



## Estudo da cinética de crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) orais e ambientais em condições aeróbias e anaeróbias

Fabiano Luiz Heggendorn<sup>3,4\*</sup>, Diogo Azevedo Coutinho<sup>3</sup>, Lúcio Souza Gonçalves<sup>2</sup>, Eliane Pedra Dias<sup>1</sup>, Viviane de Oliveira Freitas Lione<sup>4</sup>, Walter Barreiro Cravo Junior<sup>3</sup> e Márcia Teresa Soares Lutterbach<sup>3</sup>

Recebido: 12 de novembro de 2016 Aceito: 29 de março de 2018

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3875>

**RESUMO:** (Estudo da cinética de crescimento de bactérias redutoras de sulfato (BRS) orais e ambientais em condições aeróbias e anaeróbias). A biocorrosão é induzida por micro-organismos, como, por exemplo, as bactérias redutoras de sulfatos (BRS), com a capacidade de reduzir íon sulfato a sulfeto, sob diferentes condições ambientais. Assim, essa capacidade biocorrosiva faz com que esses micro-organismos possuam grande potencial biotecnológico. Porém, existem poucos relatos na literatura sobre o cultivo e o comportamento das *Desulfovibrio* sp. em laboratório. O objetivo desse trabalho foi descrever a cinética de crescimento de duas espécies microbianas do gênero *Desulfovibrio*, *Desulfovibrio desulfuricans* (cepa oral e ambiental) e *Desulfovibrio fairfieldensis*, em condição de aerobiose e anaerobiose. As três cepas foram manipuladas dentro de uma câmara de controle atmosférico, Glove box, permitindo utilizar as condições anaeróbicas para cultivo em meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar e Postgate C sem ágar-ágar. As cepas também foram cultivadas nos mesmos meios de culturas em condições aeróbicas, dentro de uma câmara de fluxo laminar. Após adaptação, as placas de cultivo foram incubadas a 30 °C, por 147 horas, em uma leitora automática de microplacas. A cada hora, a placa era agitada por três segundos e a leitura da absorbância no comprimento de onda de 590 nm realizada pelo software Gen5™. Paralelamente, foi avaliado o crescimento de BRS em meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar pela formação de sulfeto de ferro. A cepa *D. fairfieldensis* apresentou crescimento nos dois tipos de meios de cultura e ambas as condições. As demais cepas apresentaram variações nas condições aplicadas, com divergência na leitura da curva de crescimento com a formação de sulfeto de ferro no meio de cultura Postgate E, modificado sem ágar-ágar. O crescimento em meio de cultura específico para *Desulfovibrio* sp. em ambiente aeróbico, sugere que estas bactérias podem ser anaeróbicas facultativas ou aerotolerantes e não estritas como descrito na maior parte da literatura. Sendo assim, esta característica sinaliza não haver uma restrição desta bactéria a ambientes anaeróbicos, permitindo transitar em diferentes nichos da cavidade oral com distintas concentrações de oxigênio.

**Palavras-chave:** *Desulfovibrio*, microbiologia oral, bactéria redutora de sulfato e curva de crescimento.

**ABSTRACT:** (On the growth kinetics of oral and environmental sulfate-reducing bacteria (SRB) in aerobic and anaerobic conditions). Biocorrosion is a process induced by microorganisms such as sulfate-reducing bacteria (SRB), which are able to reduce sulfate to sulfide under different environmental conditions. Such biocorrosive ability renders these microorganisms highly important on a biotechnological scope. However, few studies have addressed the cultivation and behavior of *Desulfovibrio* sp. in laboratory conditions. We therefore aimed to describe the growth kinetics of *Desulfovibrio desulfuricans* (oral and environmental strains) and *D. fairfieldensis*, in aerobic and anaerobic conditions. Three strains were manipulated in a glovebox-type controlled atmosphere chamber, which allowed for cultivation under anaerobic conditions in modified Postgate E culture medium without agar-agar and Postgate C culture medium without agar-agar. Strains were grown in the same culture media under aerobic conditions, within a laminar flow hood. After adaptation, cultures were incubated at 30 °C for 147 h in an automatic microplate reader. Plates were shaken for 3 s on an hourly-basis and their absorbance was read at the 590-nm wavelength using software Gen5™. In parallel, we evaluated SRB growth in modified Postgate E culture medium without agar-agar by assessing iron sulfide formation. The strain *D. fairfieldensis* grew on both culture medium types, in both conditions. The other strains showed variation in the applied conditions, with divergences in readings of the growth curve being observed with iron sulfide formation in the modified Postgate E culture medium without agar-agar. The occurrence of growth in a culture medium specific to *Desulfovibrio* sp. in an aerobic environment suggests that these bacteria may be facultative anaerobic or aerotolerant, and not strict, as previously reported in most studies. Thus, such trait suggests that there is no restriction to these bacteria in anaerobic environments, and they therefore may be able to move across different niches of the oral cavity with different oxygen concentrations.

**Keywords:** *Desulfovibrio*, oral microbiology, sulfate-reducing bacteria, growth curve.

### INTRODUÇÃO

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são bactérias anaeróbias estritas, com uma faixa de temperatura ótima entre 25 e 44 °C e pH entre 5,5 e 9,0. Apresentam-se como bacilos curvos ou espiralados, tendo de 0,5 a 1,0 µm de diâmetro e 3,0 a 5,0 µm de comprimento. Atualmente, existem mais de 20 gêneros bem conhecidos, tais como

*Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfolobus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* etc. (Postgate 1984, Videla 2003, Madigan *et al.* 2003). É um grupo de bactérias fastidiosas, sendo associadas ao fenômeno de biocorrosão em águas profundas, tanques de armazenamento e superfícies metálicas (Laskin *et al.* 2005), bem como a digestão de ácidos gordurosos no

1. Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, Brasil.

2. Faculdade de Odontologia, Universidade Estácio de Sá. Rio de Janeiro, Brasil.

3. Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação, Instituto Nacional de Tecnologia. Rio de Janeiro, Brasil.

4. Escola de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Bioensaios farmacêuticos. Rio de Janeiro, Brasil.

\* Autor para contato. E-mail: [fabianohegg@gmail.com.br](mailto:fabianohegg@gmail.com.br)

intestino humano (Laskin *et al.* 2005, Dzierżewicz *et al.* 1996). As BRS, principalmente do gênero *Desulfovibrio*, podem ser encontradas na microbiota intestinal e nas fezes de adultos humanos saudáveis, além de estarem associadas às doenças inflamatórias intestinais (Madigan *et al.* 2003, Watanabe *et al.* 2007).

São encontrados relatos da presença de BRS, como *Desulfovibrio* e *Desulfobacter*, na microbiota bucal, mucosa bucal, no biofilme subgengival e em dorso de língua (Van Der Hoeven *et al.* 1995, Boopathy 2002, Langendijk *et al.* 2001, Willis *et al.* 1999, Heggendorf *et al.* 2013). Sefer and Călinescu (1965) relataram a presença de BRS associada à *Streptococcus* sp. em sete dentes extraídos, devido à extensa cárie dentária e, ainda, relataram a presença de *Desulfovibrio* em raspas de dentina cariada. Em relação aos patógenos periodontais, as BRS já foram associadas a *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* and *Porphyromonas gingivalis* (complexo vermelho) (Langendijk-Genevaux *et al.* 2001).

A fim de compreender o comportamento de cepas oral de BRS, o presente estudo teve como objetivo descrever a cinética de crescimento de duas espécies microbianas, *Desulfovibrio desulfuricans* (cepa oral e ambiental) e *Desulfovibrio fairfieldensis*, em condição de aerobiose e anaerobiose.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil, através do parecer substanciado do CEP (CAAE 17247013.3.0000.5243, número do parecer 426311).

### *Cinética de crescimento microbiano da Desulfovibrio sp.*

Foi determinada a cinética de crescimento de *D. desulfuricans* (cepa ambiental e cepa oral) e *D. fairfieldensis* em meio de cultura Postgate E modificado, sem ágar-ágar, e meio de cultura Postgate C (Postgate 1984), sem ágar-ágar, a partir da seguinte metodologia, descrita a seguir.

### *Amostras*

Inicialmente, foi realizado o repique de cada uma das cepas em meio de cultura Postgate E modificado sem

ágar-ágar e meio Postgate C sem ágar-ágar. Estes cultivos foram incubados em estufa por sete dias a 30 °C.

### *Cinética de crescimento em anaerobiose*

Lavagem das células bacterianas das amostras: Após o período de incubação, os cultivos foram centrifugados a 10.000 g durante 5 min, para a recuperação das células. Posteriormente, o precipitado de cada amostra foi ressuspenso com solução redutora para bactérias anaeróbias, de composição em g./L.: Tioglicolato de Sódio (0,124); Ácido ascórbico (0,1); NaCl (5,0) e Rezasurina (4,0 mL). Após o ajuste do pH, o meio foi submetido a constante homogeneização por agitação e a condição de anaerobiose, garantida através da purga e distribuição do meio com nitrogênio e vedação dos frascos, tipo penicilina de 50 mL com tampa de borracha e lacre de alumínio. Ao fim do procedimento, todos foram autoclavados.

Para os procedimentos em anaerobiose, foi utilizada a câmara de controle atmosférico Glove Box (Plas-Labs, INC., #855-AC), conforme recomendado pelo fabricante. O vácuo foi ligado nove vezes até uma pressão de 18-20 PSI e posteriormente injetada a mistura de gás anaeróbico (nitrogênio a 85%, hidrogênio a 10% e dióxido de carbono a 5%) até uma pressão de 25-50 PSI. Após o preparo prévio da Glove Box, a câmara de transferência foi aberta para a colocação do material. Depois de realizado o lacre da câmara de transferência, foi realizada quatro vezes a aplicação de vácuo até uma pressão de 18-20 PSI para em seguida injetar a mistura de gás anaeróbico, até o manômetro chegar a zero.

Com a placa de cultivo de 24 poços (BIOFIL<sup>®</sup>) posicionada na Glove Box, foram distribuídos 1,5 mL de meio Postgate E modificado sem ágar-ágar em 12 poços e 1,5 mL de Meio Postgate C sem ágar-ágar nos restantes. Após ressuspender as células em solução redutora, 0,15 µg/L (inóculo de 10%) dos micro-organismos foram semeados conforme a tabela 1. As placas foram lacradas com Parafilm M<sup>®</sup> (Laboratory Film) e retiradas da Glove Box.

### *Cinética de crescimento em aerobiose*

O protocolo de lavagem das células bacterianas aplicados na condição de anaerobiose foi repetido para a condição de aerobiose.

A placa de cultivo de 24 poços seguiu a mesma distribuição descrita na condição anaeróbica, sendo manipu-

**Tabela 1.** Distribuição dos meios de cultivo e das células nas placas de cultivo.

Meios de cultivo	Meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar	Meio de cultura Postgate C sem ágar-ágar
Células inoculadas	Meio Branco, sem inoculação de bactérias (3 poços)	Meio Branco, sem inoculação de bactérias (3 poços)
	Inoculação de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (cepa ambiental) (3 poços)	Inoculação de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (cepa ambiental) (3 poços)
	Inoculação de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (cepa oral) (3 poços)	Inoculação de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (cepa oral) (3 poços)
	Inoculação de <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> (cepa oral) (3 poços)	Inoculação de <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> (cepa oral) (3 poços)

lada dentro da câmara de fluxo laminar com auxílio de uma pipeta, as células ressuspensas foram distribuídas e 0,15 µg/L (inóculo de 10%) dos micro-organismos foram semeados em cada poço, conforme a tabela 1.

#### Leitura de Crescimento de *Desulfovibrio sp.*

As placas de cultivo foram incubadas a 30 °C por 147 horas em uma leitora automática de microplacas BioTek Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek Instruments, Inc). A cada hora, as placas eram agitadas por três segundos e a leitura da absorbância, no comprimento de onda de 590 nm, realizada pelo software Gen5™ (Biotek Instruments, Inc).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A detecção de absorbância é uma tecnologia que permite o levantamento do rendimento do crescimento de micro-organismos cultiváveis (Borglin *et al.* 2009). Para a determinação da taxa de crescimento de cada amostra/cepa, foi realizada uma média do ensaio branco de cada grupo (meio de cultura), para então, com este valor final, subtrair da curva de crescimento obtida do

ensaio do respectivo grupo de meio de cultura, resultando na representação gráfica da curva de crescimento em anaerobiose (Fig. 1).

Durante o crescimento das BRS em meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar, o sulfato é reduzido a sulfeto de hidrogênio que reage com o  $Fe^{+2}$  no meio de cultura e forma o sulfeto de ferro, tornando o meio escurecido. Este indicativo de crescimento pode ser usado como um análogo para o crescimento das BRS nos poços onde foi utilizado meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar.

Ao correlacionar os dados da taxa da curva de crescimento em condições de anaerobiose com a indicação de crescimento celular, relacionada à formação de sulfeto de ferro, que o meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar apresentou nestes cultivos, foram realizadas as seguintes análises, descritas a seguir.

As cepas de *D. desulfuricans* ambiental apresentaram crescimento nos três poços de cultivo com diferentes graus de escurecimento no meio de cultura. Ao relacionar com a cinética de crescimento (Fig. 1), somente uma amostra entrou em fase exponencial, a partir de 10 horas de cultivo. Ao observar esta amostra, o meio de cultivo

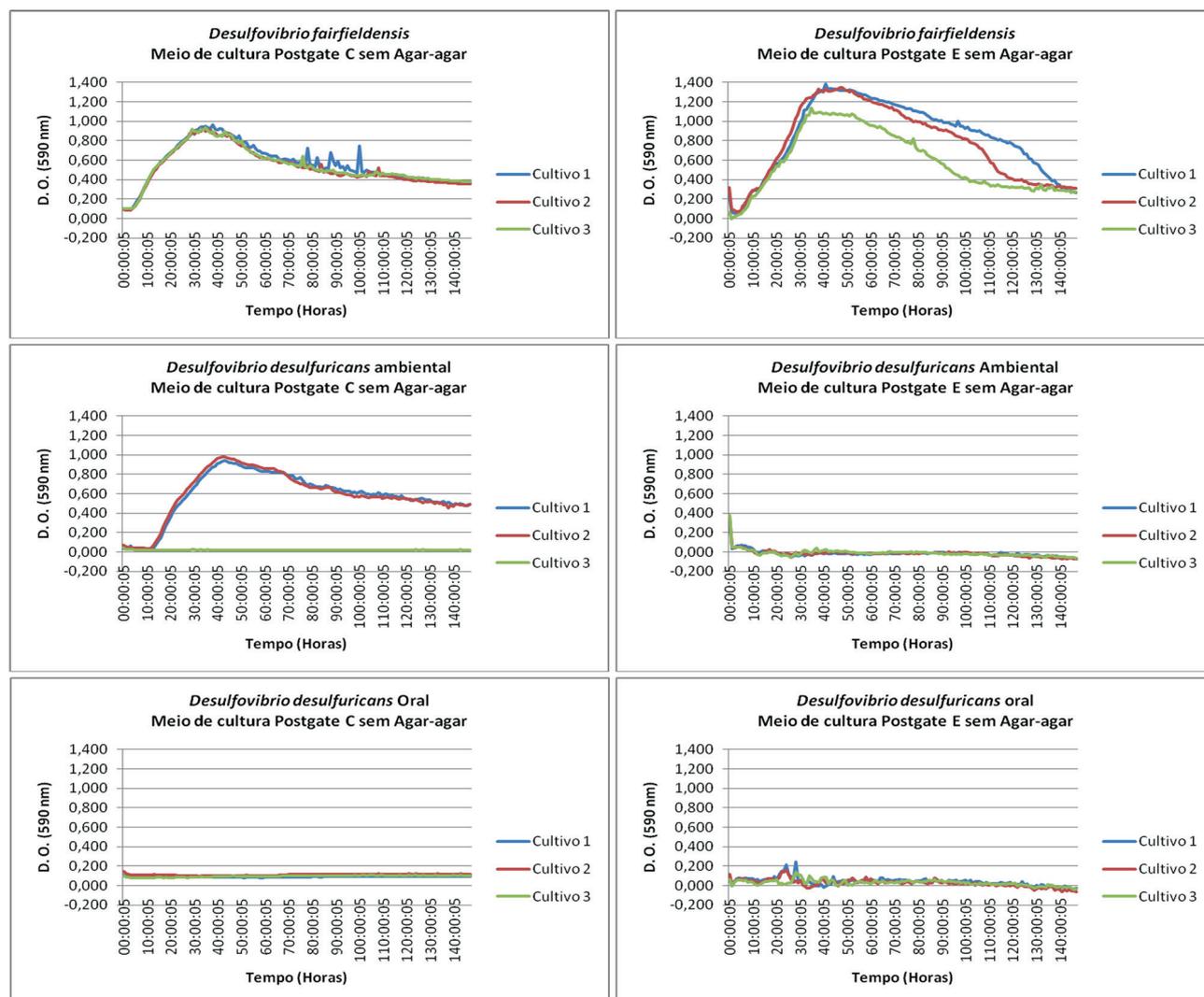


Figura 1. Representações gráficas das curvas de crescimento das BRS em anaerobiose.

apresentava maior escurecimento, quando comparada às outras duas. Estas, apresentaram uma curva de crescimento menos acentuada, com uma longa fase lag, não apresentando crescimento significativo após 70 horas de incubação, o que pode estar relacionado com o grau de escurecimento destes cultivos, uma vez que apresentavam um leve escurecimento no meio de cultivo. As amostras com *D. desulfuricans* oral apresentaram escurecimento devido à formação de sulfeto de ferro no cultivo, o que indicaria o crescimento celular. Entretanto, em duas amostras, a curva de crescimento (Fig. 1) entrou em fase exponencial, enquanto uma se manteve linear durante todo o período de cultivo, o que indicaria a falta de atividade celular desta cepa ou um longo período de adaptação. Com relação às amostras com *D. fairfieldensis*, os dois cultivos apresentaram escurecimento, enquanto o terceiro cultivo indicou menor formação de sulfeto de ferro, deixando turvo o meio de cultura. Entretanto, as três amostras, na curva de crescimento (Fig. 1), entraram em fase exponencial, em menos de 10 horas de cultivo, mesmo com a diferença de formação de sulfeto de ferro apresentada entre as amostras.

A Figura 2 apresenta as representações gráficas das curvas de crescimento em aerobiose utilizando Postgate C e Postgate E. Ao confrontar os dados da taxa da curva de crescimento em condições de aerobiose com a formação de sulfeto de ferro nos cultivos em meio Postgate E modificado sem ágar-ágar após o ensaio, foi possível observar que parte dos cultivos em meios de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar inoculados com BRS apresentava crescimento celular, enquanto a curva de crescimento indicava a falta de crescimento celular (Fig. 2).

As cepas de *D. desulfuricans* ambiental não apresentaram alteração de coloração no cultivo em meio Postgate E modificado sem ágar-ágar nos três cultivos. Ao analisar a curva gerada pelo programa, também foi constatado que não apresentou crescimento significativo durante o período de incubação (Fig. 2). As amostras inoculadas com *D. desulfuricans* oral apresentaram escurecimento no cultivo, o que indicaria o crescimento celular. Entretanto, as curvas de crescimento apresentaram-se lineares, com pequenos picos entre os períodos de 20 e 30 horas, entrando em fase de declínio entre o período de 90 a 100

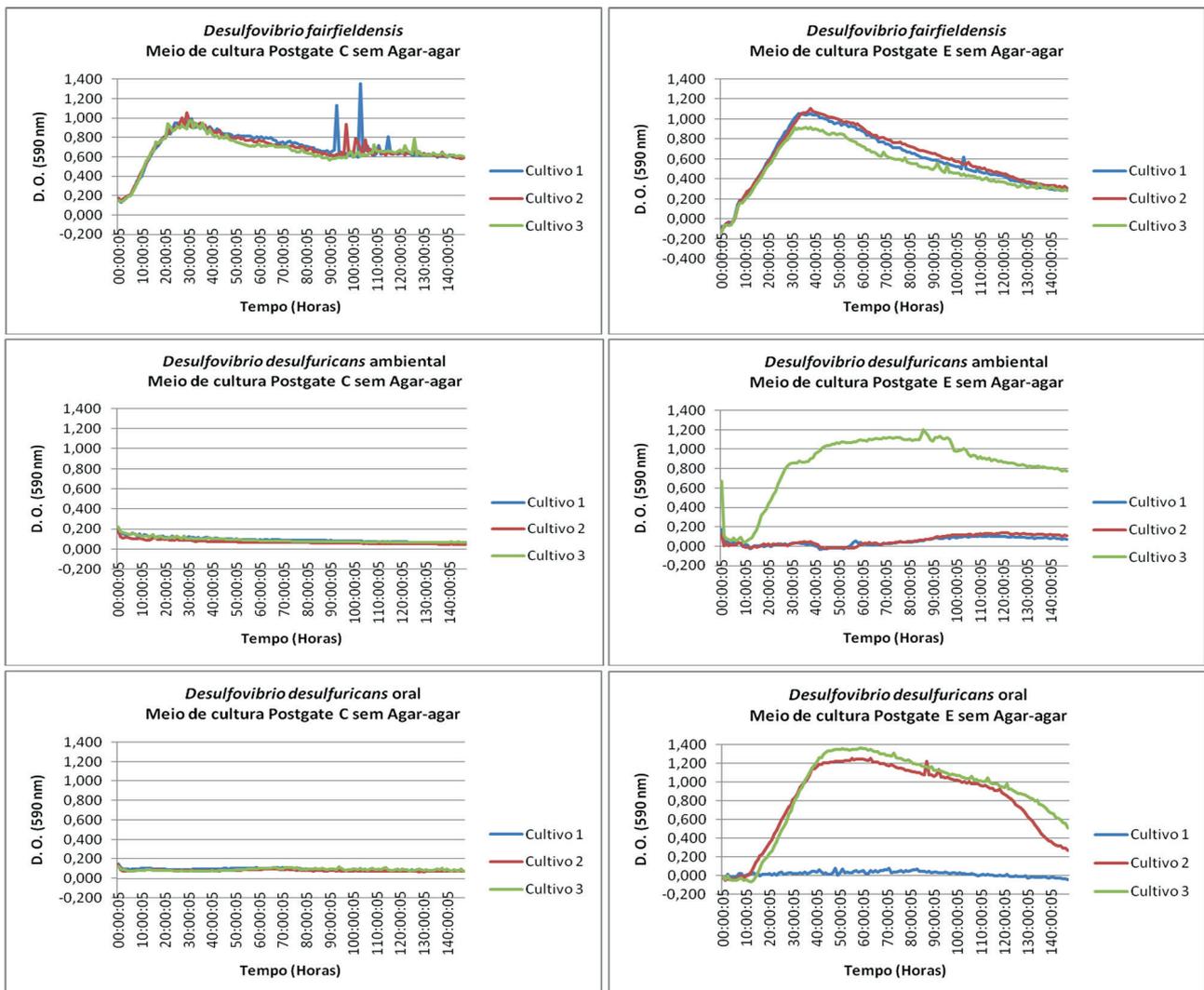


Figura 2. Representações gráficas das curvas de crescimento das BRS em aerobiose.

horas (Fig. 2). Já as duas amostras inoculadas com *D. fairfieldensis* apresentaram escurecimento, enquanto um cultivo apresentou suave escurecimento. Entretanto, na curva de crescimento as três entraram em fase exponencial nas primeiras horas de leitura (Fig. 2).

Para a determinação da cinética de crescimento em condições anaeróbicas foi desenvolvido um protocolo que garantisse as condições de anaerobiose adequada, uma vez que as leitoras de microplacas são desenvolvidas originalmente para micro-organismos aeróbicos. Borglin *et al.* (2009) também relataram adaptações semelhantes para o desenvolvimento de condições anaeróbicas para a obtenção da curva de crescimento da *D. vulgaris*. Esses autores enfatizaram a necessidade de estudos detalhados sobre o crescimento e metabolismos da *Desulfovibrio* sp. como uma etapa da compreensão no processo de redução do metal sob diferentes condições ambientais.

Quando a densidade óptica é medida no espectrofotômetro a amostra é colocada em uma placa de cultivo onde a leitura em cada poço ocorre através de um feixe de luz do espectrofotômetro, tipicamente de 1,0 cm (Hall *et al.* 2013). A agitação da placa de cultura objetiva assegurar a distribuição uniforme das células no meio, antes de cada leitura da densidade óptica (Hall *et al.* 2013). Entretanto, em nossas análises, foi possível observar em alguns poços das placas de cultivo, zonas de redução e formação de sulfeto de ferro, em meio ao meio de cultura. Esse aspecto pode estar relacionado à formação de zonas de crescimento e agregação celular, não ocorrendo a homogeneização do cultivo no poço. Isto sugeriu que esta possível falta de homogeneização celular possa ser a resposta para os dados conflitantes de crescimento, em meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar e a leitura no espectrofotômetro. Hall *et al.* (2013) também relataram que a agitação da placa permite manter a cultura arejada, proporcionando oxigênio suficiente para as células. Logo a coluna de oxigênio existente na placa de cultivo, em condições aeróbicas, pode permitir uma aeração do meio de cultura das BRS durante o decorrer das leituras.

As diferenças observadas nas taxas de crescimento são esperadas quando diferentes cepas são compradas (Borglin *et al.* 2009). Cada grupo bacteriano possui uma faixa de condições nas quais seu crescimento atinge uma taxa ótima; logo, o crescimento de uma população bacteriana reflete seu grau de adaptação à composição física e química de um determinado ambiente. Traore *et al.* (1982) demonstraram diferenças nas taxas de crescimento da *D. gigas*, *D. desulfuricans normay* e da *D. africana* ao utilizarem dois meios de cultura diferentes, lactato com sulfato e piruvato com sulfato. Sani *et al.* (2001) identificaram a presença do cobre como responsável por retardar o tempo de fase log para 120 horas, quando comparado ao grupo controle que alcançou a fase log em 24 horas e, em alguns casos, também inibe o crescimento das *D. desulfuricans* mesmo após incubação prolongada de 384 horas. Já o Zn e Pb foram apontados por estender a fase lag por 48 e 72 horas, respectivamente (Sani *et al.* 2001).

Nos dados apresentados, a *D. fairfieldensis* apresentou crescimento em todos os grupos e nas diferentes condições, o que reflete um grande poder de adaptação desta espécie. Em todas as leituras, esta espécie apresentou uma curta fase lag, entrando rapidamente na fase exponencial. Possivelmente tais adaptações proveem de ser uma bactéria isolada de um meio com grande adversidade, apresentando diferentes microambientes, o ambiente oral. Em contrapartida, a *D. desulfuricans*, isolada de um ambiente oral, apresentou um crescimento acentuado somente nas curvas de crescimento anaeróbicas, em meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar. Porém, em todos os poços de cultura onde se utilizou meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar, tanto aeróbico como anaeróbico, foi possível visualizar a redução do sulfato, o que indicou a viabilidade celular nestas amostras, tornando possível atestar o seu crescimento em ambiente aeróbico.

A *D. desulfuricans* ambiental não apresentou crescimento no meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar em condições aeróbicas tanto na curva de crescimento como no meio de cultura. Mas em meio de cultura Postgate C sem ágar-ágar esta espécie apresentou crescimento na curva de crescimento. Em condições anaeróbicas, esta espécie não apresentou atividade na curva de crescimento em meio de cultura Postgate C sem ágar-ágar, enquanto no meio de cultura Postgate E modificado sem ágar-ágar apresentou crescimento em somente um poço na leitura, e redução de crescimento, no meio de cultura, nos três poços.

O crescimento bem sucedido das *Desulfovibrio* sp. em ambiente aeróbico indica que estas bactérias podem ser anaeróbicas facultativas ou aerotolerantes e não anaeróbicas estritas como defende a maior parte da literatura. Tais dados são possíveis pelo fato das BRS possuírem uma vasta gama de enzimas protetoras contra o estresse oxidativo como o citocromo C, superóxido desmutase e as hidrogenases periplasmáticas, o que garante uma tolerância a altas tensões de oxigênio, sobrevivendo a exposições prolongadas (Romão *et al.* 1999, Baumgarten *et al.* 2001, Fournier *et al.* 2003, Dolla *et al.* 2006, Lobo *et al.* 2007). Baumgarten *et al.* (2001) relataram diferentes níveis de tolerância ao oxigênio entre as espécies *D. vulgaris*, *D. desulfuricans* e *D. termitides*. Os autores indicaram uma relação quanto à eficácia enzimática, o citocromo C e as hidrogenases periplasmáticas, que garantiam a redução de oxigênio, como os responsáveis pela diferença de tolerância ao oxigênio entre estas espécies. Além da adaptação molecular relatada acima, as *Desulfovibrio* sp. também possuem como estratégia a agregação bacteriana, formando co-culturas para garantir a sobrevivência em condições aeróbicas (Dolla *et al.* 2006).

Apesar de serem isoladas próximas a ambientes aeróbicos, as BRS, em especial do gênero *Desulfovibrio*, são consideradas bactérias anaeróbicas estritas. Entretanto, através do uso de microsensores, Santegoeds *et al.* (1998) e Okabe *et al.* (1999) demonstraram a formação de biofilme em condições aeróbicas. Após sete dias de

desenvolvimento, a ocorrência de zonas anaeróbicas garante condições favoráveis para o crescimento das BRS (Santegoeds *et al.* 1998). Lobo *et al.* (2007) relataram sobre a capacidade da *Desulfovibrio desulfuricans* crescerem na presença de oxigênio a níveis próximos ao atmosférico. No relato, os autores utilizaram concentrações de oxigênio de 5%, 15%, 18% e 21% em cultivos de 7 horas de duração. Nos cultivos com concentração de 18% de oxigênio, *Desulfovibrio desulfuricans* apresentaram taxa de crescimento semelhante às células em condições anaeróbicas e em concentrações de O<sub>2</sub> de 21% as células pararam de crescer, mas não exibiram morte celular.

O crescimento, em meio de cultura específico, bem sucedido das *Desulfovibrio sp.*, em ambiente aeróbico, indica que estas bactérias podem ser anaeróbicas facultativas ou aerotolerantes e não estritas como defende a maior parte da literatura. Logo, esta característica sugere não haver uma restrição desta bactéria a ambientes anaeróbicos, permitindo assim transitar em diferentes nichos da cavidade oral com distintas concentrações de oxigênio.

### AGRADECIMENTOS

Ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPQ) e ao LABIO, Instituto Nacional de Tecnologia; à Prof<sup>ª</sup> Eunice Dantas, pela revisão.

### REFERÊNCIAS

- BAUMGARTEN, A., REDENIUS, I., KRANCZOCH, J. & CYPIONKA, H. 2001. Periplasmic oxygen reduction by *Desulfovibrio* species. *Arch Microbiol*, 176: 306-9.
- BOOPATHY, R., ROBICHAUX, M., LA FONT, D., HOWELL, M. 2002. Activity of sulfate-reducing bacteria in human periodontal pocket. *Can J Microbiol*, 48:1099-103.
- BORGLIN, S., JOYNER, D., JACOBSEN, J. MUKHOPADHYAY, A. & HAZEN, T. C. 2009. Overcoming the anaerobic hurdle in phenotypic microarrays: Generation and visualization of growth curve data for *Desulfovibrio vulgaris* hildenborough. *Journal of Microbiological Methods*, 76: 156-68.
- DOLLA, A., FOURNIER, M., DERMOUN, Z. 2006. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology*, 126: 87-100.
- DZIERŻEWICZ, D., CWALINA, B., KURKIEWICZ, S., CHODUREK, E. & WILCZOK, T. 1996. Intraspecies variability of cellular fatty acids among soil and intestinal strains of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol*, 62:3360-5.
- FOURNIER, M., ZHANG, Y., WILDSCHUT, J. D., DOLLA, A., VOORDOUW, J. K., SCHRIEMER, D. C. & VOORDOUW, G. 2003. Function of oxygen resistance proteins in the anaerobic, Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Bacteriol*, 185(1): 71-9.
- HALL, B. G., ACAR, H., NANDIPATI, A. & BARLOW, M. 2013. Growth Rates Made easy. *Mol. Biol. Evol*, 31(1): 232-8.
- HEGGENDORN, F. L., GONÇALVES, L. S., DIAS, E. P., SILVA JUNIOR, A., GALVÃO, M. M. & LUTTERBACH, M. T. S. 2013. Detection of sulphate-reducing bacteria in human saliva. *Acta odontol Scandinavica*, 71(6): 1458-63.
- LANGENDIJK, P. S., HAGEMANN, J. & VAN DER HOEVEN, J. S. 2001. Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. nov. and *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 1035-44.
- LANGENDIJK-GENEVAUX, P. S., GRIMM, W. D. & VAN DER HOEVEN, J. S. 2001. Sulfate-reducing bacteria in relation with other potential periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*, 28: 1151-7.
- LASKIN, A. I., BENNETT, J. W. & GADD, G. M. 2005. *Advances in applied microbiology*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press.
- LOBO, S. A., MELO, A. M. P., CARITA, J. N., TEIXEIRA, M. & SARAIVA, L. M. 2007. The anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 grows at nearly atmospheric oxygen levels. *FEBS Letters*, 581: 422-36.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. & PARKER, J. 2003. *Brock's Biología de los Microorganismos*. 10th ed. Madrid: Perason-Prentice Hall.
- OKABE, S., ITOH, T., SATOH, H. & WATANABE, Y. 1999. Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 65(11): 5107-16.
- POSTGATE, J.R. 1984. *The Sulphate-reducing bacteria*. 2nd ed. London: Cambridge University Press.
- ROMÃO, C. V., LUI, M. Y., GALL, J. L., GOMES, C. M. BRAGA, V., PACHECO, I., XAVIER, A. C. & TEIXEIRA, M. 1999. The superoxide dismutase activity of desulfoferrodoxin from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Eur. J. Biochem*, 261: 438-43.
- SANI, R. K., PEYTON, B. M. & BROWN, L. T. 2001. Copper-Induced inhibition of growth of *Desulfovibrio desulfuricans* G20: Assessment of its toxicity and correlation with those of zinc and lead. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10): 4765-72.
- SANTEGOEDS, C. M., FERDELMAN, T. G., MUYZER, G. & DE BEER, D. 1998. Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl Environ microbial*, 64(10): 3731-9.
- SEFER, M. & CĂLINESCU, I. 1969. Bacterii Sulfatreducătoare (genus *Desulfovibrio*), izolate din caria dentară, La om. *Microbiol Parazitol Epidemiol (Bucur)*, 14:231-5.
- TRAORE, A. S., HATCHIKIAN, C. E., LE GALL, J. & BELAICH, J. P. 1982. Microcalorimetric Studies of the Growth of Sulfate-reducing bacteria: Comparison of the growth parameters of some *Desulfovibrio* species. *J Bacteriol*, 149(2): 606-611.
- VAN DER HOEVEN, J. S., VAN DER KIEBOOM, C. W. A. & SCHAEKEN, M. J. M. 1995. Sulfate-reducing Bacteria in the periodontal pocket. *Oral Microbiol Immunol*, 5: 288-90.
- VIDELA, H. A. 2003. *Biocorrosão, Biofouling e Biodeteriorização de materiais*. São Paulo: Edgard Biucher.
- WATANABE, K., MIKAMO, H. & TANAKA, K. 2007. Clinical significance of sulfate-reducing bacteria for ulcerative colitis. *Jpn J Clin Med*, 7: 1337-46.
- WILLIS, C.L., GIBSON, G.R., HOLT, J. & ALLISON, C. 1999. Negative correlation between oral malodour and numbers and activities of sulphate-reducing bacteria in the human mouth. *Arch Oral Biol*, 44: 665-70.