

## Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho

*Taxonomic and physiological characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood*

Francine POFFO<sup>1</sup>, Marcus Adonai Castro da SILVA<sup>1\*</sup>

### Resumo

Bactérias ácido-láticas (BAL) constituem um grupo diverso, associado à produção de alimentos, incluindo fermentados de peixe. Por meio de processos fermentativos, é possível obter produtos mais saborosos e saudáveis. Estas bactérias também são importantes na medicina por suas atividades probióticas. Neste contexto, nove linhagens de bactérias ácido-láticas foram isoladas de sardinha e guaivira. Destas, duas linhagens foram caracterizadas fisiologicamente, juntamente com *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293. *Lactobacillus homohiochii* F3 apresentou ótimo crescimento a 40 °C, diferente de *Lactobacillus intestinalis* G1 e *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293, que tiveram ótimo crescimento a 30 °C. Em relação à tolerância ao NaCl, *L. homohiochii* F3 e *L. mesenteroides* ATCC8293 toleraram uma concentração de 5% de NaCl no meio. A espécie *L. intestinalis* G1 tolerou uma concentração de 7,5%, podendo ser considerada mais halotolerante que as demais espécies. *L. mesenteroides* ATCC8293, por causa do aumento da taxa de crescimento, pode ser considerada levemente halofílica. Na presença de concentrações não ótimas de NaCl, a adição de solutos orgânicos foi eficaz na restauração do balanço osmótico das células.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus*; peixes marinhos; solutos compatíveis.

### Abstract

Lactic acid bacteria constitute a diversified group associated with the production of food, including fermented fishes. Through fermentative processes, it is possible to obtain several healthy and tasty products. Those bacteria are also important in medicine due to their probiotic activities. In this context, nine lactic acid bacteria were isolated from sardine and leatherjacket fish. Among them, two lineages, and the reference strain *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293 were physiologically characterized. *Lactobacillus homohiochii* F3 grew optimally at 40 °C, differently from *Lactobacillus intestinalis* G1 and *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293 that grew optimally at 30 °C. With regard to NaCl tolerance, *L. homohiochii* F3 and *L. mesenteroides* ATCC8293 grew in media containing 5% NaCl. *Lactobacillus intestinalis* G1 grew in media containing 7.5% NaCl and can be considered more halotolerant than the other species. *L. mesenteroides* ATCC8293 can be considered slightly halophilic. In non-optimal NaCl concentrations, the addition of organic solutes to the culture media was effective in restoring the osmotic balance of the bacteria.

**Keywords:** *Lactobacillus*; marine fishes; compatible solutes.

## 1 Introdução

A fermentação dos produtos da pesca é uma prática muito antiga e particularmente difundida na Europa e na Ásia. Alguns exemplos: os *Titbits* e *Galffelbitars*, fabricados na Noruega e na Suécia, e o *Paak o Mam Chão* e o *Plaa-som*, consumidos no Camboja e na Tailândia, respectivamente (PALUDAN-MULLER et al., 2002). Pescado fermentado também pode ser denominado silagem de pescado, com uso para ração animal, visando o reaproveitamento de resíduos gerados pelas indústrias de pescado (AQUARONE et al., 2001).

Entre os micro-organismos associados com a produção de pescado fermentado, as bactérias ácido-láticas desempenham um papel fundamental, pois são capazes de alterar, de forma favorável, a textura e o sabor destes; inibir o desenvolvimento de organismos prejudiciais à saúde, e evitar a deterioração precoce dos produtos. Além do efeito de preservação das bactérias ácido-láticas, acredita-se que sua presença nos alimentos

possa ter efeito probiótico, pela produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas (MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003).

As bactérias ácido-láticas são caracterizadas como Gram-positivas, geralmente não móveis, não esporuladas, catalase negativas e produtoras de ácido láctico, como o maior ou único produto fermentativo do metabolismo. Os principais gêneros são: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*.

Para que a fermentação dos alimentos seja eficaz e livre de contaminações, as bactérias ácido-láticas devem ser utilizadas como culturas iniciadoras, nas quais são inicialmente isoladas, cultivadas e posteriormente introduzidas no alimento que se queira fermentar. Por outro lado, alimentos fermentados espontaneamente, como a maioria dos produtos de pescado, sem a utilização de culturas iniciadoras, apresentam uma microflora

Received 1/8/2008

Accepted 23/1/2010 (003744)

<sup>1</sup> Laboratório de microbiologia aplicada, Universidade do Vale do Itajaí - Univali, Rua Uruguai, 458, CEP 88302-202, Itajaí, SC, Brasil, E-mail: marcus.silva@univali.br

\*Corresponding author

ineficiente e incontrolável, gerando produtos pouco seguros e de baixa qualidade (GIRAFFA, 2003).

O estudo da fisiologia das BAL é importante para promover um entendimento mais amplo dos mecanismos de adaptação empregados por estes micro-organismos, em relação aos processos de fermentação do pescado e de outros alimentos. Dessa forma, estes organismos podem ser utilizados de forma mais eficiente na indústria alimentícia, obtendo-se assim um maior controle do processo de produção e, conseqüentemente, da qualidade do produto final. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos o isolamento e a identificação de bactérias ácido-láticas isoladas de amostras de pescado marinho, bem como a caracterização fisiológica dos isolados obtidos e uma linhagem referência.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Coleta e preparo das amostras

As amostras de peixes utilizadas para a realização do experimento foram: sardinha (*Sardina pilchardus*), guaiúva (*Oligoplites saliens*), merluza (*Merluccius* sp.) e abrótea (*Urophycis brasiliensis*). Os espécimes foram coletados em uma rede de arrasto e fornecidos pelo Oceanógrafo José Maria da Conceição, MSc.

As vísceras dos peixes (aproximadamente 10 g) foram cortadas e transferidas para um Erlenmeyer (250 mL), respectivo para cada uma das espécies amostradas, contendo 90 mL de solução salina (NaCl a 0,85%). Em seguida, a mistura (solução salina + pescado) foi triturada, obtendo-se uma amostra homogênea (AMERICAN..., 1992).

Isolamento de Bactérias Ácido-láticas de Pescado Marinho. O isolamento das bactérias foi realizado pelo método de isolamento direto em meio sólido. Primeiramente, foram preparadas diluições decimais seriadas até  $10^{-3}$ , em solução salina estéril (0,85%), a partir das amostras homogeneizadas. Em seguida, 0,1 mL de cada uma das amostras diluídas e brutas foram inoculados em placas de Petri contendo meio ágar BHI, pela técnica de espalhamento em placas. Por fim, as placas foram transferidas para uma estufa à temperatura de 30 °C, incubadas em anaerobiose por sete dias. Após a incubação, colônias de diferentes morfologias foram repicadas em placas de Petri contendo meio ágar BHI, para o seu isolamento. Este procedimento foi repetido até a obtenção de culturas puras (AMERICAN..., 1992; RINGO; GATESOUBE, 1997), que foram conservadas em meio MRS sólido.

### 2.2 Caracterização fenotípica das bactérias isoladas

As bactérias isoladas foram identificadas utilizando-se critérios morfológicos, bioquímicos e diferentes condições de crescimento. As características morfológicas estudadas foram: reação de Gram, morfologia e arranjo celular, e motilidade. O crescimento dos organismos foi verificado nas seguintes condições: 15 °C e 45 °C, e a uma concentração de 6,5% de NaCl. Os testes bioquímicos realizados foram: produção de catalase (com  $H_2O_2$  a 3%); degradação da arginina em meio

para descarboxilase de Moeller; fermentação e produção de gás da glicose em meio MRS contendo tubos de Durham invertidos, e produção de ácido a partir dos carboidratos lactose, celobiose, manitol, maltose, manose, rafinose, galactose, xilose e frutose (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; SMIBERT; KRIEG, 1994). A partir do resultado destes testes, os organismos foram identificados segundo Carr, Chill e Maida (2002).

### 2.3 Caracterização fisiológica dos isolados obtidos

Determinação das temperaturas ótima, máxima e mínima de crescimento. Para determinação dos valores de temperatura ótimo, máximo e mínimo de crescimento, as bactérias foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer (500 mL), contendo 250 mL de meio MRS, às temperaturas de 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C. O inóculo foi feito a partir de uma pré-cultura em meio MSR, incubada por 24 horas, a 30 °C. Após a inoculação das bactérias, os frascos referentes às temperaturas de 5 °C a 20 °C foram transferidos para estufa refrigerada com circulação de ar, enquanto que os frascos referentes às temperaturas de 30 °C a 50 °C foram colocados em banho-maria. Em nenhum destes procedimentos, as culturas estavam sob agitação. O tempo de incubação, em todos os casos, foi de 48 horas. O valor máximo de temperatura correspondeu ao maior valor deste parâmetro no qual o organismo apresenta crescimento. Da mesma forma, o valor mínimo de temperatura correspondeu ao menor valor no qual se observa crescimento. O valor ótimo de temperatura para o crescimento de um determinado organismo foi determinado a partir da taxa de crescimento deste organismo em cada um dos valores de temperatura. O valor ótimo de temperatura correspondeu ao valor no qual a taxa de crescimento é máxima. Para a obtenção dos valores de taxa de crescimento, a densidade óptica (605 nm) das culturas foi determinada ao longo do experimento, como medida de crescimento. Estas determinações foram feitas de uma em uma hora, durante as primeiras três horas, e de duas em duas horas, durante cinco horas após a inoculação, incluindo o tempo inicial. A partir das medições de densidade óptica, a taxa de crescimento foi calculada, como descrito a seguir. Este procedimento foi repetido três vezes (BREZNAK; COSTILOW, 1994).

Determinação das concentrações ótimas, máximas e mínimas de sódio para o crescimento. Para determinação das concentrações de sódio ótima, máxima e mínima de crescimento, as bactérias foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer (500 mL), contendo 250 mL de meio MRS, nas seguintes concentrações de sódio: 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 15%. O inóculo foi feito a partir de uma pré-cultura em meio MRS, incubada por 48 horas, a 30 °C. Após a inoculação, os frascos foram transferidos para uma estufa à temperatura de 30 °C. As concentrações ótimas, máximas e mínimas foram determinadas da mesma forma descrita para a temperatura. Este procedimento foi repetido três vezes (BOWMAN, 2001).

Efeito de Solutos Compatíveis Sobre o Crescimento de Bactérias Ácido-láticas na Presença do Sódio. Para a determinação do efeito de solutos compatíveis sobre o crescimento das bactérias isoladas na presença do sódio, estas foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer (500 mL), contendo 250 mL de meio MRS e solutos compatíveis (ROBERT et al.,

2000), nas seguintes concentrações de sódio: 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10% e 15%. O inóculo foi feito a partir de uma pré-cultura em meio MRS, incubada por 48 horas, a 30 °C. Após a inoculação, os frascos foram transferidos para uma estufa à temperatura de 30 °C. As concentrações ótima, máxima e mínima foram determinadas da mesma forma descrita para a temperatura. Este procedimento foi repetido três vezes.

Calculo da taxa de crescimento. A taxa de crescimento foi calculada por meio de regressão linear dos valores logaritizados ( $\log_{10}$ ) de densidade óptica em relação ao tempo. A partir do coeficiente angular obtido, a taxa de crescimento foi calculada pela fórmula  $K = a \cdot 2,303$ , sendo  $K$  = taxa de crescimento e  $a$  = coeficiente angular (WHITE, 2000).

## 2.4 Análise dos dados

Os dados foram armazenados e analisados graficamente, em planilhas do software Microsoft Excel, e analisados estatisticamente com ANOVA, e pelo teste de Tukey para múltiplas amostras, utilizando o software Statistica®.

## 3 Resultados e discussão

Por meio do processo de isolamento, foram obtidas bactérias ácido-láticas de apenas duas espécies, sardinha e guaivira. Os organismos isolados foram identificados em três espécies distintas, representadas por seis, uma e duas linhagens (Tabela 1).

Avaliando-se os relatos fornecidos na literatura, pode-se observar que o gênero *Lactobacillus* é comumente relatado como flora abundante em peixes (RINGO et al., 1997). Entretanto, as espécies descritas de *Lactobacillus* são distintas daquelas identificadas no presente trabalho. Por exemplo, RINGO;

GATESOUBE, (1997) isolaram *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* da região gastrointestinal de truta ártica (*Salvelinus alpinus*). Assim como estes autores, outros também relatam a presença de gêneros distintos de bactérias ácido-láticas em peixes, como, por exemplo, *Carnobacterium* e *Streptococcus*, sendo este último como patógeno de trutas, enguias e outras espécies (RINGO et al., 1997). No presente estudo, duas espécies de bactérias ácido-láticas foram encontradas na amostra de Sardinha, *L. farciminis* S1 e *L. homohiochii* F3. Já na amostra de Guaivira, apenas *L. intestinalis* G1 foi identificado. Esta diferença de espécies de micro-organismos nos diferentes peixes utilizados, como amostras, pode estar relacionada a diversos fatores, como a própria espécie de peixe utilizada, a localidade de captura dos peixes e a sua base alimentar, que tende a ser determinante para a composição da flora gastrintestinal destes (RINGO et al., 1997).

Crescimento em diferentes temperaturas. Foi analisado o crescimento em diferentes temperaturas de duas linhagens derivadas do isolamento a partir do pescado marinho, *L. homohiochii* F3 e *L. intestinalis* G1, e de uma linhagem referência, *L. mesenteroides* ATCC8293. O micro-organismo *L. homohiochii* F3 apresentou crescimento mínimo à temperatura de 5 °C, melhorando significativamente seu crescimento a partir de 20 °C. O crescimento máximo e ótimo ocorreu a 40 °C, cessando a temperaturas acima deste valor (Tabela 2). Os valores das taxas de crescimento para as diferentes temperaturas apresentaram diferença significativa entre si ( $p \geq 0,000159$ ). O micro-organismo *L. intestinalis* G1 apresentou crescimento similar a 5 °C e a 10 °C, porém com diferença estatisticamente significante entre si ( $p = 0,000160$ ). O crescimento ótimo foi verificado a 30 °C, apresentando valores de taxa de crescimento nesta temperatura com diferença significativa em termos estatísticos, em relação com

**Tabela 1.** Linhagens de bactérias ácido-láticas isoladas do pescado marinho.

Amostras de peixes	Data de isolamento	Código da linhagem	Espécies
Sardinha	26/11/2004	F1	<i>Lactobacillus homohiochii</i>
Sardinha	26/11/2004	F3	<i>Lactobacillus homohiochii</i>
Sardinha	26/11/2004	F4	<i>Lactobacillus homohiochii</i>
Sardinha	26/11/2004	F7	<i>Lactobacillus homohiochii</i>
Sardinha	26/11/2004	F8	<i>Lactobacillus homohiochii</i>
Sardinha	26/11/2004	F10	<i>Lactobacillus homohiochii</i>
Sardinha	12/08/2004	S1	<i>Lactobacillus farciminis</i>
Guaivira	12/08/2004	G1	<i>Lactobacillus intestinalis</i>
Guaivira	12/08/2004	G2	<i>Lactobacillus intestinalis</i>

**Tabela 2.** Médias das taxas de crescimento (K) de três linhagens de bactérias ácido-láticas em diferentes temperaturas.

Temperaturas	Taxa de crescimento		
	<i>Lactobacillus homohiochii</i> F3	<i>Lactobacillus intestinalis</i> G1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC8293
5 °C	0,04	0,06	-
10 °C	0,08	0,06	-
15 °C	0,13	0,12	0,14
20 °C	0,31	0,33	0,17
30 °C	0,50	0,41	0,18
40 °C	0,64	0,30	-
45 °C	-	-	-

as demais temperaturas testadas ( $p \geq 0,000159$ ), exceto a 10 °C. O crescimento cessou a temperaturas acima de 40 °C (Tabela 2). Em contraste, pode-se verificar que *L. mesenteroides* ATCC8293 não apresentou crescimento a temperaturas abaixo de 15 °C e acima de 30 °C. Seu crescimento máximo e ótimo foi verificado a 30 °C (Tabela 2), apresentando, estatisticamente, diferença de crescimento nas temperaturas de 15 °C e 30 °C ( $p = 0,006449$ ), fato ausente nas temperaturas de 15 °C e 20 °C.

Semelhante ao presente trabalho, Ishikawaa et al. (2003) estudaram a taxa de crescimento de bactérias ácido-láticas isoladas de organismos marinhos e verificaram que a temperatura ótima de crescimento das amostras foi entre 37 °C e 40 °C. A taxa de crescimento para as diferentes temperaturas da linhagem M13-2 (*Marinilactibacillus psychrotolerans*) foi de 0,36 a 25 °C; 0,52 a 30 °C; 0,60 a 37 °C; 0,42 a 40 °C, e 0,02 a 42,5 °C, tendo uma taxa de crescimento máxima observada à temperatura de 37 °C. Em comparação com os micro-organismos estudados, *L. homohiochii* F3 pode ser considerado mais termotolerante que *Marinilactibacillus psychrotolerans*, tendo maior taxa de crescimento a 40 °C.

O crescimento em diferentes temperaturas por bactérias do gênero *Lactobacillus* também foi estudado por outros autores. A linhagem *Lactobacillus casei* ATCC4646, por exemplo, teve seu crescimento restrito ao intervalo de 32 °C a 45 °C (MA; MARQUIS, 1997). Esta diferença pode estar relacionada com os locais de isolamento destes micro-organismos, pois *Lactobacillus casei* ATCC4646 é originado de cáries dentárias, um ambiente com temperaturas mais elevadas e mais constantes que o ambiente marinho.

Crescimento em diferentes concentrações salinas na presença de solutos orgânicos. O crescimento das três linhagens também foi analisado na presença de diferentes porcentagens de NaCl e de três solutos orgânicos testados individualmente. O micro-organismo *L. homohiochii* F3, na ausência de solutos orgânicos, tolerou apenas até 2,5% de sal no meio, apresentando máximo crescimento na ausência de sal. Nas demais concentrações salinas, não houve crescimento celular. Pode-se verificar que a adição dos solutos orgânicos no meio permitiu que o micro-organismo adquirisse capacidade de crescer até 5% de sal. Note-se que os valores das taxas de crescimento na ausência de solutos e na presença dos mesmos, mostraram-se estatisticamente diferentes entre si ( $p = 0,000227$ ) (Tabela 3).

O micro-organismo *L. intestinalis* G1, na ausência de solutos orgânicos, no meio, cresceu até 7,5% de sal. Para

**Tabela 3.** Médias das taxas de crescimento (K) de *Lactobacillus homohiochii* F3 em diferentes concentrações salinas, na ausência e na presença de três solutos orgânicos distintos.

Concentração salina	Taxa de crescimento			
	Sem solutos	Trealose	Glicina betaína	Sacarose
0%	0,42	0,46	0,46	0,35
2,50%	0,31	0,41	0,31	0,55
5%	-	0,28	0,09	-
7,50%	-	-	-	-
10%	-	-	-	-
15%	-	-	-	-

*L. intestinalis* G1, a presença dos diferentes solutos orgânicos, no meio, não foi eficiente para promover um aumento da tolerância ao sal nas concentrações 10% e 15% (Tabela 4). Porém, ao se realizar o teste estatístico, todas as taxas de crescimento calculadas na ausência e na presença de solutos compatíveis, foram significativamente diferentes entre si ( $p = 0,000231$ ).

Em meio ausente de solutos orgânicos, o micro-organismo *L. mesenteroides* ATCC8293 cresceu até 2,5% de sal, podendo-se verificar, nesta concentração, uma maior taxa de crescimento quando comparado a 0% de sal. O soluto glicina-betaína não foi eficiente para este micro-organismo a ponto de permitir com que tolerasse maiores concentrações salinas. Já os solutos trealose e sacarose favoreceram para que o micro-organismo crescesse também a uma concentração de 5%, sendo a maior taxa de crescimento verificada na presença de sacarose (Tabela 5). Estatisticamente, as taxas de crescimento obtidas foram diferentes significativamente entre si nos diferentes casos testados ( $p \geq 0,000227$ ), exceto os valores calculados para a sacarose a 0 e 2,5% de NaCl, que não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

Segundo os dados fornecidos na literatura, o gênero *Lactobacillus* seria um dos mais halotolerantes entre as BAL, tendo sido relatado crescimento na presença de até 10% de NaCl (Paludan-Muller et al., 2002). Algumas espécies de *Lactobacillus* também apresentam o crescimento limitado a baixas concentrações de NaCl, como, por exemplo, *Lactobacillus sakei* (4%) (MARCEAU et al., 2004), *Lactobacillus delbrueckii* (3,48%) e *Lactobacillus bulgaricus* (1,74%) (HUTKINS; ELLEFSO; KASHKET, 1987). Ishikawa et al. (2003), ao calcularem a taxa de crescimento para a espécie *Marinilactibacillus psychrotolerans* em diferentes concentrações salinas, verificaram que essas taxas

**Tabela 4.** Médias das taxas de crescimento (K) de *Lactobacillus intestinalis* G1 em diferentes concentrações salinas, na ausência e na presença de três solutos orgânicos distintos.

Concentração salina	Taxa de crescimento			
	Sem solutos	Trealose	Glicina betaína	Sacarose
0%	0,44	0,43	0,42	0,48
2,50%	0,29	0,35	0,31	0,35
5%	0,25	0,22	0,15	0,21
7,50%	0,14	0,13	0,08	0,11
10%	-	-	-	-
15%	-	-	-	-

**Tabela 5.** Médias das taxas de crescimento (K) de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293 em diferentes concentrações salinas, na ausência e na presença de três solutos orgânicos distintos.

Concentração salina	Taxa de crescimento			
	Sem solutos	Trealose	Glicina betaína	Sacarose
0%	0,06	0,26	0,21	0,11
2,50%	0,15	-	0,25	0,12
5%	-	0,15	-	0,22
7,50%	-	-	-	-
10%	-	-	-	-
15%	-	-	-	-

umentavam com o aumento da concentração de sal. Fato observado também neste trabalho, para os micro-organismos *L. mesenteroides* ATCC8293, que também utilizaram o NaCl para seu crescimento, num primeiro momento, podendo estes ser considerados halofílicos.

Além do sal, outros compostos podem causar estresse celular, como, por exemplo, os açúcares. Estes, em altas concentrações no meio, causam um estresse osmótico, porém de forma bem mais leve que os sais, uma vez que promovem um rápido equilíbrio entre os meios intra e extracelular. Em contradição, segundo Glaasker et al. (1998), as células teriam baixa afinidade pelos açúcares, o que os tornaria pouco eficientes na osmoproteção. Tal fato que não foi observado no presente trabalho, no qual a sacarose e a trealose tiveram efeitos benéficos na regulação osmótica. O soluto trealose foi capaz de permitir que *L. homohiochii* F3 e *L. mesenteroides* ATCC8293 conseguissem crescer até uma concentração de 5% de NaCl, e a sacarose reduziu eficientemente a inibição de crescimento de *L. mesenteroides* ATCC8293 ocasionado pelo NaCl, permitindo que este crescesse também até uma concentração de 5% de sal no meio; esses fatos não foram observados na ausência destes solutos.

#### 4 Conclusões

Dentre as linhagens isoladas, pode-se verificar que o gênero *Lactobacillus* é flora dominante nos peixes analisados (Sardinha e Guaivira), em relação ao grupo das BAL. Em decorrência dos testes fisiológicos de temperatura, *L. intestinalis* G1 e *L. homohiochii* F3, quando comparados com *L. mesenteroides* ATCC8293, mostraram-se mais termotolerantes. Para os testes de salinidade, *L. homohiochii* F3 e *L. intestinalis* G1 podem ser ditos halotolerantes, quando comparados com *L. mesenteroides* ATCC8293, que se mostrou levemente halofílico. Por fim, mostra-se importante a presença dos solutos orgânicos glicina betaína, trealose e sacarose; estes podem ser considerados compostos eficazes no processo de osmoproteção para as linhagens estudadas, uma vez que foram responsáveis pela regulação osmótica em condições adversas.

#### Referências bibliográficas

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3th ed. Washington: APHA, 1992.
- AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.
- BOWMAN, J. P. Methods for psychrophilic bacteria. In: PAUL, J. H. **Marine Microbiology**. London: Academic Press, 2001. cap. 29, p. 591-614. (Methods in Microbiology, v. 30).
- BREZNAK, J. A.; COSTILOW, R. N. Physicochemical factors in growth. In: GERHARDT, P. et al. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington: ASM Press, 1994. cap. 6, p. 137-154.
- CARR, F.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002. PMID:12546196. <http://dx.doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 251-260, 2003. PMID:15109787. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.005>
- GLAASKER, E.; TJAN, F. S. B.; TER STEEG, P. F.; KONINGS, W. N.; POOLMAN, B. Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 17, 1998.
- HUTKINS, R. W.; ELLEFSON, W. L.; KASHKET, E. R. Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 2275-2281, 1987.
- ISHIKAWA, M. et al. *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. Nov. Sp. Nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 711-720, 2003. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02446-0>
- MA, Y.; MARQUIS, R. E. Thermophysiology of *Streptococcus mutans* and related lactic-acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 72, p. 91-100, 1997. PMID:9298187. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1000290426248>
- MARCEAU, A. et al. Evidence of involvement of at least six proteins in adaptation of *Lactobacillus sakei* to cold temperatures and addition of NaCl. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7260-7268, 2004.
- MARTINIS, E. C. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 195-199, 2003.
- PALUDAN-MULLER, C. et al. Fermentation and microflora of *Plaa-som*, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 61-70, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00688-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00688-2)
- RINGO, E.; GATESOUBE, F. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, p. 177-203, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00299-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00299-8)
- ROBERT, H. et al. Glycine betaine, carnitine, and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 509-517, 2000. PMID:10653711. PMID:91856. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.2.509-517.2000>
- SMIBERT, R. M.; KRIEG, E. N. R. Phenotypic characterization. In: GERHARDT, P. et al. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington: ASM Press, 1994. cap. 25, p. 607-654.
- WHITE, D. **The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**. Oxford: Oxford University Press, 2000.