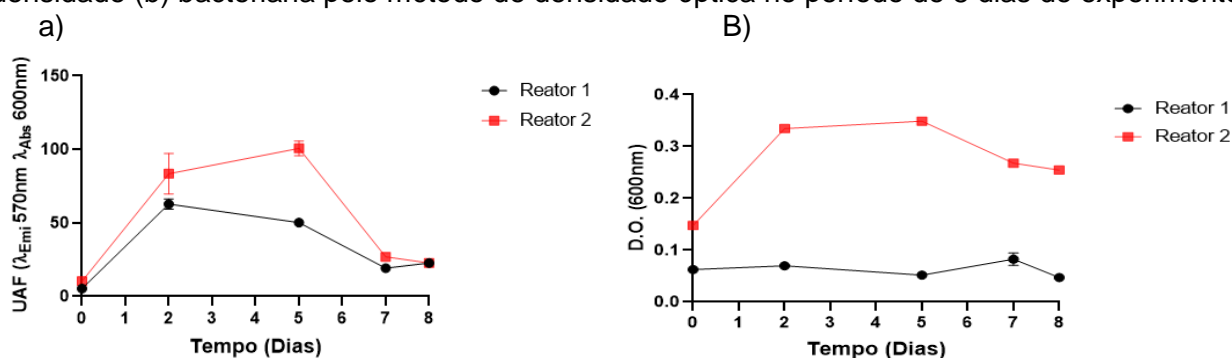
## 5.9 Resultados dos testes envolvendo os sistemas de resfriamento industrial em escala de bancada

### 5.9.1 Teste comparativo de viabilidade bacteriana em duas diferentes águas sintéticas em sistema de resfriamento industrial em escala de bancada

A partir dos resultados dos experimentos apresentados na seção 5.2.1, estabeleceu-se uma correlação entre a densidade bacteriana e as densidades ópticas, bem como a viabilidade bacteriana avaliada pelo método resazurina. Durante a condução deste experimento, monitoramos continuamente esses parâmetros nos reatores de bancada. Notavelmente, o reator 2 (R2), operado com água sintética enriquecida, revelou uma atividade bacteriana expressa pela medida de UAF mais pronunciada nos primeiros cinco dias, quando comparado ao reator 1 (R1). Isso sugere que as águas sintéticas enriquecidas com extrato de levedura causaram uma

variação mais significativa nas densidades bacterianas ao longo do tempo, quando comparadas ao reator 1 (R1), que operou com água sintética não enriquecida. Porém após esse período, foi observado diminuição na atividade bacteriana em ambos os reatores, sugerindo a necessidade de regime de purgas mais constante, a fim de que a comunidade bacteriana disponha de mais nutrientes para que se mantenha em densidade constante.

**Gráfico 2-** Monitoramento de viabilidade (a) bacteriana pelo método de resazurina e densidade (b) bacteriana pelo método de densidade óptica no período de 8 dias de experimento.

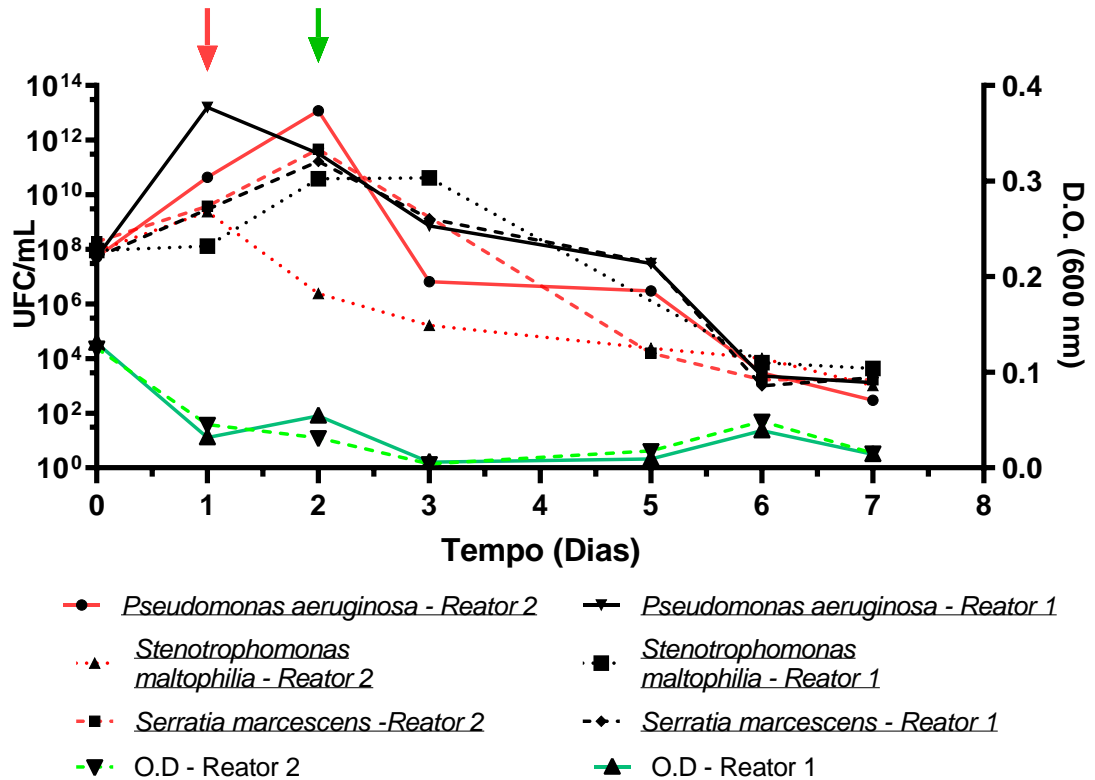


## 5.9.2 Avaliação fagos no controle de bactérias sésseis e planctônicas em biorreator de bancada.

### 5.9.2.1 Avaliação da periodicidade de adição de fagos

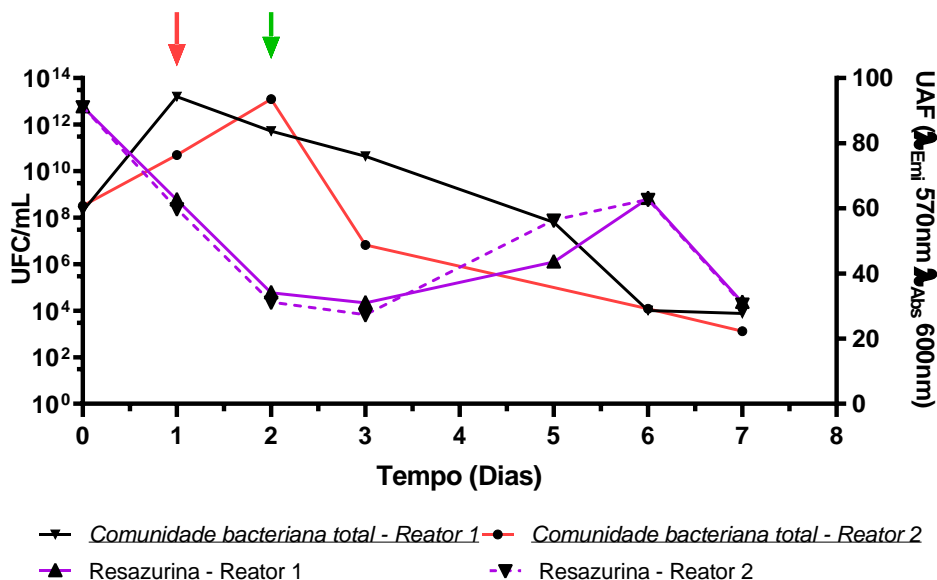
Os resultados referentes aos testes, demonstraram que o reator 2 adicionado de duas doses de fagos apresentou valores cerca de 10 a 100 vezes menores na densidade de *P. aeruginosa* RLI 17, *S. marcescens* PLA5 e *S. maltophilia* 94 quando comparado ao reator 1, entre o dia 2 e o dia 5 do experimento. Porém, ambos reatores apresentaram perfil de decaimento de densidade de bactérias semelhantes, ao ponto das concentrações bacterianas de ambos se apresentasse igual a partir do dia 6 do experimento. Tal fato demonstra que a comunidade bacteriana não se manteve constante.

**Gráfico 3-** Resultado do monitoramento de densidades ópticas e densidades bacterianas pelo método de UFC/mL das bactérias *P. aeruginosa*, *S. marcescens* e *S. maltophilia* nos reatores 1 e 2 no período de 8 dias de experimento.



Além disso, o gráfico relativo aos monitoramentos de viabilidade celular demonstrou que ambos os reatores (R1 e R2) apresentaram padrões de decaimento semelhantes, reverberando a necessidade do aumento das frequências de purgas no sistema. Porém os dados referentes às densidades ópticas e viabilidade bacteriana não refletiram o decaimento observado pelo gráfico de monitoramento das densidades bacterianas expressas em UFC/mL (**Gráfico 3 e Gráfico 4**).

**Gráfico 4-** Resultado do monitoramento da viabilidade bacteriana (UAF) e densidades ópticas e densidades das comunidades bacterianas pelo método de UFC/mL nos reatores 1 e 2 no período de 8 dias de experimento



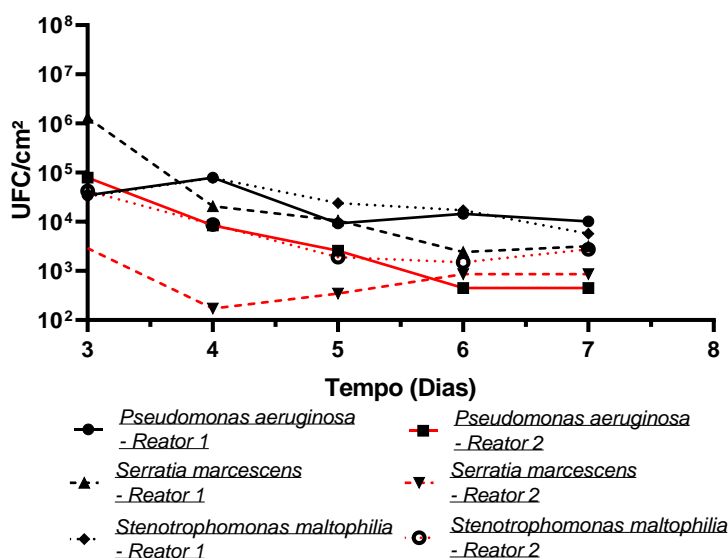
### 5.9.2.2 Efeito da adição diária de fagos no controle bacteriano

Os resultados apresentados no **Gráfico 5** denota que houve o decréscimo da densidade de todas as espécies bacterianas presentes tanto no reator tratado com bacteriófagos quanto no reator controle na ordem de cerca de 1000 vezes entre os dias 0 e 2. Esse padrão sugere que os fagos não foram o fator de interferência no controle bacteriano já que não houve redução de densidade óptica no reator 2 em comparação com o reator 1. Além disso, através do perfil das densidades óticas demonstrados no experimento assume-se que as características da água sintética, tal qual a periodicidade e volume das purgas podem estar influenciando a manutenção das densidades bacterianas iniciais do sistema.

Mesmo assim, foi possível observar efeito positivo dos fagos sobre as bactérias em seu estado planctônico e sésil. As densidades bacterianas das planctônicas reduziram em taxas entre 30 a 110 vezes (UFC/mL). Por sua vez, em relação às densidades bacterianas sésseis, houve um decaimento de cerca de 10 a 100 vezes (UFC/mL) nos reatores tratados com bacteriófagos quando comparados aos reatores controle. Tal fato pode evidenciar que os bacteriófagos podem controlar as bactérias



**Gráfico 6** - Resultado do monitoramento de densidades bacterianas sésseis pelo método de UFC/cm<sup>2</sup> das bactérias *P. aeruginosa*, *S. marcescens* e *S. maltophilia* nos reatores 1 e 2 no período de 8 dias de experimento.



### 5.9.3 Teste comparativo de aplicação diária do coquetel de fagos com diferentes títulos no controle de bactérias planctônicas e sésseis em sistema com adição contínua de água sintética enriquecida

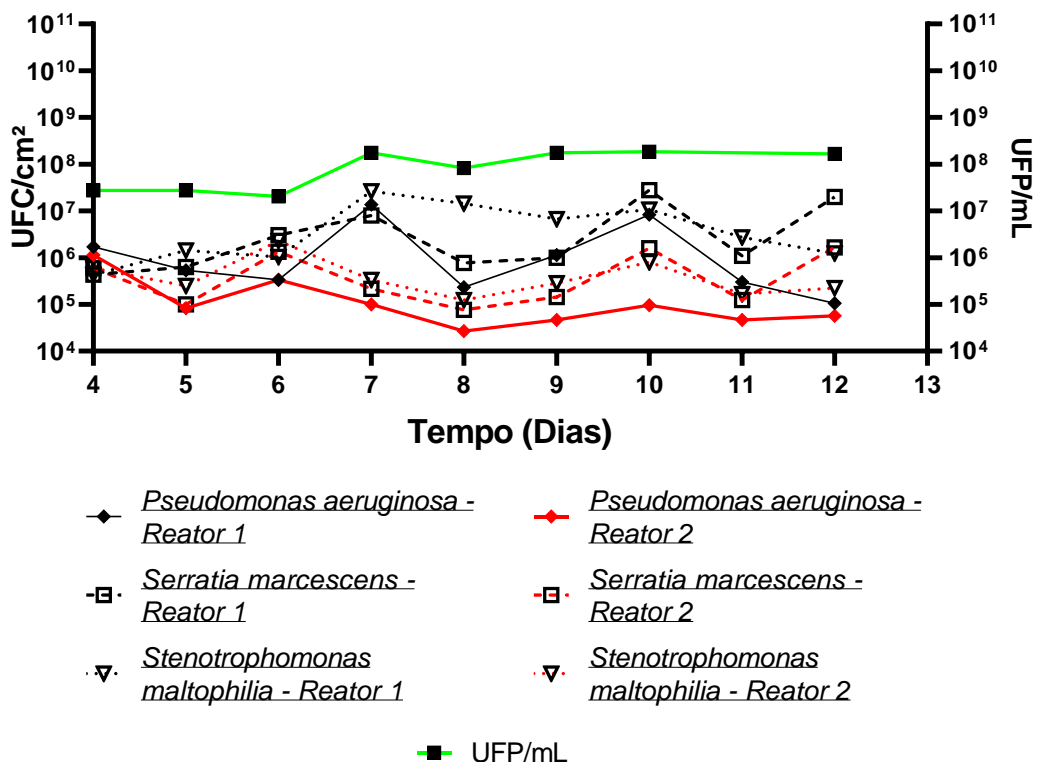
Entre os dias 0 e 2, as densidades bacterianas planctônicas descaíram 1000 vezes quando comparado às densidades bacterianas iniciais de ambos os reatores, mesmo com adição em fluxo constante de água sintética não enriquecida em ambos os reatores. A partir de tal fato, iniciou-se a adição de água sintética enriquecida com 0,005% de extrato de levedura, de modo a fornecer uma maior fonte de carbono para a manutenção das densidades bacterianas a partir do dia 2 (**Gráfico 7 b**). Isso resultou em maior estabilidade nas densidades bacterianas. A adição do fago resultou em redução de densidades das bactérias *P. aeruginosa* RLI 17, *S. marcescens* PLA5 e *S. maltophilia* 94 em seu estado planctônico de cerca de 10 e 100 vezes em relação experimento controle, entre os dias 3 e 12.

Além disso, diferentemente do experimento anterior, a densidade de partículas virais planctônicas aumentou durante o ensaio, variando de cerca de  $10^6$  UFP/mL, título inicial, para  $10^{10}$  UFP/mL, ao final último dia de experimento (dia 12).

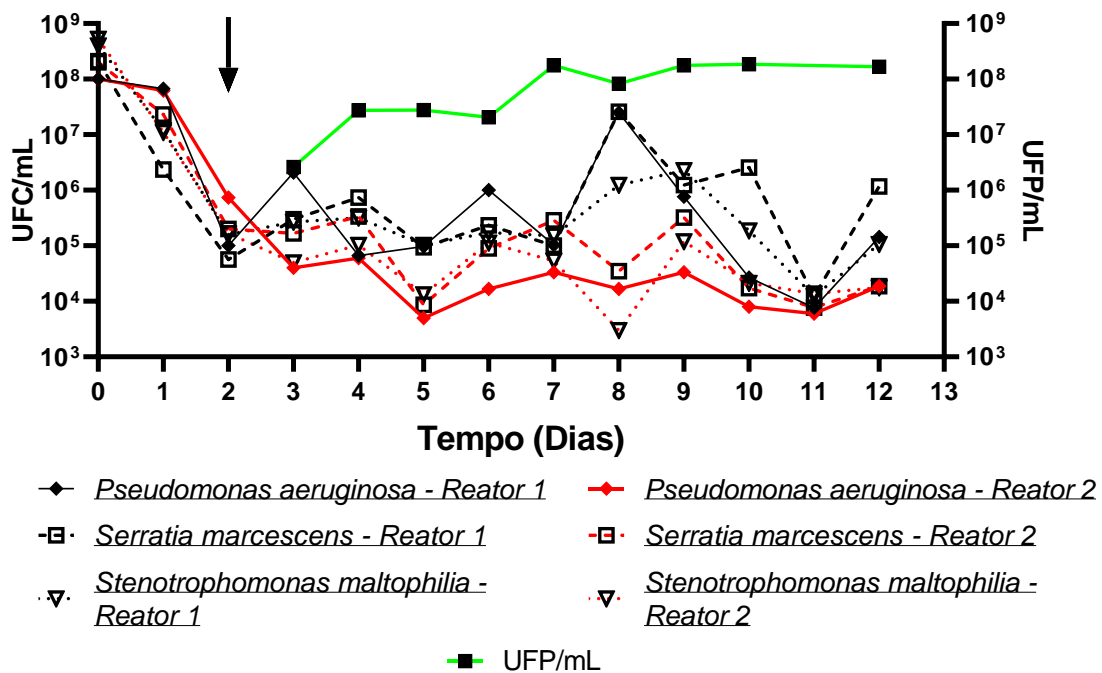
Os dados representados pelo **Gráfico 7 a** também denotaram que no reator tratado com bacteriófagos (R2), houve a redução das densidades das bactérias *P. aeruginosa* RLI 17, *S. marcescens* PLA5 e *S. maltophilia* 94 em suas formas sésseis de cerca de 10 a 100 quando comparado ao reator controle, evidenciando efeito positivo dos fagos no controle de biofilmes.

**Gráfico 7-** Resultado do monitoramento de densidades dos bacteriófagos do reator 2 e densidades bacterianas sésseis e planctônicas das bactérias *P. aeruginosa*, *S. marcescens* e *S. maltophilia* nos reatores 1 e 2 no período de 12 dias de experimento A) Monitoramento de densidades bacterianas e de bacteriófagos Sésseis dos reatores 1 e 2. B) Monitoramento de densidades bacterianas e de bacteriófagos planctônicas R1: Reator não adicionado de fago. R2: reator adicionado de fago

a)



b)



### 5.9.3.1 Efeitos da adição diária de fagos no controle das densidades de bactérias planctônicas e sésseis em sistemas de resfriamento em escala piloto

Durante os dezesseis dias de experimento, observou-se que houve diferenças de densidade tanto de bactérias em formas sésseis quanto planctônicas entre o reator ao qual adicionou-se bacteriófagos (reator 2) e o reator ao qual não houve controle bacteriano (reator 1).

Em relação às bactérias sésseis, é possível observar que durante o período analisado, houve a diminuição de densidades bacterianas nos reatores tratados com fagos Figura 24 b. Para *P. aeruginosa* RLI17, as diferenças observadas variaram em média de 10 a 100 vezes menores quando comparado ao controle. Reduções similares foram observadas para *S. marcescens* PLA5. Por sua vez, as reduções nas densidades de *S. maltophilia* 94 se mostraram menores que as demais bactérias, da ordem de 10 vezes quando comparado ao reator controle.

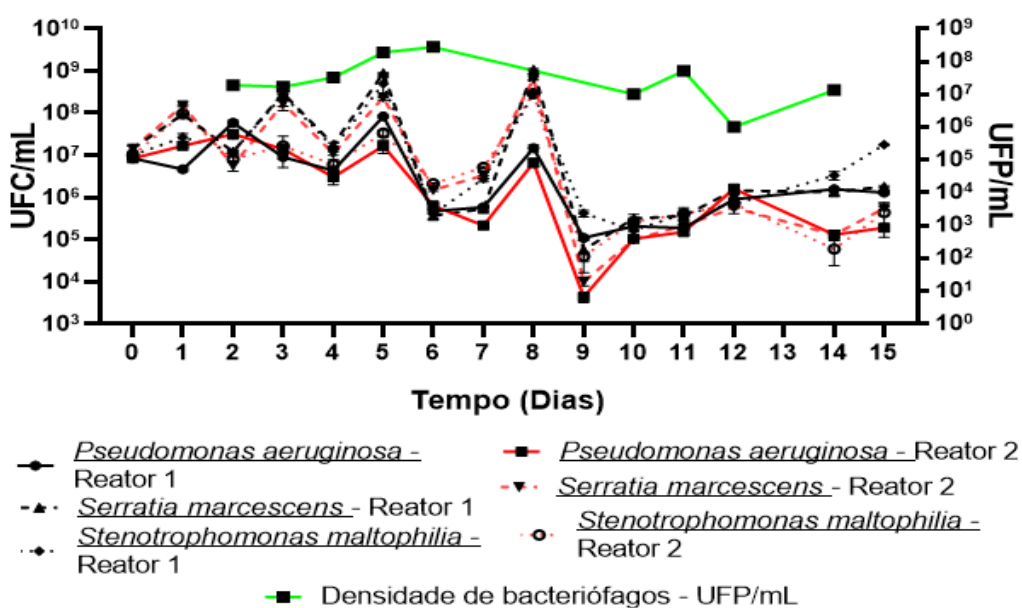
A densidade de fagos do sistema se manteve constante durante todo o período analisado. Porém em alguns dias do experimento, o título dos bacteriófagos se

manteve entre 10 vezes maior ou 10 vezes menor ao que era aportado diariamente ao sistema ( $10^7$  PFU/mL).

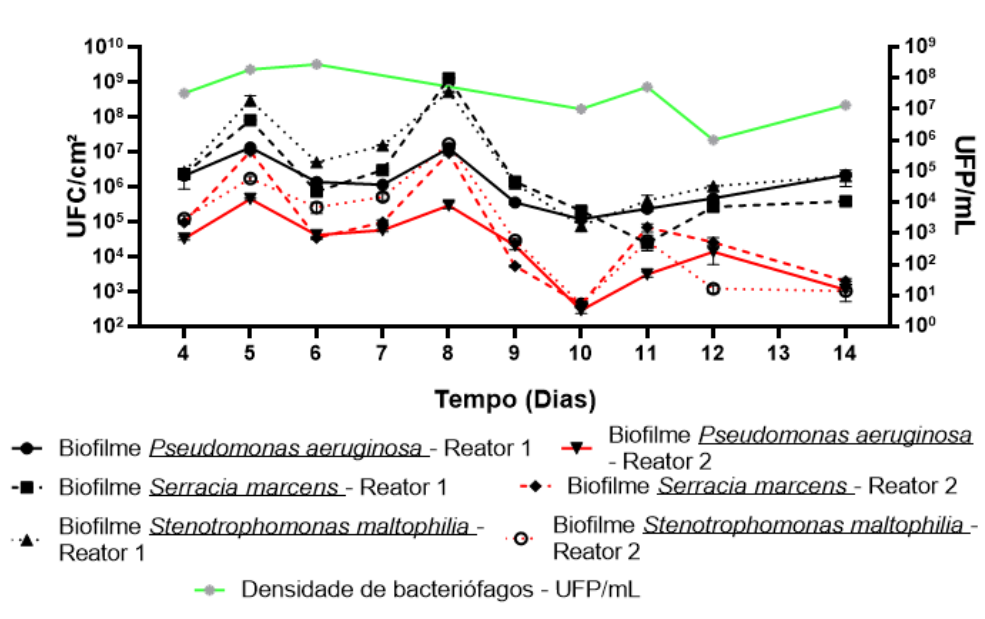
Segundo o Figura 24 a, é possível observar que em ambos reatores, as bactérias *S. marcescens* PLA5 e *S. maltophilia* 94 apresentaram maiores densidades quando comparadas a *P. aeruginosa* RLI17. Ademais, as bactérias dos reatores controle e tratado com fagos apresentaram as mesmas dinâmicas de crescimento durante os 15 dias analisados. Porém os dados relativos ao reator tratamento (R2) evidenciaram que a partir do décimo segundo dia, houve o decréscimo de densidade bacteriana planctônica de cerca de 10 vezes quando comparado ao controle. Por sua vez, os perfis obtidos por meio das medidas de densidades óticas, que constituem uma medida indireta da densidade bacteriana, foram semelhantes nos dois reatores (Figura 24c).

Figura 24 – Resultado do monitoramento de densidades dos bacteriófagos do reator 2 e densidades bacterianas sésseis e planctônicas das bactérias *P. aeruginosa*, *S. marcescens* e *S. maltophilia* nos reatores 1 e 2 no período de 15 dias de experimento A) Monitoramento das densidades bacterianas e virais utilizados nos reator 1 e reator 2 nas formas planctônicas; B) Monitoramento das densidades bacterianas sésseis e bacteriófagos planctônicos nos reatores 1 e 2 durante o experimento; C) Monitoramento das densidades óticas das águas sintéticas dos reatores 1 e 2

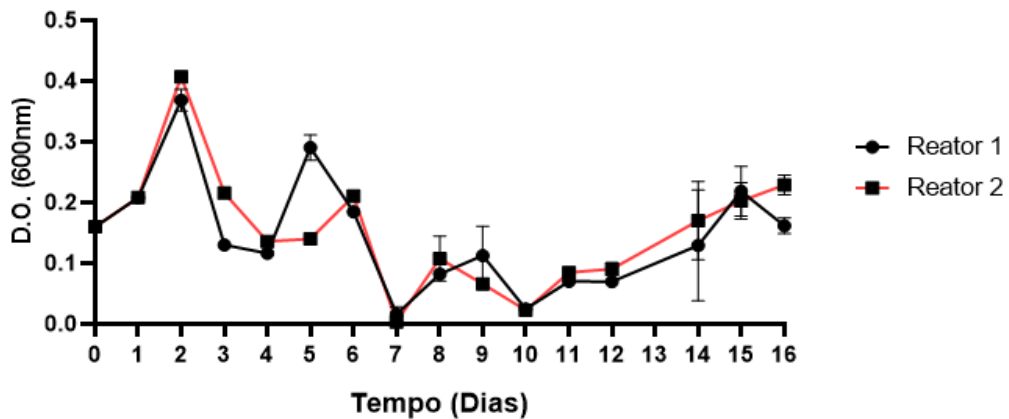
A)



B)



C)



### 5.9.3.2 Ensaio comparativo de eficiência de controle bacteriano entre um sistema sem tratamento por fagos, um sistema com adição diária de bacteriófagos e um sistema com adição única de bacteriófagos

Durante o período de 21 dias de monitoramento, foi possível observar que os reatores tratados com coquetel de fagos em diferentes regimes de aplicação (Reator 1 e Reator 2) apresentaram resultados heterogêneos em respeito ao controle de bactérias planctônicas (**Figura 25a**). Enquanto o Reator 2, tratado periodicamente com fagos, apresentou densidades bacterianas planctônicas menores do que o Reator controle, o Reator 1 (tratado somente com uma aplicação de fagos) apresentou densidades bacterianas menores do que o Reator controle somente em dois dias do

experimento. Além disso, segundo o gráfico em análise, o Reator 1 apresentou valores de densidade bacteriana planctônica superiores quando comparados ao reator controle. O padrão das densidades das bactérias fora diferente em cada reator. Durante o terceiro e décimo quarto dia do experimento, houve a diminuição de densidade de *P. aeruginosa* RLI 17 em sua forma planctônica no reator 2. Já o reator 1 não apresentou o mesmo padrão de decaimento de densidade bacteriana de *P. aeruginosa* RLI 17.

A partir do terceiro dia de experimento, foi possível observar a queda dos níveis de bacteriófagos livres de *P. aeruginosa* RLI 17, enquanto as partículas virais responsáveis por lisar as demais bactérias apresentam uma estabilidade maior durante o tempo em análise. Tal fato pode indicar a razão pela qual as bactérias *S. marcescens* PLA5 e *S. maltophilia* 94 apresentaram padrão de crescimento semelhante entre as duas condições de tratamento (**Figura 25c**).

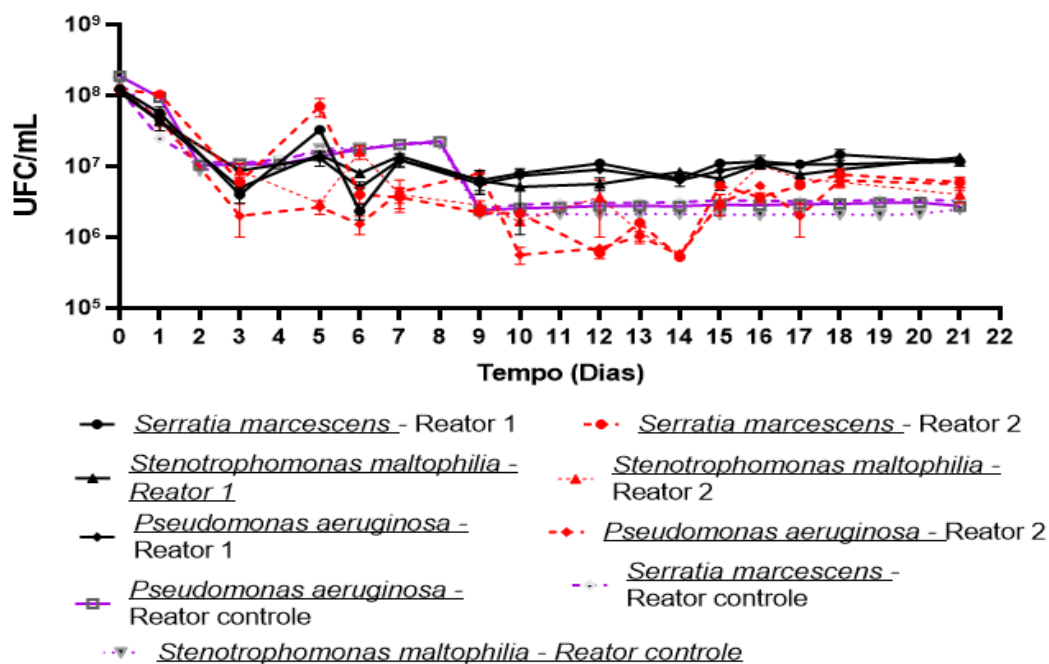
Os resultados referentes a bactérias sésseis demonstraram que ambos os reatores tratados com fagos apresentaram menores densidades bacterianas em grande parte do experimento. Como podemos observar no gráfico, o reator 1 apresentou uma densidade bacteriana maior em relação ao reator 2 ao decorrer dos dias. A partir do décimo primeiro dia, os níveis de bactérias sésseis entre o reator que recebeu somente uma aplicação de fagos e o reator controle foram muito pequenas, e a partir do décimo sexto dia as densidades bacterianas em forma séssil entre o controle e o reator 1 foram semelhantes (**Figura 25b**).

Já o reator 2 apresentou os menores níveis de densidade de bactérias sésseis durante o experimento. Entre quarto e décimo segundo dias de experimento, as densidades de bactérias sésseis em tal reator apresentaram incrementos. Porém, após ao décimo terceiro dia houve o decréscimo das densidades bacterianas, por vezes sendo até 100 vezes menor quando comparado ao reator controle e ao reator 1 (**Figura 25b**), o que evidencia o sucesso do tratamento de bacteriófagos ao sistema em análise.

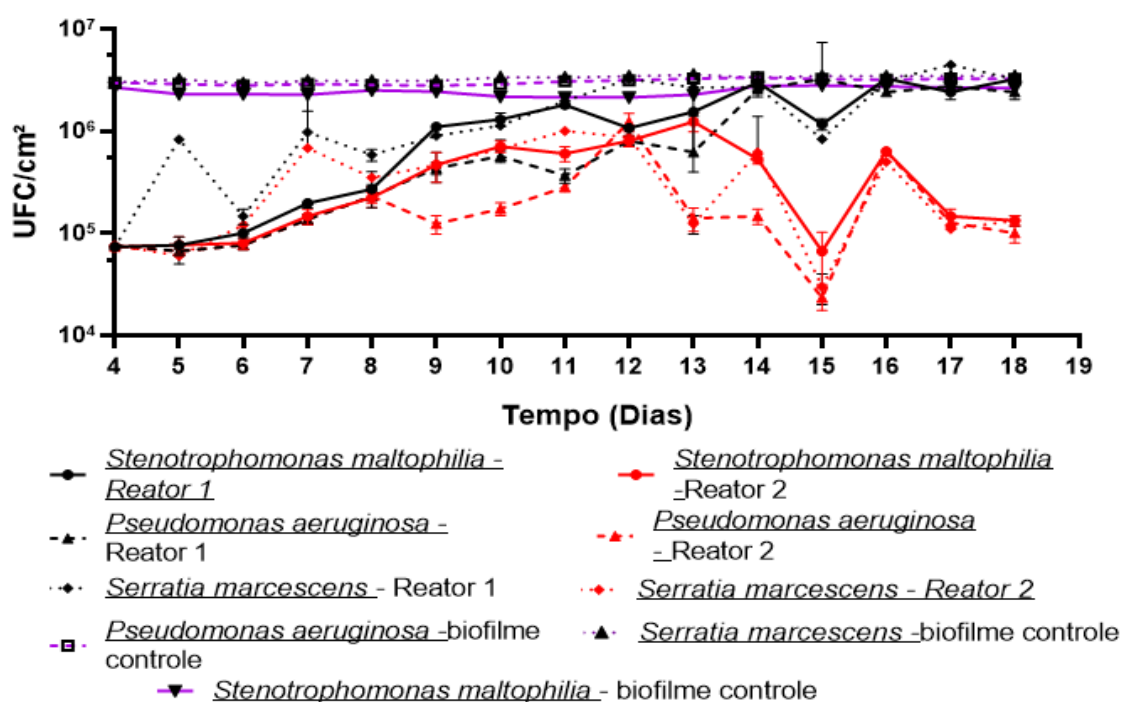
**Figura 25** – Resultado do monitoramento de densidades dos bacteriófagos dos reator 1 e 2 e densidades bacterianas sésseis e planctônicas das bactérias *P. aeruginosa*, *S. marcescens* e *S. maltophilia* nos reatores 1 e 2 e controle no período de 22 dias de experimento A) Monitoramento das densidades bacterianas planctônicas do Reator controle,

Reator 1 e Reator 2 durante os experimentos; B) Monitoramento das densidades bacterianas na forma sésil dos do Reator controle, Reator 1 e Reator 2 durante os experimentos; C) Monitoramento das densidade dos bacteriófagos do reator 1 e reator 2 durante o experimento; D) Monitoramento dos parâmetros pH e ORP do Reator controle, Reator 1 e Reator 2 durante o experimento.

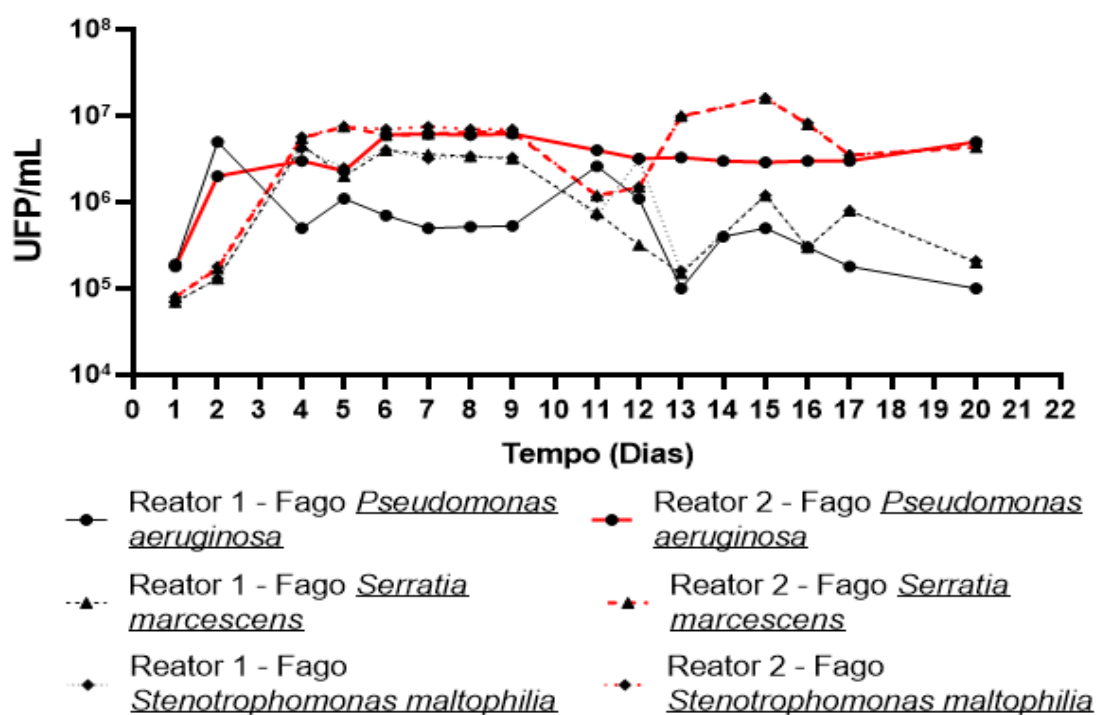
A)



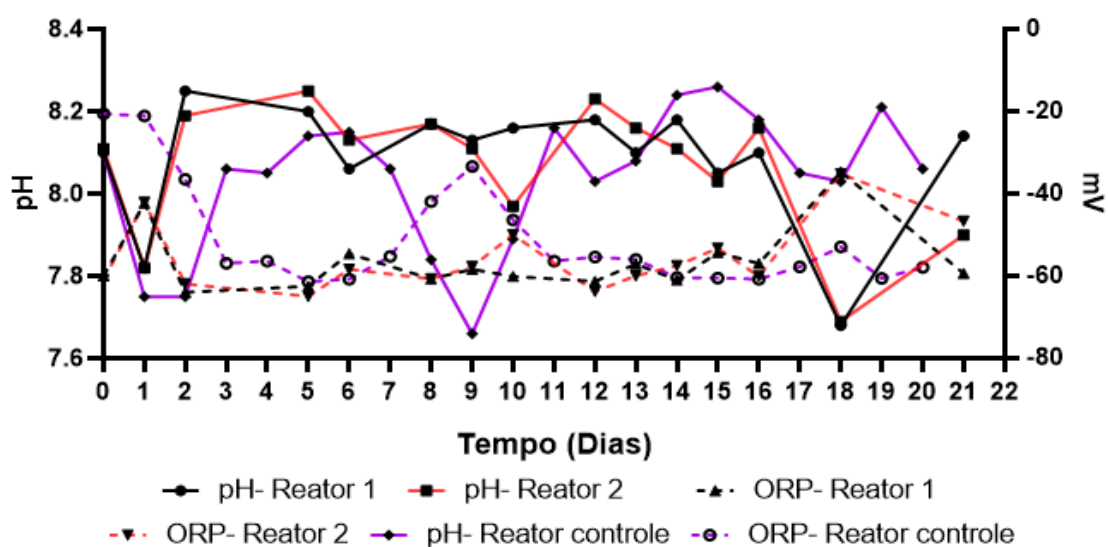
B)



C)



D)



#### 5.9.3.2.1 Avaliação da corrosão em corpo de provas por perda de massa

Os resultados apresentados na **Tabela 11** demonstraram que reator controle, reator 1 e reator 2 apresentaram taxa de corrosão média respectivas de 0,844 *mpy*; 0,932 *mpy* e 1,31 *mpy*. Os resultados demonstraram que o reator controle apresentou menor taxa de corrosão, seguido do reator ao qual adicionou-se uma aplicação de bacteriófagos. No reator com adição diária de fagos, foi observada maior taxa de corrosão. Porém, os esses valores se encontram na faixa ideal esperadas para sistemas com corrosão controlada, qual seja valores entre 0 e 2 *mpy*.

**Tabela 11-** Resultados do monitoramento dos pesos e das taxas de corrosão dos cupons de aço associadas nos reatores 1, 2 e controle.

Código dos cupons	Peso inicial (g)	Peso após 21 dias de experimento (g)	Diferença entre peso inicial e peso final (g)	Taxa de corrosão (mpy)	Média das taxas de corrosão (mpy)	Desvio Padrão amostral	Coefficiente de variação de pearson (%)
<b>Reator 1</b>							
YH287	11,113	11,0919	21,1	0,9148371			
YH286	11,1013	11,0806	20,7	0,8974942	0,93218	0,045885	4,92232802
YH285	11,0902	11,0675	22,7	0,9842086			
<b>Reator 2</b>							
YH271	11,147	11,1165	30,5	1,3223949			
YH270	11,1033	11,0725	30,8	1,335402	1,3195	0,017523	1,32796886
YH259	11,127	11,097	30	1,3007163			
<b>Reator controle</b>							
YH279	11,1775	11,1589	18,6	0,8064441			
YH277	11,1473	11,127	20,3	0,8801513	0,84402	0,036875	4,36895576
YH278	11,1847	11,1652	19,5	0,8454656			

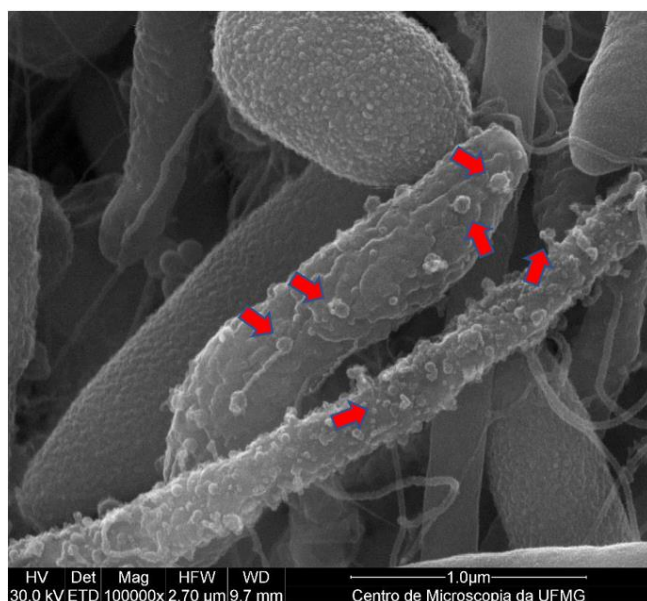
### 5.9.3.2.2 Microscopia de varredura dos biofilmes

As análises de MEV dos biofilmes associados as lâminas de vidro depositadas no reatores (Figura 26) demonstraram a presença de fagos aderidos às bactérias somente nos reatores tratados com fagos.

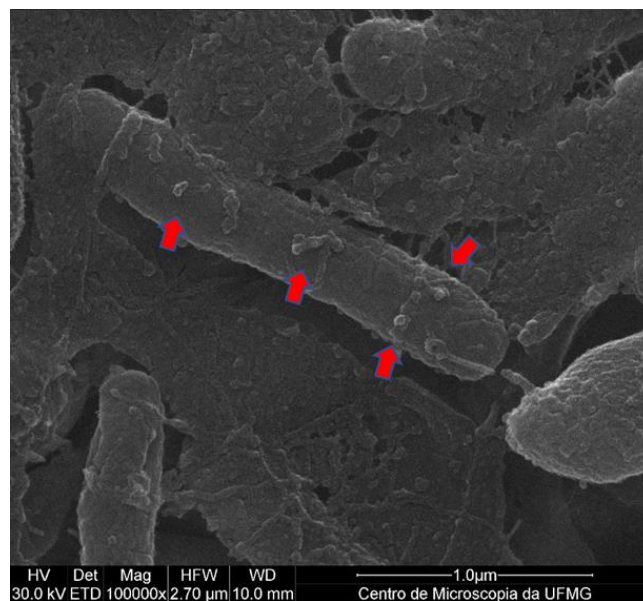
**Figura 26** Microscopias de varredura dos biofilmes presentes nas lâminas dos reatores R1(A) ; R2(B) e Reator controle (C e D)

A)

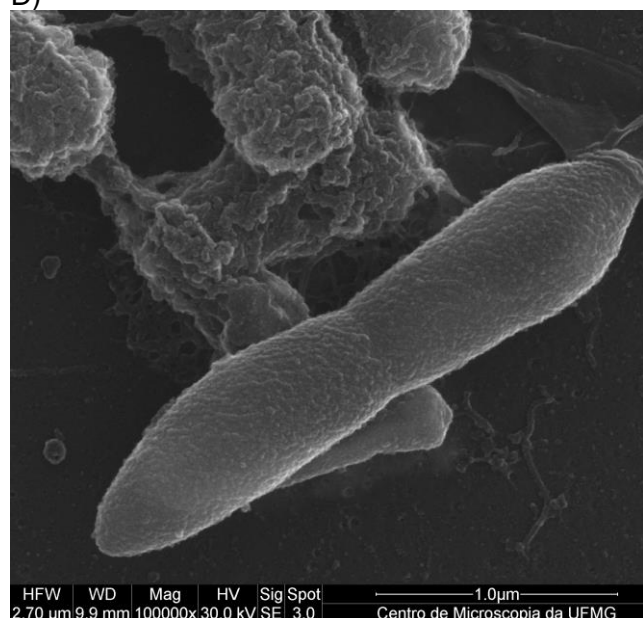
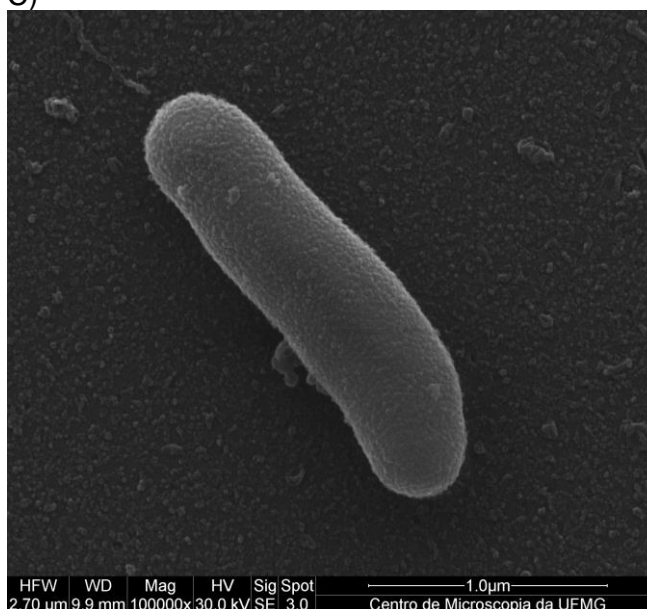
B)



C)



D)

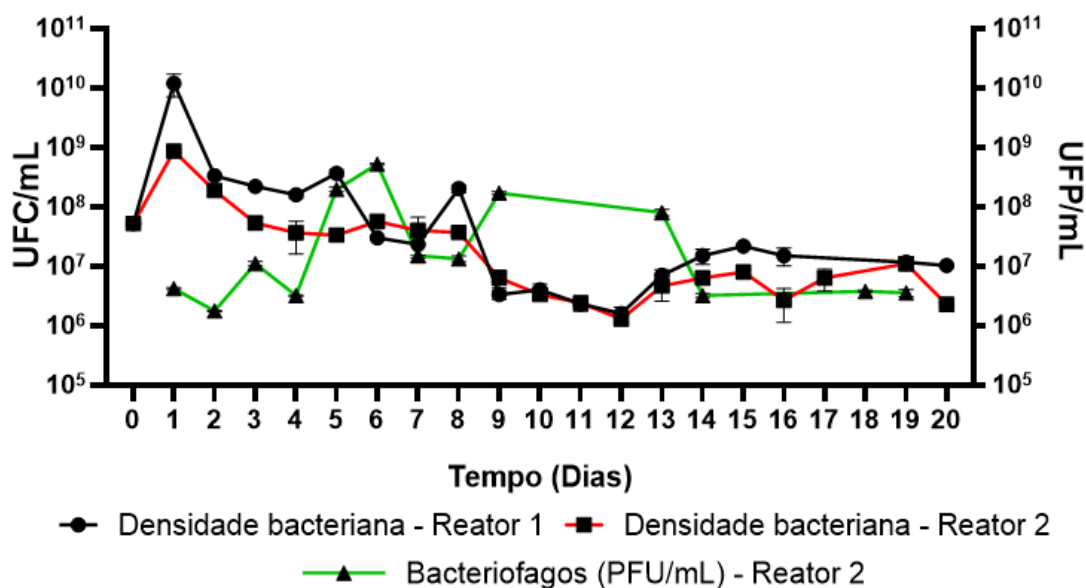


### **5.9.3.3 Ensaio comparativo de eficiência de controle bacteriano em experimento com inóculo de 6 gêneros bacterianos e dosagem diária de fagos**

Os resultados referentes à utilização de bacteriófagos como tratamento às bactérias planctônicas demonstraram que houve diminuição de densidade apenas em dez dos 21 dias de experimento. Durante os dias um e cinco do experimento e durante os dias 14 e 17, houve a diminuição de densidades bacterianas no reator 2 (R2 - tratado com fagos) de cerca de 10 vezes quando comparado ao controle (Reator 1 – não tratado com fagos). Nos demais dias, as densidades bacterianas dos dois

reatores permaneceram similares, demonstrando baixa eficiência dos fagos quando comparados aos experimentos anteriores.

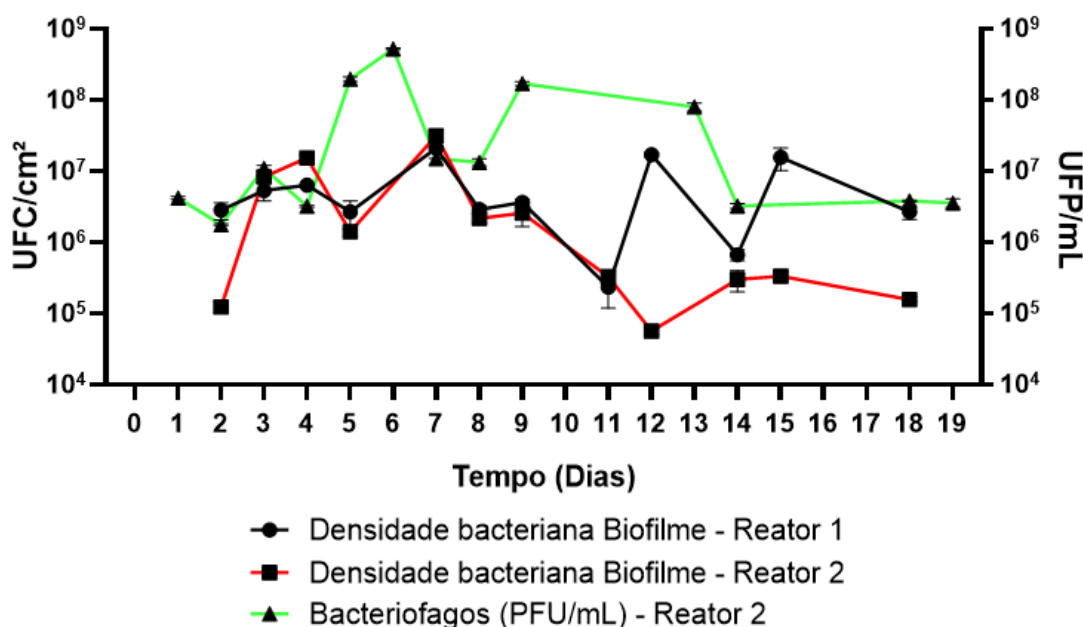
Gráfico 8 – Resultado do monitoramento das densidades bacterianas planctônicas representadas dos reatores 1 e 2 ( UFC/mL ) e das densidades de bacteriófagos no reator 2 (UFP/ml) durante 20 dias de experimento.



Os resultados referentes à densidade bacteriana séssil demonstram que a dinâmica de crescimento bacteriano foi semelhante entre o R1 e R2 durante os dias cinco ao dia dez. Durante o restante do período, foi possível observar que houve a diminuição de densidade bacteriana séssil entre  $10^1$  a  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> no R2 quando comparado ao controle.

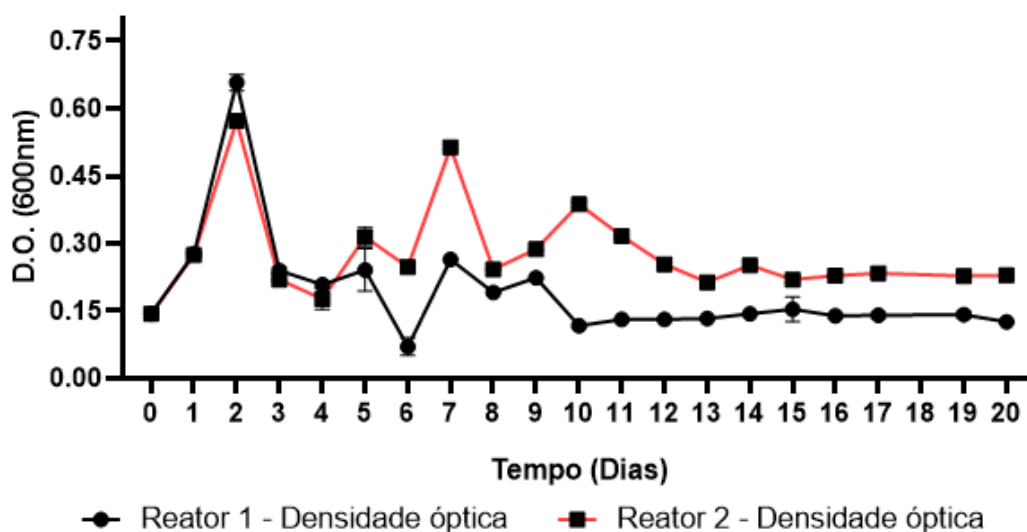
Além disso, é possível observar que mesmo adicionando diariamente uma concentração de fagos constante ( $10^6$  UFP/mL), houve incremento do título viral no sistema entre os dias quatro e quatorze do experimento. O aumento do título viral chegou a cerca de  $10^2$  UFC/mL entre os dias cinco e seis do experimento.

Gráfico 9 – Resultado de Monitoramento das densidades das comunidades bacterianas sésseis (UFC/cm<sup>2</sup>) dos reatores R1 e R2 e monitoramento dos bacteriófagos planctônicos (UFP/mL) presentes no R2 durante 20 dias de experimento.



Os resultados referentes aos níveis de turbidez apresentada pelos experimentos demonstraram que o reator controle apresentou menores índices de densidade óptica durante a duração dos testes. Entre os dias cinco e vinte, o reator controle apresentou menores níveis de densidade óptica quando comparado com o reator ao qual houve tratamento de bacteriófagos. Durante os dias zero a dia quatro, os dois reatores apresentaram dinâmicas semelhantes em respeito às densidades ópticas analisadas.

**Gráfico 10-** Resultado do monitoramento das densidades ópticas das águas sintéticas dos reatores R1 e R2 durante 20 dias de experimento.



## 6 DISCUSSÃO

Diversos fagos em estudo apresentaram a capacidade de lisar mais de um isolado bacteriano, de espécies e gêneros diferentes. Esse perfil é denominado de polivalência. Ela tem sido atribuída às modificações e ao surgimento de novas proteínas virais ligantes aos receptores bacterianos (SAMSON, 2013; LABRIE, 2010). Outros trabalhos como os de BUJAK (2020) e LE (2013) descreveram fagos isolados de *Serratia sp.* e *P. aeruginosa* com a característica de polivalência que indicaram, assim como os estudos anteriores, que segundo análise genômicas, os vírus em questão modularam seus receptores virais para apresentar um novo receptor que liga a célula bacteriana, o que possivelmente ocorre com os fagos analisados pela presente dissertação. Estudos sugerem também que os fagos de uma maneira geral podem codificar simultaneamente diferentes receptores com diferentes especificidades, resultando na capacidade de infectar um amplo espectro de hospedeiros bacterianos (SAMSON, 2013; CHATTERJEE, 2012; HYMAN, 2010).

Diversos receptores reconhecidos por fagos de *P. aeruginosa*, *Serratia sp* e *S. maltophilia* foram identificados até o momento, incluindo pili do tipo IV (KIM et al., 2012; RAKHUBA, 2010), o antígeno-O (LE et al., 2014), o antígeno polissacarídico comum (RIVERA et al., 1992), o oligossacarídeo central (TEMPLE et al., 1986) e as

proteínas externas da membrana (CHAN et al., 2016). Além disso, alguns fagos de *S.marcescens* e de *S. maltophilia* também podem utilizar flagelos bacterianos como receptores (GONZALEZ,2018), além da utilização de receptores secundários, como porinas, OmpF, OmpC e TolC (FAN,2018; NOBREGA,2018; SHEN,2021). Os bacteriófagos caracterizados no presente estudo podem apresentar similaridade a respeito do reconhecimento dos receptores bacterianos mencionados anteriormente, já que as bactérias aos quais os fagos foram isolados pelo presente estudo são as mesmas bactérias descritas nos estudos mencionados. Porém, análises proteômicas das proteínas virais ligantes aos receptores bacterianos devem ser conduzidas para atestar tais afirmações.

A partir das características morfológicas definidas a partir das imagens da microscopia de transmissão (MET) dos fagos utilizados nos experimentos, é possível classificar os mesmos segundo a antiga classificação do ICTV, que outrora se baseava na morfologia. Segundo a antiga classificação, os fagos 11.2.1; B1; 12.2.2, 18.1.4; 12.1.2; 12.1; P2 e 12.2.3 poderiam ser classificados como pertencentes a família *Siphoviridae* pois apresentam calda longa e capsídeo de morfologia icosaédrica. Já os fagos 3.1 e 18C, poderiam ser classificados como pertencentes a família *Podoviridae*, pois apresentaram capsídeo com simetria icosaédrica e calda muito curta, característica principal dos fagos desta família.

Segundo a nova classificação do ICTV, os fagos 12.1; 12.2.3; 12.1.2; 3.1 (94); 18c; P2; 18.1.4 e 11.2.1 são classificados filogeneticamente como pertencentes a classe *Caudoviricetes* e família *Mesyanzhinovviridae*. Segundo o novo modelo de classificação, tais fagos são pertencentes a tal família porque apresentam atividade lítica em indivíduos bacterianos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (TURNER, 2023). Já os bacteriófagos 12.2.2 e B1 podem ser classificados como pertencentes à classe *Caudoviricetes*. Para a classificação de tais fagos em nível filogenético de família, será necessária a análise genômica.

Os resultados referentes a determinação da relação densidade de fago/densidade de bactéria (MOI) que resultasse na maior lise das bactérias *S. maltophilia* 94 e *S. marcescens* PLA5 mostraram que as condições de maior número de partículas virais por bactéria (MOI 100) foram as melhores. Esse padrão se assemelha ao encontrado nos estudos de FANA EI (2022), PETERS (2020) WANG

(2022), nos quais maiores MOI resultaram em maior controle de bactérias dos gêneros *Stenotrophomonas* sp e *Serratia* sp.

Já nos ensaios de infecção com fagos de *P. aeruginosa* RLI17, foi observado o oposto, menores MOI resultando em maiores percentuais de redução do crescimento bacteriano. Resultados semelhantes também já foram observados em outros estudos feitos com fagos de *P. aeruginosa* (SILLANKORVA (2004); PINHEIRO (2019) e NIU (2009).

Um resultado importante do ensaio com infecção usando três bacteriófagos polivalentes para o controle de três bactérias foi o aumento na redução do crescimento, avaliada pela medida da densidade ótica, quando comparado aos valores observados nos ensaios individuais coma as três bactérias. A redução nos ensaios com somente um fago e uma bactéria foi de cerca de 35% (para a bactéria *S. marcescens* PLA5 e fago B1), enquanto no experimento com três fagos e três bactérias ela foi de 65%. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que os fagos B1 e 12.1.2 apresentam atividade lítica contra *S. marcescens* PLA5 e *S. maltophilia* 94, enquanto o fago 18.1.4 apresenta atividade lítica contra *P. aeruginosa* RLI 17 e *S. marcescens* PLA5, ampliando assim a chance de um maior número de células serem infectadas por um dos fagos presentes na mistura.

A maior efetividade de controle bacteriano pela utilização de mais de uma espécie de bacteriófago para combater uma bactéria também foi demonstrado em estudos como os de KAUPPINEN (2021), FU (2010), e ONG (2020), onde foi comprovado a maior eficiência do controle de *Pseudomonas* sp. pela utilização de coquetel de fagos; e nos estudos de TIAN (2019), PATRICK (2021) e PETERS (2020) no controle de *Serratia* e *Stenotrophomonas* com a utilização de mais de dois bacteriófagos para o controle de tais bactérias.

A utilização de tal estratégia de controle bacteriano pode representar uma solução ao surgimento de bactérias resistentes à fagoterapia, já que as bactérias resistentes a um fago específico que surgirem ao longo do tratamento poderiam ser eliminadas por outro fago constituinte do coquetel, evitando a seleção dessas variantes resistentes. Ademais, considerando que diferentes fagos podem apresentar diferentes proteínas de ligação a receptores bacterianos, que por sua vez podem se

traduzir em diferentes padrões de infecção. Assim, a ineficácia do controle usando um coquetel aconteceria somente se ocorresse mutação nos diversos genes bacterianos de forma simultânea para que a infectividade de todos os fagos não seja bem-sucedida, que estatisticamente é mais difícil de acontecer do que uma mutação que impeça um bacteriófago específico de infectar uma bactéria (COSTA et al., 2019; DUARTE et al., 2018; FISCHER et al., 2013; PEREIRA et al., 2016).

Outro objetivo do estudo foi mapear o comportamento bacteriolítico dos fagos frente a variação de temperatura e pH, condição passível de ser encontrada em sistemas de resfriamento, como forma de prever o sucesso da tecnologia quando aplicada em campo. Foi observado que alguns níveis de pH interferiram negativamente no controle bacteriano pelos fagos. Para os bacteriófagos de *S. marcescens* PLA5 (12.1.2; 11.2.1; 12.2.3; 12.2.2 e 12.1) eles corresponderam a pH 7,5; 8 e 8,5, sendo que esse último resultou na perda total de atividade lítica. Em contrapartida, segundo os experimentos realizados, a atividade de tais fagos foi estável nos pH 6,5 e 7. Já os fagos isolados de *P. aeruginosa* RLI 17 (B1; 18C; P2; 18.1.4) apresentaram estabilidade de atividade bacteriolítica nos pH 6,5 e 7. Tais efeitos podem estar associados diretamente a quatro fatores: a mudança conformacional das proteínas estruturais dos bacteriófagos; mudanças conformacionais das proteínas virais de ligação ao receptor bacteriano; a mudança conformacional das proteínas de membrana (receptor bacteriano do fago) ou efeito do pH no crescimento e ou viabilidade bacteriana. A mudança conformacional das proteínas que constituem a estrutura dos bacteriófagos pode levar à destruição de estruturas primordiais para a infecção do fago (SCHIVEN et al., 2016). Além disso, o pH pode interferir nas conformações proteicas das proteínas de membrana das bactérias, como o incluindo pili do tipo IV, o antígeno-O, flagelo e as proteínas externas da membrana de tal forma que afete negativamente a ligação entre fagos e bactérias (BRIERS et al., 2007). Outro fator que pode interferir na eficiência de controle bacteriano é a diminuição da atividade bacteriana em condições extremas de pH (6,5 a 8), como pode ser observado no item 5.5 e nos estudos de ROUSK et al. (2018) e ŠOŠTARIC et al. (2020).

A partir da diminuição da atividade bacteriana, causada pela redução da síntese proteica graças às mudanças conformacionais de aminoácidos, culmina na diminuição da produção de fagos pelo aparato bacteriano. Tais fatores podem

interferir negativamente no controle bacteriano pelos fagos em um sistema de resfriamento em escala real. Porém, para de fato entender a dimensão do impacto, mais testes devem ser conduzidos visando a elucidação das hipóteses acima.

Os resultados apresentados em relação ao comportamento lítico dos fagos em diferentes temperaturas também evidenciaram efeitos negativos significativos no controle bacteriano. Ao analisar o grupo de bacteriófagos isolados a partir de *S. marcescens* PLA5, observa-se maior estabilidade da atividade lítica nas temperaturas de 30°C, 35°C e 40°C e perda de atividade nas temperaturas de 45°C. Nos testes com *P. aeruginosa* RLI 17, a maior estabilidade foi observada também nas temperaturas de 30°C e 35°C, e perda de atividade nas maiores temperaturas avaliadas (40°C e 45°C). Esse efeito negativo das temperaturas mais altas podem ser resultado da inibição ou diminuição dos processos de síntese proteica das bactérias infectadas proporcionados pelo estresse térmico. A influência de temperatura na síntese proteica bacteriana pode interferir negativamente na etapa de multiplicação dos vírions, já que há necessidade de produção das estruturas virais a partir do metabolismo das bactérias (SILLANKORVA, 2004).

A avaliação do controle bacteriano por fagos em condições semelhantes às do local onde se deseja fazer uso da tecnologia, no nosso caso sistema de resfriamento industrial, é essencial para o sucesso da tecnologia em campo. No estudo, avaliamos coquetéis de fagos em reator de bancada alimentado com água sintética, que apresenta mesma composição das águas presentes nos sistemas de resfriamento analisados. Ademais, tanto as condições físico-químicas (como pH e temperatura) como os microrganismos testados nos presentes experimentos foram similares a um sistema de resfriamento convencional.

Os testes forneceram informações importantes sobre a interação entre os fagos e as bactérias presentes nesse ambiente, bem como as possíveis implicações para o controle microbiológico nesses sistemas.

O primeiro desafio do grupo foi estabelecer condição que resultasse em água sintética com densidade bacteriana estável ao longo do período de teste. A primeira condição testada, qual seja, água sintética sem adição de substrato orgânico que em um primeiro momento se mostrou o mais adequado, resultou em queda na densidade das populações, provavelmente devido à falta de fontes de carbono essenciais para

manutenção da viabilidade e crescimento bacteriano. Com o objetivo de corrigir essa limitação, no experimento subsequente aumentou-se o volume e periodicidade das purgas do sistema. Em tais experimentos foi possível observar os efeitos positivos da fagoterapia, indicados pela diminuição das densidades das bactérias sésseis e planctônicas. Apesar disso, ambos experimentos não apresentaram condições que propiciassem o estabelecimento das bactérias no sistema, percebido pela queda das densidades nos reatores controle. Considerando que essa falta de estabilidade pudesse interferir nos resultados, alteramos o sistema com a inclusão de duas bombas dosadoras para o aporte constante de água sintética no reator, bem como de purgas. Isso resultou em melhoria na constância da densidade de bactéria nos reatores controle. Nos reatores operando nessa nova condição, foi observada redução significativa na densidade bacteriana séssil, de cerca de 10 a 100 vezes em relação ao controle. Além disso, também se observou a diminuição da densidade bacteriana planctônica nos experimentos aos quais fagos foram adicionados em cerca de 2 a 10 vezes em relação ao controle, indicando que os fagos foram eficazes no controle de bactérias sésseis e planctônicas.

A efetividade do controle de biofilmes e bactérias planctônicas utilizando fagos polivalentes foi previamente reportada em estudos como FONG (2017), JAMAL (2017) e GUO (2017), que abordaram o tratamento de biofilmes produzidos por *P. aeruginosa*. Em outros estudos, como VIEIRA (2021) e DONLAN (2009), a efetividade foi avaliada em biofilmes de *S. marcescens*, enquanto MCCUTCHEON (2021) e FANAEL (2022) avaliaram a eficácia do tratamento de biofilmes de *S. maltophilia* por fagos polivalentes. Nos estudos mencionados anteriormente, foram relatadas reduções de densidade bacteriana sésseis entre 10 a 10<sup>3</sup> vezes e reduções de bactéria planctônica de cerca de 10 a 10<sup>5</sup> quando comparados aos experimentos controles.

As densidades de bacteriófagos durante os experimentos de maneira geral se mostraram variáveis nos testes aos quais eram adicionados um volume constante de bacteriófagos diariamente. Porém o experimento ao qual testou-se somente uma adição de bacteriófagos demonstrou que a partir do quarto dia de experimento houve a redução das densidades virais, expressas em UFP/mL no sistema. Tal diminuição pode estar relacionada aos efeitos do pH das águas sintéticas, que como discutido anteriormente pode afetar drasticamente a viabilidade dos fagos.

Os dados apresentados pelo monitoramento físico-químico dos reatores, demonstram que o pH médio dos sistemas podem variar entre 7,6 a 8,3. Os ensaios infectividade em diferentes condições de pH discutidos anteriormente, demonstraram que os fagos utilizados no sistema (12.1.2, B1 e 18.1.4) não apresentaram atividade lítica nas faixas de pH encontradas nos sistemas, justificando assim, a baixa eficiência de remoção de bactérias planctônicas nos experimentos.

Assim como os resultados dos experimentos anteriores, os resultados apresentados pelo experimento ao qual foram testados seis bacteriófagos para o controle de seis bactérias (*S. marcescens* PLA5 e fago B1; *S. maltophilia* 94 e fago 12.1.2 ; *P. aeruginosa* RLI 17 e fago: 18.1.4; *S. macrogoltabida* fago: P2; fago: PLA5 12.2.2 e bactéria alvo *B. pumilus*; e bactéria *Aciinetobacter sp* fago:12.3.3) não apresentaram resultados tão promissores a respeito de controle de bactérias planctônicas, como os resultados de controle de bactérias sésseis.

O controle de bactérias sésseis no sistema apresentou variação, diferentemente dos experimentos anteriores, porém, a partir do décimo primeiro dia de experimento, houve a diminuição da densidade bacteriana séssil entre 10 a 100 vezes quando comparado ao controle. Os resultados dos experimentos envolvendo os biorreatores, de maneira geral, apresentaram os mesmos perfis de controle bacterianos, o que pode denotar que os resultados apresentados refletem o mesmo cenário.

A partir da análise dos biofilmes, foi possível observar a presença de bacteriófagos nos biofilmes dos reatores aos quais foi adotado a fagoterapia como tratamento antibacteriano. A presença de fagos no biofilme demonstra que os fagos do sistema estão em contato com as bactérias em forma séssil, o que corrobora os resultados de decréscimo das densidades de tais microrganismos, denotando que a alteração das densidades pode estar relacionada diretamente com a presença de tais entidades virais. Além disso, vale ressaltar que estudos relativos à utilização de fagoterapia para controle de biofilmes bacterianos demonstram que uma gama de bacteriófagos pode secretar enzimas depolimerases que degradam a matriz EPS presentes nos biofilmes. Dentre eles, destacam-se os fagos isolados de *Pseudomonas sp.*, *S. maltophilia* e *S. marcescens* que podem produzir alginases, endolisinas, polissacarídeo despolimerase, f e gp16 (WONG, 2000; GLONTI, 2010; VIEIRA, 2021; LEE,2017; GLONTI, 2010; VIEIRA,2021; CHEGINI, 2020).

A partir dos estudos mencionados anteriormente, juntamente com o resultado da microscopia de varredura, é possível inferir que há grande probabilidade de que os fagos utilizados nos testes possam secretar enzimas despolimerases. Porém, é necessário a análise do material genético dos fagos em questão para poder afirmar de maneira contundente. Além disso, devem ser conduzidas pesquisas com a finalidade de melhor caracterização dos fagos do presente estudo, como por exemplo, analisar se os vírus estudo apresentam um halo túrbido ao redor da placa de lise, o que é uma característica fenotípica da produção de enzimas pelos fagos (ADBELKADER,2022).

Além disso, estudos de SCHULTZE (2021), HARIMAWAN (2017) e DEY (2020) referentes aos biofilmes formados por *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* e *S. marcescens*, demonstram que em biofilmes, o metabolismo bacteriano libera subprodutos ácidos, como por exemplo, em processos de degradação de glucanos e frutanos por enzimas extracelulares para a obtenção de monossacarídeos, que por sua vez podem ser metabolizados, liberando tais subprodutos (FULAZ,2019; COSTA OLIVEIRA,2017). A configuração estrutural dos biofilmes, faz com que os subprodutos ácidos secretados sejam mantidos dentro destas estruturas, criando um microambiente com condições de pH diferentes ao ambiente externo, ou planctônico no caso dos biorreatores do presente estudo (HOLMANN,2021). Assim como demonstrado através das análises de microscopias de varredura, os fagos do estudo em questão estão presentes no biofilme bacteriano. Segundo estudos apresentados, o pH do biofilme do sistema pode apresentar características mais ácidas quando comparados ao pH médio do sistema analisado. Graças a esta provável diminuição do pH no biofilme os bacteriófagos apresentaram maiores atividades bacteriológicas. Tal afirmação se baseia nos resultados apresentados pelo teste de infecção viral em diferentes pH, demonstrando que os fagos utilizados nos experimentos que simulam um sistema de resfriamento industrial (B1; 12.1.2; 11.2.1; 12.1.2; 12.2.2; 12.1; 18.1.4; P2; 18C); apresentam maiores atividades líticas quando submetidos a pH entre 6,5 e 7. Tal fato explica melhor porque em todos os experimentos analisados, houve maiores taxas de controle bacteriano sobre bactérias sésseis quando comparado às taxas de controle de bactérias planctônicas.

O controle de corrosão propiciado pelos fagos não pode ser efetivamente comprovado pelo experimento realizado. Segundo os resultados do mesmo, o

experimento controle (sem adição de fagos) não apresentou níveis de taxa de corrosão (expressos em *mpy*) que fossem danosos aos sistemas de resfriamento, já que se mantiveram em valores menores a 2 *mpy*. Segundo Flynn (2009), Suzuki (2009) e Gentil (2007) o valor encontrado no reator controle configura como excelente no ponto de vista de controle de corrosão. Portanto, será necessário a utilização de outras espécies bacterianas que apresentam maior potencial de corrosão em aço carbono para atestar o controle de fagos em tal material. Além disso, como não foram medidas as taxas de corrosão em cobre e aço inox não há como entender de forma mais global a corrosão propiciada pelas bactérias analisadas nos sistemas.

## **7 CONCLUSÃO**

A partir da análise dos resultados, é possível afirmar que no reator analisado, os bacteriófagos apresentaram-se uma solução interessante para o controle de bactérias sésseis. Porém, novos estudos devem ser conduzidos para entender melhor a dinâmica de controle bacteriano em relação às bactérias planctônicas. Além disso, vale ressaltar que estudos visando a caracterização em relação às características bacteriolíticas dos 24 fagos não caracterizados devem ser realizados, com o objetivo de elucidar e comparar se tais fagos podem apresentar melhores performances em relação ao controle bacteriolítico do sistema.

Além disso, novos estudos visando o estudo comparativo em relação às técnicas usualmente empregadas para o controle bacteriano em sistemas de resfriamento industrial e a utilização de fagos devem ser realizados para atestar a viabilidade do tratamento em questão em escala real.

## REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, Hans-W. Phage classification and characterization. In: **Bacteriophages**. Humana press, 2009. p. 127-140.
- ABDELKADER, Karim et al. The specific capsule depolymerase of phage PMK34 sensitizes acinetobacter baumannii to serum killing. **Antibiotics**, v. 11, n. 5, p. 677, 2022.
- ALI AL-KAABI, Naama Abdulla. The Use Of Bacteriophages To Control Legionella Spp. In Environmental Water Samples. 2018.
- ALLISON, David G. The biofilm matrix. **Biofouling**, v. 19, n. 2, p. 139-150, 2003.
- ALMEIDA, M. A. N.; DE FRANÇA, F. P. Biofilm formation on brass coupons exposed to a cooling system of an oil refinery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 39-44, 1998.
- ALMEIDA, M. S. et al. Estudo da adesão de bactérias em superfícies hospitalares. **Revista Científica da FASETE**, v. 3, n. 1, p. 107-121, 2021.
- ARCIOLA, Carla Renata et al. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012.
- ARULIAH, Rajasekar; TING, Yen-Peng. Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from water in a cooling tower. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, 2014.
- ASHRAF, Muhammad Aqeel et al. Green biocides, a promising technology: current and future applications to industry and industrial processes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 3, p. 388-403, 2014.
- ASLAM, Bilal et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 1645, 2018.
- BALOGH, Botond; NGA, Nguyen Thi Thu; JONES, Jeffrey B. Relative level of bacteriophage multiplication in vitro or in phyllosphere may not predict in planta efficacy for controlling bacterial leaf spot on tomato caused by Xanthomonas perforans. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2176, 2018.
- BARASUOL, Bibiana Martins et al. Novos bacteriófagos de Staphylococcus aureus oriundos de leite bovino: isolamento, caracterização e atividade antibiofilme bacteriano. 2021. Tese de Doutorado. **Universidade Federal de Santa Maria**.

BAUTISTA, Blanca E. Torres et al. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) from *Pseudomonas NCIMB 2021* on the corrosion behaviour of 70Cu–30Ni alloy in seawater. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 737, p. 184-197, 2015.

BEAUSSART, Audrey et al. Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. **ACS nano**, v. 8, n. 10, p. 10723-10733, 2014.

BEECH, I. B. et al. **Biofilms and biocorrosion. Understanding biocorrosion**, p. 33-56, 2014.

BEECH, Iwona B.; SUNNER, Jan. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 181-186, 2004.

BENSON, D A, Karsch-Mizrachi, I, Lipman, D J, Ostell, J and Wheeler, D L. 2004. GenBank: update. **Nucleic Acids Res**, 32: D23–D26

BERENDONK, Thomas U. et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 310-317, 2015.

BERTOZZI SILVA, Juliano; STORMS, Zachary; SAUVAGEAU, Dominic. Host receptors for bacteriophage adsorption. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 4, p. fnw002, 2016.

BORENSTEIN, S. W. Microbiologically influenced corrosion handbook. In: **Fuel and Energy Abstracts**. 1996. p. 66.

BOSE, Arpita et al. Electron uptake by iron-oxidizing phototrophic bacteria. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2014.

BOTT, T. Biofouling control in cooling water. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2009, 2009.

BREITBART, Mya et al. Phage puppet masters of the marine microbial realm. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 754-766, 2018.

BRIERS, Yves et al. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages  $\phi$ KZ and EL. **Molecular microbiology**, v. 65, n. 5, p. 1334-1344, 2007.

BROCK, T. D. *Microbiologia ambiental*. 16. ed. São Paulo: Pearson, 2019.

BROOUN, Alexei; LIU, Songhua; LEWIS, Kim. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 640-646, 2000.

BRUGNONI L, Lozano J and Cubitto M. Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. **Food Res Int** 2007; 40(3): 332–340.

BRUM, Jennifer R.; SCHENCK, Ryan O.; SULLIVAN, Matthew B. Global morphological analysis of marine viruses shows minimal regional variation and dominance of non-tailed viruses. **The ISME journal**, v. 7, n. 9, p. 1738-1751, 2013.

BUJAK, Katarzyna et al. Identification, characterization, and genomic analysis of novel Serratia temperate phages from a gold mine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6709, 2020.

BUSALMEN, J. P.; FRONTINI, M. A.; DE SÁNCHEZ, S. R. **Developments in Marine Corrosion. 1998.**

CAFORA, Marco et al. Phage therapy against Pseudomonas aeruginosa infections in a cystic fibrosis zebrafish model. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

CASTRO, Hector F.; WILLIAMS, Norris H.; OGRAM, Andrew. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2000.

CAVALLARO, Alessio et al. Potential probiotic approaches to control Legionella in engineered aquatic ecosystems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 98, n. 8, p. fiac071, 2022.

CENENS, William et al. Phage–host interactions during pseudolysogeny: Lessons from the *Pid/dgo* interaction. **Bacteriophage**, v. 3, n. 1, p. e1003269, 2013.

CEYHAN, N. & Ozdemir, G. 2008 Extracellular polysaccharides produced by cooling water tower biofilm bacteria and their possible degradation. **Biofouling** 24, 129–135

CHAN, Benjamin K. et al. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR Pseudomonas aeruginosa. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 26717, 2016.

CHANDRASATHEESH, C.; JAYAPRIYA, J. Biocorrosion. **Bioelectrochemical Interface Engineering**, p. 77-90, 2019.

CHATTERJEE, Arijit Kumar; CHAKRABORTY, Ruchira; BASU, Tarakdas. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 25, n. 13, p. 135101, 2014.

CHATTERJEE, Sujoy; ROTHENBERG, Eli. Interaction of bacteriophage  $\lambda$  with its E. coli receptor, LamB. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 3162-3178, 2012.

CHEGINI, Zahra et al. Bacteriophage therapy against Pseudomonas aeruginosa biofilms: A review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, p. 1-17, 2020.

CHEN, Jianwen et al. Bacterial heavy-metal and antibiotic resistance genes in a copper tailing dam area in northern China. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1916, 2019.

CHIRKUNOV, Alexander; KUZNETSOV, Yurii. Corrosion inhibitors in cooling water systems. In: Mineral Scales and Deposits. **Elsevier**, 2015. p. 85-105.

CHOI, D. H., Noh, J. H., Yu, O. H. & Kang, Y. S. 2010 Bacterial diversity in biofilms formed on condenser tube surfaces in a nuclear power plant. **Biofouling** 26, 953–959

CHOI, Hyo Ju; KIM, Minsik. Improved bactericidal efficacy and thermostability of *Staphylococcus aureus*-specific bacteriophage SA3821 by repeated sodium pyrophosphate challenges. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

CHOUDHARY, S. G. Emerging microbial control issues in cooling water systems. **Hydrocarbon processing**, v. 77, n. 5, 1998.

CLOETE, Eugene; FLEMMING, Hans-Curt. Environmental impact of cooling water treatment for biofouling and biocorrosion control. In: **Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems**. Springer, Boston, MA, 2012. p. 303-314.

CLOETE, Thomas Eugene; JACOBS, Liesel; BRÖZEL, Volker Siegfried. The chemical control of biofouling in industrial water systems. **Biodegradation**, v. 9, n. 1, p. 23-37, 1998.

CORNELISSEN, Anneleen et al. Identification of EPS-degrading activity within the tail spikes of the novel *Pseudomonas putida* phage AF. **Virology**, v. 434, n. 2, p. 251-256, 2012.

CORTINOVIS, Giorgia Francine; SONG, Tah Wun. Funcionamento de uma torre de resfriamento de água. **Revista de Graduação da Engenharia Química**, Sao Paulo, SP, v. 6, n. 14, p. 5-10, 2006.

COSTA OLIVEIRA, Bárbara Emanoele; CURY, Jaime Aparecido; RICOMINI FILHO, Antônio Pedro. Biofilm extracellular polysaccharides degradation during starvation and enamel demineralization. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0181168, 2017.

CRITCHLEY, M.; BENTHAM, Richard. The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 3, p. 784-789, 2009.

DA SILVA, S.; BASSÉGUY, R.; BERGEL, A. The role of hydrogenases in the anaerobic microbiologically influenced corrosion of steels. **Bioelectrochemistry**, v. 56, n. 1-2, p. 77-79, 2002.

DANG, Hongyue et al. Molecular characterization of putative biocorroding microbiota with a novel niche detection of Epsilon-and Zetaproteobacteria in Pacific Ocean coastal seawaters. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 3059-3074, 2011.

DANIS-WLODARCZYK, Katarzyna M.; WOZNIAK, Daniel J.; ABEDON, Stephen T. Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: in vitro, in vivo and clinical application. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1497, 2021.

DAVIES DG, Parsek MR, Pearson JP, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science** 1998; 280(5361): 295–298.

DAVIS, C. M.; MCCUTCHEON, J. G.; DENNIS, J. J. Aztreonam Lysine Increases the Activity of Phages E79 and phiKZ against *Pseudomonas aeruginosa* PA01. **Microorganisms** 2021, 9, 152. 2021.

DE JONGE, Patrick A. et al. Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range. *Trends in microbiology*, v. 27, n. 1, p. 51-63, 2019. De Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J., & Dutilh, B. E. (2018). Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. **Trends in Microbiology**. doi:10.1016/j.tim.2018.08.006

DE JONGE, Patrick A. et al. Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 1, p. 51-63, 2019.

DEY, Anindya Sundar et al. Biodegradation of unpretreated low-density polyethylene (LDPE) by *Stenotrophomonas* sp. and *Achromobacter* sp., isolated from waste dumpsite and drilling fluid. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 603210, 2020.

DEYAB, M. A. Electrochemical investigations on pitting corrosion inhibition of mild steel by provitamin B5 in circulating cooling water. **Electrochimica Acta**, v. 202, p. 262-268, 2016.

DIAS, Edgard; EBDON, James; TAYLOR, Huw. The application of bacteriophages as novel indicators of viral pathogens in wastewater treatment systems. **Water research**, v. 129, p. 172-179, 2018.

DIAS, Roberto Sousa. Controle de biofilmes em membranas de osmose inversa através de bacteriófagos. 2014.

DICKINSON GM and Bisno AL. Infections associated with indwelling devices: infections related to extravascular devices. **Antimicrob Agents Chemother** 1989; 33(5): 602–607.

DION, Moira B.; OECHSLIN, Frank; MOINEAU, Sylvain. Phage diversity, genomics and phylogeny. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 125-138, 2020.

DOLEJŠ, Igor; REBROŠ, Martin; ROSENBERG, Michal. Immobilisation of *Clostridium* spp. for production of solvents and organic acids. **Chemical Papers**, v. 68, n. 1, p. 1-14, 2014.

DONLAN RM. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis** 2002; 8(9): 881–890.

DONLAN, Rodney M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 2, p. 66-72, 2009.

DOSS, Janis et al. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 50, 2017.

DUBIEL, M. et al. Microbial iron respiration can protect steel from corrosion. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1440-1445, 2002.

EBERHARD A, Burlingame A, Eberhard C, et al. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. **Biochemistry** 1981; 20(9): 2444–2449.

EDUOK, Ubong; FAYE, Omar; SZPUNAR, Jerzy. Effect of benzothiazole biocide on SRB-induced biocorrosion of hot-dip galvanized steel. **Engineering Failure Analysis**, v. 93, p. 111-121, 2018.

ELKIND, R. Tratamento de Água de Resfriamento. Rio de Janeiro: **PETROBRÁS**, 1996.

FAGERLUND, Annette et al. Biofilm matrix composition affects the susceptibility of food associated staphylococci to cleaning and disinfection agents. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 856, 2016.

FAN, Fenxia et al. The outer-membrane protein TolC of *Vibrio cholerae* serves as a second cell-surface receptor for the VP3 phage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 11, p. 4000-4013, 2018.

FANAEI PIRLAR, Rima et al. Novel *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteriophage as Potential Therapeutic Agent. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p. 2216, 2022.

FENG, Guoping et al. Alumina surfaces with nanoscale topography reduce attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* and *Listeria* spp. **Biofouling**, v. 30, n. 10, p. 1253-1268, 2014.

FERNANDES, Trinette et al. Current and novel approaches for control of dental biofilm. **International journal of pharmaceutics**, v. 536, n. 1, p. 199-210, 2018.

FLYNN, D. J. The Nalco Water Handbook, **Nalco Company**, 3a Edição, 2009.

FONG, Stephanie A. et al. Activity of bacteriophages in removing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic rhinosinusitis patients. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 418, 2017.

FONSECA, Inês TE et al. The influence of the media on the corrosion of mild steel by *Desulfovibrio desulfuricans* bacteria: an electrochemical study. **Electrochimica Acta**, v. 43, n. 1-2, p. 213-222, 1998.

FOSTER, Simon J. Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/4. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 19, p. 5723-5725, 1995.

FRANKLIN, Michael J.; WHITE, David C.; ISAACS, Hugh S. Pitting corrosion by bacteria on carbon steel, determined by the scanning vibrating electrode technique. **Corrosion Science**, v. 32, n. 9, p. 945-952, 1991.

FU, Weiling et al. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 397-404, 2010.

FULAZ, Stephanie et al. Ratiometric imaging of the in situ pH distribution of biofilms by use of fluorescent mesoporous silica nanosensors. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11, n. 36, p. 32679-32688, 2019.

FUQUA C, Winans SC and Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. **Annu Rev Microbiol** 1996; 50(1): 727–751

GAMBINO, Michela et al. Phage S144, a new polyvalent phage infecting *Salmonella* spp. and *Cronobacter sakazakii*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5196, 2020.

GAN, Han Ming et al. Biodegradation of 4-aminobenzenesulfonate by *Ralstonia* sp. PBA and *Hydrogenophaga* sp. PBC isolated from textile wastewater treatment plant. **Chemosphere**, v. 82, n. 4, p. 507-513, 2011.

GENTIL, V. Corrosão. 5a Edição. Editora LTC, 368p, 2007.

GIBB, Bryan P.; HADJIARGYROU, Michael. Bacteriophage therapy for bone and joint infections: an instructional review. **The Bone & Joint Journal**, v. 103, n. 2, p. 234-244, 2021.

GILBERT P, Evans D and Brown M. Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ. **J Appl Bacteriol** 1993; 74(S22): 67S–78S

GIRI, Nabanita. Bacteriophage Structure, Classification, Assembly and Phage Therapy. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 18, n. 2, p. 239-250, 2021.

GLONTI, T.; CHANISHVILI, N.; TAYLOR, P. W. Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of applied microbiology**, v. 108, n. 2, p. 695-702, 2010.

GOMES, L. C.; TAVARES, L. F. F.; DIAS, J. C. T. Análise microbiológica de águas residuárias de um matadouro-frigorífico no município de Jequié, Bahia. In: **Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas**, 2., 2003, Poços de Caldas. Anais eletrônicos... Poços de Caldas: Universidade Federal de Alfenas, 2003.

GONG, Jinzhe et al. Experimental study of dynamic effects of iron bacteria–formed biofilms on pipeline head loss and roughness. **Journal of Water Resources Planning and Management**, v. 145, n. 9, p. 04019038, 2019.

GONZALEZ, Floricel et al. More than rotating flagella: Lipopolysaccharide as a secondary receptor for flagellotropic phage 7-7-1. **Journal of bacteriology**, v. 200, n. 19, p. e00363-18, 2018.

GONZÁLEZ-GÓMEZ, Jean Pierre et al. Efficacy of Novel Bacteriophages against *Escherichia coli* Biofilms on Stainless Steel. **Antibiotics**, v. 10, n. 10, p. 1150, 2021.

GROYSMAN, Alec. Nondestructive Testing and Corrosion Monitoring. **Non-Destructive Evaluation of Corrosion and Corrosion-assisted Cracking**, p. 261, 2019.

GRYGORCEWICZ, Bartłomiej et al. Rotating magnetic field-assisted reactor enhances mechanisms of phage adsorption on bacterial cell surface. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 44, n. 3, p. 1316-1325, 2022.

GÜNGÖR, Nihal Dođruöz et al. Effect of mixed-species biofilm on copper surfaces in cooling water system. **Journal of Materials Engineering and Performance**, v. 24, n. 2, p. 848-858, 2015.

GUO, Mingquan et al. A novel antimicrobial endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 293, 2017.

HALL-STOODLEY, Luanne; COSTERTON, J. William; STOODLEY, Paul. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HAMILTON, W. A. Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. **Biofouling**, v. 19, n. 1, p. 65-76, 2003.

HANTULA, J. et al. Ecology of bacteriophages infecting activated sludge bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2147-2151, 1991.

HARIMAWAN, Ardiyan et al. Influence of Initial Ph Solution on Biofilm Formation and Corrosion of Carbon Steel by *Serratia marcescens*. **Reaktor**, v. 17, n. 2, p. 89-95, 2017.

HARPER, David R. et al. Bacteriophages and biofilms. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 270-284, 2014.

HAY, Iain D.; LITHGOW, Trevor. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. **EMBO reports**, v. 20, n. 6, p. e47427, 2019.

HEFFRON, Joe; MCDERMID, Brad; MAYER, Brooke K. Bacteriophage inactivation as a function of ferrous iron oxidation. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 5, n. 7, p. 1309-1317, 2019.

HERNANDEZ-MONTELONGO, Jacobo et al. Antibacterial effect of hyaluronan/chitosan nanofilm in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* wild type, and IV pili and LPS mutant strains. **Surfaces and Interfaces**, v. 26, p. 101415, 2021.

HERRO, Harvey M.; PORT, Robert D. **NALCO Guide to Cooling Water**. McGraw-Hill, Inc, 1993.

HILL, Gerald Bowen; PRING, E. J.; OSBORN, Peter D. Cooling towers: principles and practice. **Butterworth-Heinemann**, 2013.

HIRSCHHAUSEN, Nina et al. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 12, p. 1746-1764, 2010.

HOLLMANN, Birte et al. Fluorescent nanosensors reveal dynamic pH gradients during biofilm formation. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 7, n. 1, p. 50, 2021.

HORI, Katsutoshi; MATSUMOTO, Shinya. Bacterial adhesion: from mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 424-434, 2010.

HOWARD-VARONA, Cristina et al. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. **The ISME journal**, v. 11, n. 7, p. 1511-1520, 2017.

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

ILHAN-SUNGUR, Esra et al. Isolation of a sulfide-producing bacterial consortium from cooling-tower water: evaluation of corrosive effects on galvanized steel. **Anaerobe**, v. 43, p. 27-34, 2017.

IVERSON, W. P.; OLSON, G. J. Anaerobic corrosion by sulfate-reducing bacteria due to highly reactive volatile phosphorus compound. **Microbial corrosion**, p. 46-53, 1983.

JAMAL, Muhsin et al. Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. **Journal of basic microbiology**, v. 59, n. 2, p. 123-133, 2019.

JAMAL, Muhsin et al. Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995. **Life sciences**, v. 190, p. 21-28, 2017.

JASSIM SAA, Limoges RG (2014) Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages 'The Living Drugs'. **World J Microbiol Biotechnol** 30(8):2153–2170. doi:10.1007/s11274-014-1655-7

JASSIM, Sabah AA; LIMOGES, Richard G.; EL-CHEIKH, Hassan. Bacteriophage biocontrol in wastewater treatment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 70, 2016.

Jensen E. C. et al. 1998. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:575–580.

JIA, Ru et al. Mitigation of a nitrate reducing *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and anaerobic biocorrosion using ciprofloxacin enhanced by D-tyrosine. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

JIN, Juntao et al. Effect of extracellular polymeric substances on corrosion of cast iron in the reclaimed wastewater. **Bioresource technology**, v. 165, p. 162-165, 2014.

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

KALATZIS, Panos G. et al. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages,  $\phi$ St2 and  $\phi$ Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0151101, 2016.

KARKMAN, Antti et al. Antibiotic-resistance genes in waste water. **Trends in microbiology**, v. 26, n. 3, p. 220-228, 2018.

KAUPPINEN, Ari et al. Phage biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa* in water. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 928, 2021.

KHAN, M. A. et al. Bacteriophage-host interaction in the enhanced biological phosphate removing activated sludge system. *Water Science and Technology*, v. 46, n. 1-2, p. 39-43, 2002. Khan MA, Satoh H, Mino T, Katayama H, Kurisu F, Matsuo T (2002b) Bacteriophage-host interaction in the enhanced biological phosphate removing activated sludge system. **Water Sci Technol** 46:39–43

KHAN, Munawwar Ali et al. Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. *Water research*, v. 36, n. 13, p. 3364-3370, 2002. Khan S. T., Sataoh H., Katayama H., Kurisu F., and Mino T. 2002. Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. **Water Res.** 36:3364–3370

KIM, Shukho et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage PA1Ø requires type IV pili for infection and shows broad bactericidal and biofilm removal activities. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 17, p. 6380-6385, 2012.

KOBRIN, Gregory. A practical manual on microbiologically influenced corrosion. **G. Kobrin, Editor, published 1993 by NACE, 250**, 1993.

KONOPACKI, Maciej et al. PhageScore: A simple method for comparative evaluation of bacteriophages lytic activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107652, 2020.

KORBER DR, Lawrence JR, Lappin-Scott HM, et al. Growth of microorganisms on surfaces. **Microbial Biofilms** 1995; 15–45.

KOSKELLA, Britt; MEADEN, Sean. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. **Viruses**, v. 5, n. 3, p. 806-823, 2013.

LABRIE, Simon J.; SAMSON, Julie E.; MOINEAU, Sylvain. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 317-327, 2010.

LACQUA, Andrea et al. Emergence of biofilm-forming subpopulations upon exposure of *Escherichia coli* to environmental bacteriophages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 956-959, 2006.

LAVERTY, Garry; GORMAN, Sean P.; GILMORE, Brendan F. Biofilms and implant-associated infections. **Biomaterial and Medical Device Associated Infection**, p. 19-45, 2015.

LAWRENCE, Dylan; BALDRIDGE, Megan T.; HANDLEY, Scott A. Phages and human health: more than idle hitchhikers. **Viruses**, v. 11, n. 7, p. 587, 2019.

LE, Shuai et al. Chromosomal DNA deletion confers phage resistance to *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 4738, 2014.

LE, Shuai et al. Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. e68562, 2013.

LEE, Jae Yun; LI, Zhiqun; MILLER, Eric S. *Vibrio* phage KVP40 encodes a functional NAD<sup>+</sup> salvage pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 199, n. 9, p. e00855-16, 2017.

LI, Huabing et al. Microbiologically influenced corrosion of 2707 hyper-duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

LI, Xiao Lei et al. Biocorrosion of mild steel and copper used in cooling tower water and its control. **3 Biotech**, v. 8, n. 3, p. 1-11, 2018.

LIU, H.; XU, L.; ZENG, J. Role of corrosion products in biofilms in microbiologically induced corrosion of carbon steel. **British corrosion journal**, v. 35, n. 2, p. 131-135, 2000.

LIU, Hongwei et al. The corrosion behavior and mechanism of carbon steel induced by extracellular polymeric substances of iron-oxidizing bacteria. **Corrosion Science**, v. 114, p. 102-111, 2017.

LIU, T. et al. Growth characteristics of thermophile sulfate-reducing bacteria and its effect on carbon steel. **Materials and corrosion**, v. 60, n. 3, p. 218-224, 2009.

LIU, Yang et al. Role of bacterial adhesion in the microbial ecology of biofilms in cooling tower systems. **Biofouling**, v. 25, n. 3, p. 241-253, 2009.

LOC-CARRILLO, Catherine; ABEDON, Stephen T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 111-114, 2011.

ŁOŚ, Marcin; WĘGRZYN, Grzegorz. Pseudolysogeny. **Advances in virus research**, v. 82, p. 339-349, 2012.

MACDONALD, R. & Brözel, V. S. 2000 Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent in situ hybridization with rRNA targeted oligonucleotide probes. **Water Res.** 34, 2439–2446

MACHADO, L. P. Reúso de Esgotos Sanitários Ttratados para Fins de Água de Reposição em Torres de Resfriamento. **Tese (Mestrado em Engenharia Ambiental)**. UERJ. RJ, 181p, 2004.

MACHALELA, Angélica Agostinho. Uso de bacteriófagos como alternativa de conservação de leite em Moçambique. 2016.

MACK D, Fischer W, Krokotsch A, et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **J Bacteriol** 1996; 178(1): 175–183.

MAH, Thien-Fah C.; O'TOOLE, George A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MAKKY, Salsabil et al. The Bacteriophage Decides Own tracks: When They are with or Against The Bacteria. **Current Research in Microbial Sciences**, p. 100050, 2021.

MANCUSO, Pedro Caetano Sanches et al. **Reúso de água para torres de resfriamento**. FSP/USP, 2001.

MARRONI, Igor V.; SCHINKE, Claudia; GERMANI, José C. Nova proposta para uso de bacteriófagos no controle de mancha foliar em repolho, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 1, p. 142-155, 2013.

MARSZALEK DS, SM Gerchakov and LR Udey. 1979. Influence of substrate composition on marine microfouling. **Appl Environ Microbiol** 38: 987–995.

MATHIEU, Jacques et al. Going viral: emerging opportunities for phage-based bacterial control in water treatment and reuse. **Accounts of chemical research**, v. 52, n. 4, p. 849-857, 2019.

MATIJAŠEVIĆ, Lj; VUČKOVIĆ, A.; DEJANOVIĆ, I. Analysis of cooling water systems in a petroleum refinery. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 28, n. 4, p. 451-457, 2014.

MATTILA-SANDHOLM, Tiina; WIRTANEN, Gun. Biofilm formation in the industry: a review. **Food reviews international**, v. 8, n. 4, p. 573-603, 1992.

MCCULLOR, Kimberly et al. Genomic sequencing of high-efficiency transducing streptococcal bacteriophage A25: consequences of escape from lysogeny. **Journal of bacteriology**, v. 200, n. 23, p. e00358-18, 2018.

MCCUTCHEON, Jaclyn G.; DENNIS, Jonathan J. The potential of phage therapy against the emerging opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1057, 2021.

MENG, Fangang et al. Fouling in membrane bioreactors: an updated review. **Water research**, v. 114, p. 151-180, 2017.

MERCAN DOGAN, Nazime; KANTAR, Cetin; DOGAN, Goksel. Effect of chromium and organic acids on microbial growth and exopolymeric substance production by *Pseudomonas* bacteria. **Clean–Soil, Air, Water**, v. 42, n. 5, p. 674-681, 2014.

MILLER, Richard D.; KOEBEL, D. Anne. Legionella prevalence in cooling towers: association with specific biocide treatments. **ASHRAE transactions**, v. 112, n. 1, 2006.

MIRETE, Salvador; MORGANTE, Verónica; GONZÁLEZ-PASTOR, José Eduardo. Functional metagenomics of extreme environments. **Current opinion in biotechnology**, v. 38, p. 143-149, 2016.

MOORE, E. S. D'Herelle's bacteriophage in relation to plant parasites. **South African Journal of Science**, v. 23, n. 12, p. 306, 1926.

MORALES, J. et al. The role of *Pseudomonas aeruginosa* on the localized corrosion of 304 stainless steel. **Corrosion science**, v. 34, n. 9, p. 1531-1540, 1993.

MORENO, Diego A. et al. Biofilm formation on mild steel coupons by *Pseudomonas* and *Desulfovibrio*. **Biofouling**, v. 7, n. 2, p. 129-139, 1993.

MOTLAGH, Amir Mohaghegh; BHATTACHARJEE, Ananda Shankar; GOEL, Ramesh. Biofilm control with natural and genetically-modified phages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 67, 2016.

NIKOLICH, Mikeljon P.; FILIPPOV, Andrey A. Bacteriophage therapy: developments and directions. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 135, 2020.

NIU, Y. D. et al. Host range and lytic capability of four bacteriophages against bovine and clinical human isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 2, p. 646-656, 2009.

NOBREGA, Franklin L. et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 760-773, 2018.

ONG, Soo Peng et al. Characterization of *Pseudomonas* lytic phages and their application as a cocktail with antibiotics in controlling *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 129, n. 6, p. 693-699, 2020.

ORSINGER-JACOBSEN, Samantha J. et al. Use of a stainless steel washer platform to study *Acinetobacter baumannii* adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces. **Microbiology**, v. 159, n. Pt 12, p. 2594, 2013.

PAGE, Sue; GAYLARDE, Christine. Biocide activity against Legionella and Pseudomonas. **International Biodeterioration**, v. 26, n. 2-4, p. 139-148, 1990.

PANIAGUA, Adriana Torres et al. Impact of temperature on Legionella pneumophila, its protozoan host cells, and the microbial diversity of the biofilm community of a pilot cooling tower. **Science of the Total Environment**, v. 712, p. 136131, 2020.

PARSEK, Matthew R.; GREENBERG, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 1, p. 27-33, 2005.

PATHAK, Puneet et al. Slime control in paper mill using biological agents as biocides. **Physical Sciences Reviews**, 2021.

PATRICK, Beau Jack. Smarcs vs Serratia: Characterising Novel Phages to Combat Serratia marcescens. 2021.

PEDERSEN, Amelie; KJELLEBERG, Staffan; HERMANSSON, Malte. A screening method for bacterial corrosion of metals. **Journal of microbiological methods**, v. 8, n. 4, p. 191-198, 1988.

PELYUNTHA, Wattana; VONGKAMJAN, Kitiya. Combined effects of Salmonella phage cocktail and organic acid for controlling Salmonella Enteritidis in chicken meat. **Food Control**, p. 108653, 2021.

PEREIRA, Alyne Duarte. Reatores com atividade anammox para o pós-tratamento de digestato de resíduo alimentar: Avaliação de diferentes estratégias de aeração e da comunidade microbiana. 2018.

PETERS, Danielle L.; MCCUTCHEON, Jaclyn G.; DENNIS, Jonathan J. Characterization of novel broad-host-range bacteriophage DLP3 specific to Stenotrophomonas maltophilia as a potential therapeutic agent. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1358, 2020.

PINEL, I. S. M. et al. Bacterial community dynamics and disinfection impact in cooling water systems. **Water Research**, v. 172, p. 115505, 2020.

PINHEIRO, Larindja AM et al. Efficiency of phage  $\phi 6$  for biocontrol of Pseudomonas syringae pv. syringae: an in vitro preliminary study. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 286, 2019.

PIRES, Diana P. et al. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2141-2151, 2016.

PIRI, Benyamin et al. Investigation of failure mechanisms and remaining life prediction of firewater pipelines used in industrial applications. **Engineering Failure Analysis**, v. 124, p. 105301, 2021.

POŁASKA, Marzena; SOKOŁOWSKA, Barbara. Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. **AIMS microbiology**, v. 5, n. 4, p. 324, 2019.

PRAKASH B, Veeregowda B and Krishnappa G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. **Curr Sci** 2003; 85(9): 1299– 1307

PRINCIPI, Nicola; SILVESTRI, Ettore; ESPOSITO, Susanna. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 513, 2019.

QAMAR, Hina; OWAIS, Mohd; HUSSAIN, Touseef. Nano-microbial based technology employing polyvalent phage conjugate: A next generation weapon for antimicrobial resistance lurking behind wastewater. **Environmental Research**, v. 215, p. 114079, 2022.

QIU, Yong et al. A novel microfluidic system enables visualization and analysis of antibiotic resistance gene transfer to activated sludge bacteria in biofilm. **Science of the total environment**, v. 642, p. 582-590, 2018.

RAHMANI, Kh; JADIDIAN, R.; HAGHTALAB, S. Evaluation of inhibitors and biocides on the corrosion, scaling and biofouling control of carbon steel and copper–nickel alloys in a power plant cooling water system. **Desalination**, v. 393, p. 174-185, 2016.

RAJAGOPAL, Sanjeevi; JENNER, Henk A.; VENUGOPALAN, Vayalam P. (Ed.). **Operational and environmental consequences of large industrial cooling water systems**. Springer Science & Business Media, 2012.

RAJALA, Pauliina et al. Microbial fouling and corrosion of carbon steel in deep anoxic alkaline groundwater. **Biofouling**, v. 33, n. 2, p. 195-209, 2017.

RAKHUBA, D. V. et al. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. **Polish journal of microbiology**, v. 59, n. 3, p. 145, 2010.

RIVERA, M. et al. Common antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* AK1401 as a receptor for bacteriophage A7. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 7, p. 2407-2411, 1992.

RIZZO, Natalie Nadin et al. Salmonella Gallinarum multirresistentes e formadoras de biofilmes em cascas de ovos são sensíveis a bacteriófagos. 2017.

ROSS, Alexa; WARD, Samantha; HYMAN, Paul. More is better: selecting for broad host range bacteriophages. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1352, 2016.

ROUSK, Johannes; BROOKES, Philip C.; BÅÅTH, Erland. Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 926-934, 2010.

RÓŻAŃSKA, Anna et al. Antibiotic resistance, ability to form biofilm and susceptibility to copper alloys of selected staphylococcal strains isolated from touch surfaces in Polish hospital wards. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2017.

RUBIO, Daniel; CASANUEVA, José F.; NEBOT, Enrique. Assessment of the antifouling effect of five different treatment strategies on a seawater cooling system. **Applied Thermal Engineering**, v. 85, p. 124-134, 2015.

RUNA, Viviane et al. Bacteriophages in biological wastewater treatment systems: occurrence, characterization, and function. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 2708, 2021.

RYU, J.-H. et al. Attachment and biofilm formation on stainless steel by Escherichia coli O157: H7 as affected by curli production. **Letters in applied microbiology**, v. 39, n. 4, p. 359-362, 2004.

SALIM, Amrita et al. Escherichia coli ST155 as a production-host of three different polyvalent phages and their characterisation with a prospect for wastewater disinfection. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 19406, 2022.

SAMIMI, Amir. Micro-organisms of cooling tower problems and how to manage them. **International Journal of Basic and Applied science, Indonesia**, p. 705-715, 2013.

SAMSON, Julie E. et al. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 675-687, 2013

SANTOS, Artur Andrade; MOREIRA, Felipe Marques; MAGALHÃES, Silvio Nascimento. Estudo Para Aletamento De Tubulação De Água De Resfriamento. 2014.

SANTOS, Sílvio B. et al. Exploiting bacteriophage proteomes: the hidden biotechnological potential. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 966-984, 2018.

Schijven, J. F., Sadeghi, G., & Hassanizadeh, S. M. (2016). Long-term inactivation of bacteriophage PRD1 as a function of temperature, pH, sodium and calcium concentration. **Water Research**, 103, 66–73. doi:10.1016/j.watres.2016.07.010

SCHULTZE, Lara B. et al. The impact of the pH value on biofilm formation. **Oral Biofilms**, v. 29, p. 19-29, 2021.

SEILER, Claudia; BERENDONK, Thomas Ulrich. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 399, 2012.

SHAO, Yongping; WANG, Ing-Nang. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. **Genetics**, v. 180, n. 1, p. 471-482, 2008.

SHEN, Yang; LOESSNER, Martin J. Beyond antibacterials—exploring bacteriophages as antivirulence agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 68, p. 166-173, 2021.

SHUTE J (2013) Too much of a good thing. **The telegraph**. <http://s.telegraph.co.uk/graphics/projects/antibiotic-resistance/index.html>

SILLANKORVA, Sanna et al. Bacteriophage  $\Phi$  S1 infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. **Biofouling**, v. 20, n. 3, p. 133-138, 2004.

SILLANKORVA, Sanna et al. *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage  $\Phi$ S1: the influence of temperature, host growth phase and media. **FEMS microbiology letters**, v. 241, n. 1, p. 13-20, 2004.

SIMMONDS, Peter et al. Virus taxonomy in the age of metagenomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 161-168, 2017.

SINGH, Simranjeet et al. Efficient biodegradation of acephate by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* PS-5 in the presence and absence of heavy metal ions [Cu (II) and Fe (III)], and humic acid. **3 Biotech**, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2017.

SOUSA, Dayane et al. Isolamento E Caracterização De Bacteriófagos Com Foco Na Sua Utilização Para Controle Da Mancha Bacteriana Do Tomateiro. 2020.

SOUTELINO, Maria Eduarda M. et al. BACTERIÓFAGOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS. Alimentos: Ciência, **Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 82-96, 2021.

SOUZA, Aline RC; COSTA, André LH. Modeling and simulation of cooling water systems subjected to fouling. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 141, p. 15-31, 2019.

ŠOVLJANSKI, Olja et al. Temperature and pH growth profile prediction of newly isolated bacterial strains from alkaline soils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 3, p. 1155-1163, 2020.

STEWART, P.S. et al. (2000) Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 836–838

STEWART, Philip S.; COSTERTON, J. William. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet*, v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.

SULAKVELIDZE, Alexander; KUTTER, Elizabeth. 14 Bacteriophage Therapy in Humans. *Bacteriophages: biology and applications*, p. 381, 2004.

SUTTLE, C. A. Viruses in the sea (2005) *Nature* 437: 356–361. **View Article.**

TAKENAKA, Shoji; IWAKU, Masaaki; HOSHINO, Etsuro. Artificial *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and confocal laser scanning microscopic analysis. *Journal of infection and chemotherapy*, v. 7, n. 2, p. 87-93, 2001.

TEMPLE, G. S.; AYLING, P. D.; WILKINSON, S. G. Isolation and characterization of a lipopolysaccharide-specific bacteriophage of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios*, v. 45, n. 183, p. 81-91, 1986.

TEVORS JT and CM Cotter. 1990. Copper toxicity and uptake in microorganisms. *J Ind Microbiol* 6: 77–84.

THOMAS, J. A.; SODDELL, Jacques A.; KURTBÖKE, D. I. Fighting foam with phages?. *Water Science and Technology*, v. 46, n. 1-2, p. 511-518, 2002. Thomas J. A., Soddell J. A., and Kurtböke D. I. 2002. **Fighting foam with phages?** *Water Sci. Technol.* 46(1–2):511–518.

TIAN, Changyu et al. Identification and molecular characterization of *Serratia marcescens* phages vB\_SmaA\_2050H1 and vB\_SmaM\_2050HW. *Archives of virology*, v. 164, p. 1085-1094, 2019.

TUL MUNTHA, Sedra; KAUSAR, Ayesha; SIDDIQ, Muhammad. Advances in polymeric nanofiltration membrane: A review. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, v. 56, n. 8, p. 841-856, 2017.

TURNER, Dann et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Archives of Virology*, v. 168, n. 2, p. 74, 2023.

TURNER, Dann; KROPINSKI, Andrew M.; ADRIAENSSENS, Evelien M. A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses*, v. 13, n. 3, p. 506, 2021.

VANDENBERGH, Peter A.; WRIGHT, Ann M.; VIDAVER, Anne K. Partial purification and characterization of a polysaccharide depolymerase associated with phage-infected *Erwinia amylovora*. **Applied and environmental microbiology**, v. 49, n. 4, p. 994-996, 1985.

VAZ, CSL et al. Redução de *Salmonella Heidelberg* em frangos pelo uso de bacteriófagos. **Embrapa Suínos e Aves-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2021.

VEERACHAMY, Suganthan et al. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 228, n. 10, p. 1083-1099, 2014.

VEIGA, A. A. **Estudo do efeito biocida do cloro e do peróxido de hidrogênio em sistemas de resfriamento com reúso de efluente como água de reposição**. 2010. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química. UFRJ. RJ, 286 p.

VIDELA, Hector A. **Manual of biocorrosion**. Routledge, 2018.

VIEIRA, Marcella Silva et al. A highly specific *Serratia*-infecting T7-like phage inhibits biofilm formation in two different genera of the Enterobacteriaceae family. **Research in Microbiology**, v. 172, n. 6, p. 103869, 2021.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4. ed. São Paulo: **Varela**, 2017.

WANG, J., Liu, M., Xiao, H., Wu, W., Xie, M., Sun, M., ... Li, P. (2013). Bacterial community structure in cooling water and biofilm in an industrial recirculating cooling water system. **Water Science and Technology**, 68(4), 940–947. doi:10.2166/wst.2013.334

WANG, Jiaping et al. Bacterial response mechanism during biofilm growth on different metal material substrates: EPS characteristics, oxidative stress and molecular regulatory network analysis. **Environmental research**, v. 185, p. 109451, 2020.

WANG, Jinmei et al. Bacterial community structure in cooling water and biofilm in an industrial recirculating cooling water system. **Water science and technology**, v. 68, n. 4, p. 940-947, 2013.

WANG, Jun; WANG, Dong; HOU, Deyin. Hydroxyl carboxylate based non-phosphorus corrosion inhibition process for reclaimed water pipeline and downstream recirculating cooling water system. **Journal of Environmental Sciences**, v. 39, p. 13-21, 2016.

WANG, Lili et al. Use of bacteriophages to control *Escherichia coli* O157: H7 in domestic ruminants, meat products, and fruits and vegetables. **Foodborne pathogens and disease**, v. 14, n. 9, p. 483-493, 2017.

WANG, Luokai et al. Biological characterization and complete genome analysis of a novel *Stenotrophomonas maltophilia* phage vB\_SM\_ytsc\_ply2008005c. **Virus Research**, v. 318, p. 198856, 2022.

WANG, Xiaofang et al. Phage combination therapies for bacterial wilt disease in tomato. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1513-1520, 2019.

WERNER, S. E. et al. Pitting of Type 304 stainless steel in the presence of a biofilm containing sulphate reducing bacteria. **Corrosion science**, v. 40, n. 2-3, p. 465-480, 1998.

WESSON CA, Liou LE, Todd KM, et al. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. **Infect Immun** 1998; 66(11): 5238–5243.

WILKING, James N. et al. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 848-852, 2013.

WITHEY, S. et al. Bacteriophages—potential for application in wastewater treatment processes. **Science of the total environment**, v. 339, n. 1-3, p. 1-18, 2005.

WONG, Thiang Yian; PRESTON, Lori A.; SCHILLER, Neal L. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 289-340, 2000. Wong, T.Y., Preston, L.A. and Schiller, N.L. (2000) Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu Rev Microbiol* 54, 289–340.

WU, Bing; WANG, Rong; FANE, Anthony G. The roles of bacteriophages in membrane-based water and wastewater treatment processes: A review. **Water research**, v. 110, p. 120-132, 2017.

WU, J. et al. Enhanced hydrolysis and acidification of waste activated sludge by regulating pH and temperature. **Bioresource Technology**, v. 288, p. 12151221, 2019.

WU, Nannan; ZHU, Tongyu. Potential of therapeutic bacteriophages in nosocomial infection management. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 638094, 2021.

XIONG Y and Liu Y. Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling. **Appl Microbiol Biotechnol** 2010; 86(3): 825–837

YANG, X.; LIU, J.; WANG, X. Membrane fouling and microbial community of a membrane-coupled anaerobic reactor treating low-strength wastewater. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 647654, 2016.

YANG, Yuhui et al. Antibacterial activity of a lytic enzyme encoded by *Pseudomonas aeruginosa* double stranded RNA bacteriophage phiYY. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1778, 2018.

YAP, Scott. The efficacy of sewage influent-isolated bacteriophages on *Pseudomonas aeruginosa* in a mixed-species biofilm. 2016. Tese de Doutorado.

YIN, Yujie et al. Isolation and characterisation of phages against *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science**, v. 69, n. 3, p. 199-208, 2019.

YOUNG, Ryland. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. **Journal of microbiology**, v. 52, n. 3, p. 243-258, 2014.

Yu P, Mathieu J, Li M, Dai Z, Alvarez PJJ, Dozois CM (2016) Isolation of polyvalent bacteriophages by sequential multiple-host approaches. **Appl Environ Microbiol** 82:808–815

YUAN, S. J.; CHOONG, Amy MF; PEHKONEN, Simo Olavi. The influence of the marine aerobic *Pseudomonas* strain on the corrosion of 70/30 Cu–Ni alloy. **Corrosion science**, v. 49, n. 12, p. 4352-4385, 2007.

ZHANG, Haiya et al. Study of biofilm influenced corrosion on cast iron pipes in reclaimed water. **Applied Surface Science**, v. 357, p. 236-247, 2015.

ZHANG, Yanyan; HU, Zhiqiang. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. **Biotechnology and bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 286-295, 2013.

ZHU, Qiping et al. Model reductions for multiscale stochastic optimization of cooling water system equipped with closed wet cooling towers. **Chemical Engineering Science**, v. 224, p. 115773, 2020..

ZOETENDAL, EG, Heilig, H, Klaassens, ES, Boonjink, C, Kleerebezem, M, Smidt, H and de Vos, W M. 2006. Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. **Nat Protoc**, 1: 870–873.

## APÊCIDE A –ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Moi tli 17

Arquivo analisado:

C:\Users\lucas\Desktop\SISVAR\MOI\rli17\rli 17.dbf

Variável analisada: TEMPO

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REPETICAO	2	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
ABSORB_NCI	1796	3372797.000000	1877.949332	1.0E+0009	0.0000
TRATAMENTO	3	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
erro	-2	2053.000000	0.000000000E+0000		
Total corrigido	1799	3374850.000000			
CV (%) =	0.00				
Média geral:	75.5000000		Número de observações:	1800	

Moi pla05

Variável analisada: TEMPO

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REPETICAO	2	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	0.000	1.0000
ABSORB_NCI	1648	3372185.500000	2046.229066	112.122	0.0000
TRATAMENTO	3	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	0.000	1.0000
erro	146	2664.500000	18.250000		
Total corrigido	1799	3374850.000000			
CV (%) =	5.66				
Média geral:	75.5000000		Número de observações:	1800	

Moi 64

Variável analisada: TEMPO

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REPETICAO	2	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	0.000	1.0000
ABSORB_NCI	1197	3374794.833333	2819.377471	30510.605	0.0000
TRATAMENTO	3	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	0.000	1.0000
erro	597	55.166667	0.092406		
Total corrigido	1799	3374850.000000			
CV (%) =	0.40				
Média geral:	75.5000000	Número de observações:	1800		

MOI consorcio bacteriano

Variável analisada: TEMPO

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REPETICAO	2	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	0.000	1.0000
ABSORB_NCI	2093	4217741.500000	2015.165552	368.179	0.0000
ESPECIE	0	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	0.000	0.0000
TRATAMENTO	4	0.000000000E+0000	0.000000000E+0000	0.000	1.0000
erro	150	821.000000	5.473333		
Total corrigido	2249	4218562.500000			
CV (%) =	3.10				
Média geral:	75.5000000	Número de observações:	2250		

ENSAIO INFECTIVIDADE EM pH PLA5

Variável analisada: ABSORB\_NCI

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REPETI__O	3	0.203745	0.067915	47.600	0.0000
TRATAMENTO	4	21.868480	5.467120	3831.781	0.0000
ESP_CIE_	6	5.418151	0.903025	632.910	0.0000
TEMPO	67	11.212492	0.167351	117.292	0.0000
TRATAMENTO*ESP_CIE_	24	9.142988	0.380958	267.005	0.0000
erro	9415	13.433162	0.001427		
Total corrigido	9519	61.279018			

-----  
 CV (%) = 18.49  
 Média geral: 0.2043124 Número de observações: 9520  
 -----

-----  
 Análise do desdobramento de TRATAMENTO dentro de cada nível de:

ESP\_CIE\_  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO /1	4	1.138092	0.284523	199.416	0.0000
TRATAMENTO /2	4	5.896464	1.474116	1033.175	0.0000
TRATAMENTO /3	4	4.285263	1.071316	750.861	0.0000
TRATAMENTO /4	4	8.625961	2.156490	1511.435	0.0000
TRATAMENTO /5	4	0.305348	0.076337	53.503	0.0000
TRATAMENTO /6	4	2.768848	0.692212	485.156	0.0000
TRATAMENTO /7	4	7.991492	1.997873	1400.264	0.0000
Erro	9415	13.433162	0.001427		

Codificação usada para o desdobramento

cod. ESP\_CIE\_  
 1 = 11.2.1  
 2 = 12.1  
 3 = 12.1.2  
 4 = 12.2.2  
 5 = 12.2.3  
 6 = B1  
 7 = Controle

ENSAIO INFECTIVIDADE EM pH RLI 17  
 -----

Variável analisada: ABSORB\_NCI

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REPETI__O	3	0.007035	0.002345	1.246	0.2914
TEMPO	67	4.343150	0.064823	34.435	0.0000
TRATAMENTO	4	8.537623	2.134406	1133.827	0.0000
ESP_CIE_	3	3.746789	1.248930	663.449	0.0000
TRATAMENTO*ESP_CIE_	12	9.861390	0.821782	436.543	0.0000
erro	5350	10.071266	0.001882		
Total corrigido	5439	36.567253			
CV (%) =	24.23				
Média geral:	0.1791013				
					Número de observações: 5440

-----  
 Análise do desdobramento de TRATAMENTO dentro de cada nível de:

ESP\_CIE\_

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	/1	4	0.735803	0.183951	97.717	0.0000
TRATAMENTO	/2	4	4.091339	1.022835	543.344	0.0000
TRATAMENTO	/3	4	8.825663	2.206416	1172.079	0.0000
TRATAMENTO	/4	4	4.746208	1.186552	630.313	0.0000
Erro		5350	10.071266	0.001882		

Codificação usada para o desdobramento

cod. ESP\_CIE\_

1 = 18.1.4

2 = 18c

3 = Controle

4 = P2

ENSAIO INFECTIVIDADE EM temperatura PLA5

Variável analisada: ABSORBANCI

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
REPETICAO		3	1.293029	0.431010	22.740	0.0000
TEMPO		107	423.020237	3.953460	208.581	0.0000
ESPECIE_		6	82.968247	13.828041	729.555	0.0000
TRATAMENTO		3	201.613527	67.204509	3545.648	0.0000
TRATAMENTO*ESPECIE_		18	168.333120	9.351840	493.395	0.0000
erro		11958	226.652908	0.018954		
Total corrigido		12095	1103.881069			
CV (%) =		25.70				
Média geral:		0.5356573	Número de observações:	12096		

Análise do desdobramento de TRATAMENTO dentro de cada nível de:

ESPECIE\_

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	/1	3	56.644001	18.881334	996.162	0.0000
TRATAMENTO	/2	3	46.603686	15.534562	819.589	0.0000
TRATAMENTO	/3	3	26.748686	8.916229	470.412	0.0000
TRATAMENTO	/4	3	10.664118	3.554706	187.543	0.0000
TRATAMENTO	/5	3	75.116459	25.038820	1321.025	0.0000
TRATAMENTO	/6	3	142.059517	47.353172	2498.310	0.0000
TRATAMENTO	/7	3	12.110180	4.036727	212.974	0.0000
Erro		11958	226.652908	0.018954		