



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS – PUC Goiás**  
**ESCOLA DE ENGENHARIA**  
**CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Aula nº 9 – Características Culturais e Identificação bioquímica de bactérias**

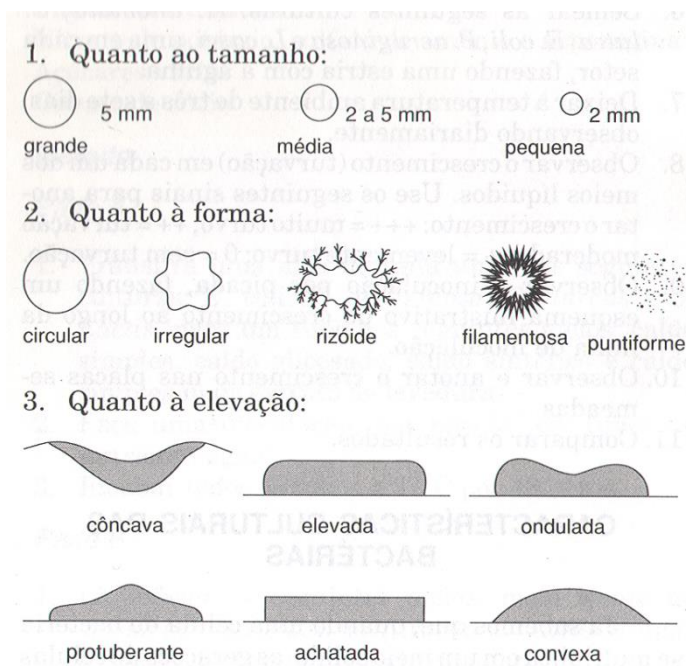
**Introdução**

Para a identificação das bactérias diversas características são utilizadas, como a morfologia macroscópica e microscópica, metabólicas ou bioquímicas, antigênicas ou sorológicas, genéticas, ecológicas, etc.

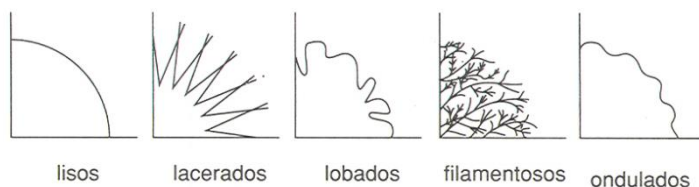
Na microbiologia de alimentos clássica sé muito utilizada a morfologia, características bioquímicas e sorológicas. Atualmente vem sendo empregadas a caracterização genética, principalmente para microrganismos emergentes viáveis, mas não cultiváveis.

Na caracterização morfológica são observados o tamanho, forma, elevação, bordas e estrutura da colônia, assim como seu brilho, cor, aspecto e também determinados o tamanho, forma, agrupamentos, motilidade que as células bacterianas possuem.

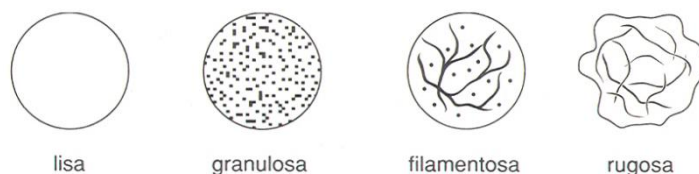
As figuras abaixo apresentam um esquema das características das colônias de bactérias.



4. Quanto aos bordos:



5. Quanto à estrutura:



Fonte: Neder (1992)

As características culturais dos microrganismos também podem ser observados nos meios de cultura, tanto os líquidos quanto os sólidos macroscopicamente:

- Meios de Cultura líquidos:

Tipo de crescimento:

- na superfície; formação de película; crescimento formando grumos ou em forma de membrana ou em anel (circular).
- Turvação intensa ou suave.
- Cheiro da cultura: nenhum, pronunciado, semelhante a algum odor conhecido, como odor de frutas.
- Formação de sedimento: compacto, grumoso, viscoso, granular, escamoso, quantidade do sedimento (abundante, escasso, nulo).
- Pigmentação no meio de cultura: presença, cor.

- Meios de Cultura Sólidos

- Crescimento: nulo, escasso, abundante.
- Pigmentação: cor da colônia, verificando em meios comuns e seletivos e diferenciais.
- Aspecto do crescimento: brilhoso ou fosco;
- Caracteres ópticos: transparência, ou opaco;
- Fluorescência: positiva ou negativa quando expostos, por exemplo à luz UV.
- Consistência do crescimento microbiano: viscosa, membranácea, quebradiça, arenosa.
- Emulsionabilidade - nula, fácil, difícil;
- Odor - ausente, presente, semelhante a odor de frutas ou outro.
- Produção de exsudados: se presentes, qual é a cor e quando são produzidos.

Após a observação das características macroscópicas devem ser feitas lâminas utilizando preparações a fresco e fixadas e coradas. Neste último caso, esfregaços são preparados para colorações especiais, na observação da morfologia microscópica

(forma, arranjos, tamanho e reação ao Gram), presença ou ausência de esporos (forma e localização, com deformação ou não do corpo bacteriano), flagelos, observados através da motilidade do microrganismo, presença de cápsulas, entre outras características.

Muitas culturas bacterianas são similares em suas características morfológicas e culturais. No entanto possuem diferenças em suas reações metabólicas. Assim, através das chamadas provas bioquímicas, são detectadas ações referentes à capacidade que têm as bactérias de desdobrar certos substratos como açúcares, proteínas e gorduras, dependendo do tipo de metabolismo, ou seja, das enzimas envolvidas nele.

A investigação das atividades metabólicas das bactérias “in vitro” é chamada **de Provas Bioquímicas** e servem para auxiliar o microbiologista a identificar grupos ou espécies de bactérias ou leveduras através da verificação das transformações químicas, que ocorrem num determinado substrato, pela ação das enzimas de um dado microrganismo. Como muitas vezes um determinado microrganismo possui um sistema enzimático específico, promovendo transformação bioquímica específica, as provas bioquímicas podem ser utilizadas na prática para a sua caracterização.

Para a realização das provas bioquímicas é necessário utilizar meios de cultivo especiais contendo o substrato a ser analisado e fornecer ao microrganismo as condições nutritivas e ambientais necessárias ao seu desenvolvimento.

Para a realização das provas bioquímicas é necessário utilizar meios de cultivo especiais contendo o substrato a ser analisado e fornecer ao microrganismo as condições nutritivas e ambientais necessárias ao seu desenvolvimento.

Os microrganismos utilizam os carboidratos por via fermentativa ou oxidativa, sendo útil na identificação bacteriana.

Os microrganismos variam consideravelmente em sua capacidade de degradar e fermentar carboidratos. Carboidratos são substratos básicos que bactérias utilizam para a geração de ATP. Dependendo do tipo de relação com o oxigênio livre, a bactéria pode metabolizá-lo numa rota oxidativa (aerobiose) envolvendo a glicólise, o ciclo de Krebs e a cadeia de transporte de elétrons, em que o oxigênio é o receptor final e uma grande quantidade de ATP é gerada, com a conversão relativa final do carboidrato em água e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

As bactérias de metabolismo fermentativo (anaerobiose) não têm o oxigênio como aceptor final na cadeia de transporte de elétrons mas, são capazes de fermentar o

ácido pirúvico, na ausência de oxigênio, originando ácidos orgânicos e ATP, ainda que em menor quantidade. Assim a fermentação, se caracteriza por um mecanismo anaeróbio de produção de energia. Neste processo tanto o doador quanto o receptor final de elétrons são moléculas orgânicas.

Alguns são capazes de metabolizar um ou vários carboidratos, produzindo gases e ácidos, outros, ácidos mas não gases, e ainda outros, são incapazes de fermentar carboidratos.

Algumas bactérias quando fermentam a glicose produzem acetil metil carbinol (acetoína), que em meio alcalino e em aerobiose é oxidado formando diacetil, o qual em presença de peptona e alfa naftol apresenta coloração vermelha. O constituinte da peptona responsável por essa reação é o núcleo guanidino do aminoácido arginina.

Proteínas podem ser hidrolisadas com liberação de aminoácidos, indol, H<sub>2</sub>S, etc. A produção de gás sulfídrico é devida à utilização de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) e compostos orgânicos que contêm enxofre como os contidos em peptonas e caseínas que geralmente fazem parte de meios de cultura pela bactéria, que em presença de sais de ferro, presentes no meio de cultura, formará sulfeto insolúvel de cor negra. Acredita-se que seja devido à produção de um enzima – cisteína dissulfidrase. O emprego do papel de filtro impregnado com solução do sal (acetato de chumbo) é melhor método do que o da incorporação do sal ao meio. O microrganismo pode ser cultivado em caldo simples ou água peptonada, desde que cresça bem no meio

Algumas bactérias produzem a enzima triptofanase que agindo sobre o aminoácido triptofano, leva à formação de indol, que ao reagir com o paradimetilaminobenzaldeído, adicionado ao meio de cultura, formará um anel róseo neste.

Microrganismos podem utilizar citrato como única fonte de carbono, provocando alcalinidade ao meio de cultura pela produção de substâncias alcalinas, como oxaloacetato, acetato, formiato, etc. Em bactérias, a enzima responsável pelo processo é a citrato desmolase ou citratase. A indicação da presença de substâncias alcalinas no meio de cultura pode ser evidenciada pelo uso de um indicador, como o azul de bromotimol.

A coagulase, enzima produzida por *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de coagular, preferencialmente, humano ou de coelho. Esta prova é fundamental nas análises dessa bactéria em microbiologia de alimentos.

Bactérias proteolíticas são capazes de decompor ou hidrolisar a gelatina, fazendo-as perder suas características geleificantes. Isto se deve a produção de uma enzima extracelular, a gelatinase. A presença da enzima pode ser demonstrada inoculando meio de cultura contendo gelatina e após a incubação, colocar os tubos na geladeira. Mantendo-se sólido não há produção da enzima, enquanto houver liquefação há produção.

Certas bactérias são capazes de produzir uréase, uma enzima que decompõe a uréia com liberação de amônia. Os testes geralmente envolvem a utilização de meios de cultura contendo uréia em sua composição e a constatação de atividade da uréase é feita com indicadores para detectar o aumento de pH. A formação de amônia pelas bactérias resulta principalmente da desaminação dos aminoácidos presentes no meio de cultura.

Muitas bactérias produzem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em presença de oxigênio livre. A catalase é uma enzima capaz de decompor o peróxido de hidrogênio, com formação de água e oxigênio molecular. Na presença de água oxigenada ( $H_2O_2$  3 a 5%), ocorre borbulhamento ou efervescência pela cultura devido à liberação de oxigênio. A catalase é produzida por muitos microrganismos e é usualmente empregada para diferenciar *Staphylococcus*, que são catalase positivos de *Streptococcus*, catalase negativos, ou os bacilos Gram positivos catalase negativos *Lactobacillus* de *Listeria* e a maioria dos *Corynebacterium* catalase positivos.

Algumas bactérias têm a propriedade de hidrolisar a caseína, formando-se, pela hidrólise, compostos mais simples. A caseína, insolúvel em condições naturais, é transformada em produtos solúveis. Essa transformação é comumente denominada peptonização. A enzima extracelular responsável pela hidrólise da caseína é a casease. A presença dessa enzima é evidenciada facilmente, inoculando-se a superfície de ágar-leite com o microrganismo em estudo. Nesses casos, observam-se em torno das colônias zonas claras, em contraste com o resto do meio que permanece turvo.

Há inúmeras outras provas bioquímicas, dependendo do tipo de análise realizada. Quando há necessidade utilizam-se métodos complementares envolvendo

procedimentos específicos de sorologia, tipagem com bacteriófagos, sensibilidade a antibióticos, produção de toxinas, etc.

Atualmente, com os avanços da biologia molecular aliados à disponibilização pela indústria de equipamentos ultra-sofisticados, têm surgido métodos sofisticados de identificação de espécies como análise do perfil de ácidos graxos da parede (“*Fatty-acid analysis*”), homologia de DNA, sondas biológicas, eletroforese de proteínas, etc. Entretanto, muitos poucos laboratórios de microbiologia do país possuem os equipamentos e reagentes para utilizar esses métodos como procedimento de rotina na identificação de espécies.

### Procedimento Experimental

Serão fornecidas culturas bacterianas para a realização dos seguintes testes:

#### ① **Testes IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Prova de Voges-Proskauer e citrato**

Muito utilizado para caracterização de enterobactérias, em particular *Escherichia coli*. Realizar a inoculação primeiro no ágar citrato, para evitar a introdução de compostos de carbono originários dos demais meios-teste.

- **Teste de citrato**: Transferir um inoculo **leve** da cultura para a rampa dos tubos de ágar Citrato de Simmons e incubar a 35 °C/48h. O crescimento com viragem alcalina, alterando a cor do meio de verde para azul, é indicativo de teste positivo. O não crescimento e a não alteração da cor do meio indicam teste negativo.

- **Teste do indol** (caldo triptona 1%): Inocular uma alçada com inoculo **leve** da cultura e incubar a 35 °C/24h. Adicionar 5 gotas do reagente de Kovacs a cada 4,0 ml de cultura e agitar levemente. Observar se há desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura (teste positivo) ou se o anel permanece na cor amarela do reagente (teste negativo).

- **Teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer** (caldo VM-VP ou Clark-Lubs): inocular uma alçada com inoculo leve da cultura e incubar a 35 °C/48h.

. **Teste VP**: transferir assepticamente, 1,0 ml da cultura para um tubo de ensaio, adicionar 0,6 ml de solução de  $\alpha$ -naftol 5% e agitar. Adicionar em seguida 0,2 ml de solução de KOH 40%. Agitar suavemente o tubo para oxigenar o meio, a fim de oxidar a acetoina e obter uma reação de cor e deixar em repouso à temperatura ambiente por 15

a 30 minutos (até 1 hora). O aparecimento de coloração rósea ou vermelha, começando na superfície, indica teste VP positivo (presença de acetoina). A permanência do meio na cor do reagente (amarelada ou ligeiramente esverdeada) indica teste negativo

. **Teste VM:** Para realizar este teste, deve-se utilizar culturas com 96 horas de incubação. Para a realização do teste, adicionar a cada 205 ml da cultura, 5 gotas de solução de vermelho de metila, observando imediatamente se o meio adquire uma coloração vermelho ou amarela (teste negativo). O vermelho de metila é um indicador que já é ácido e indicará os graus de acidez por alterações de cor em uma escala de pH de 4,4 a 6,0. Com o pH de 4,4, o indicador ficará vermelho; com a diminuição da acidez (pH 6,0), o indicador passará para a cor amarela.

② **Fermentação de Carboidratos:** Transferir uma alçada com inóculo para o tubo contendo caldo vermelho de fenol suplementado com 1% do açúcar. Incubar a 35 °C/48h, com a tampa ligeiramente afrouxada, e observar a ocorrência de viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio de avermelhado para amarela (teste positivo). Viragem alcalina do indicador (de avermelhado para rosa escuro) ou não alteração da cor do meio indica teste negativo. Certificar-se de que cada tubo está marcado com o carboidrato e o microrganismo escolhido.

Nesta metodologia também se pode colocar tubos de Durham para verificar a produção de gás.

③ **Prova da Catalase:** Adicionar 1,0 ml de água oxigenada (peróxido de hidrogênio) 3% à cultura em meio líquido ou em ágar inclinado. Observar se ocorre borbulhamento imediato (teste positivo) ou não (teste negativo).

De acordo com os resultados, anotar na tabela:

Teste	Citrato	Indol	VP	VM	Ferment.1	Ferment.2	catalase
Resultado							

Discutir os resultados com o professor.