



## **AULA 5 – PROVAS BIOQUÍMICAS NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS**

### **1- INTRODUÇÃO**

Os microrganismos efetuam diversas reações bioquímicas para sua sobrevivência que dependem do seu sistema enzimático e da disponibilidade de nutrientes no ambiente onde se encontram. Determinadas atividades metabólicas microbianas, como a capacidade de degradar proteínas, aminoácidos ou fermentar hidratos de carbono, originam certos produtos finais cuja detecção mediante o uso de indicadores pode tanto auxiliar na identificação de grupos ou espécies quanto permitir a seleção de microrganismos que apresentem certas características metabólicas de interesse. Isto pode ser verificado através de provas bioquímicas no laboratório.

Para a realização das provas bioquímicas é necessário utilizar meios de cultura específicos contendo o substrato a ser analisado e fornecer ao microrganismo as condições nutritivas e ambientais necessárias ao seu desenvolvimento. A tabela 1 a seguir resume algumas das provas bioquímicas mais utilizadas nos laboratórios.

Tabela 1: Descrição de diferentes provas bioquímicas

Prova	Fundamento	Interpretação
Citrato	Determina se um microrganismo é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono para seu crescimento, com conseqüente alcalinização do meio	(-) Meio mantem a cor original verde (+) Meio torna-se azul
Indol	Determina a habilidade da bactéria em produzir indol (composto aromático) a partir da degradação do triptofano.	(-) Formação de um anel incolor na superfície (+) Formação de um anel vermelho na superfície
Amido	Determina a capacidade do microrganismo de hidrolisar o polímero do amido pela ação da enzima amilase	(+) Meio mantem a cor original (-) Meio torna-se roxa-preto
Catalase	Determina a presença da catalase capaz de quebrar o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água	(-) Ausência de bolhas (+) Formação de bolhas



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Escola de Engenharia de Lorena – EEL**

**Departamento de Biotecnologia**  
**Disciplina de Microbiologia Experimental – LOT2050**

Continuação da Tabela 1

Oxidase	Determina a presença da enzima citocromo C oxidase. Enzima da cadeia de transporte de elétrons própria de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos	(-) Não há mudança na cor (+) Formação da cor roxa
Urease	Determina a habilidade do microrganismo de degradar a ureia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease	(-) Meio mantém a cor original amarela (+) Meio torna-se rosa
Nitrato	Determina a capacidade da bactéria em transformar o nitrato em nitrito.	(-) Coloração amarela (+) Coloração vermelha
SIM Motilidade	Determina a capacidade da bactéria de se movimentar dentro do tubo de ensaio, produzindo uma turvação na região adjacente à picada.	Aspecto do crescimento bacteriano
Vermelho de Metilo	Determina a capacidade do microrganismo de oxidar a glicose com produção e estabilização de altas concentrações de produtos finais ácidos.	(-) Meio mantém a cor original (+) Meio torna-se vermelho

## 2- OBJETIVO

Realizar as Provas Bioquímicas do Citrato, Indol, Amido e Catalase em três amostras de Microrganismos distintos como método para, juntamente com a coloração de Gram (Aula 4), auxiliar a identificação de diferentes gêneros bacterianos.

## 3- MATERIAL E EQUIPAMENTO

### Material

- Alça de repicagem
- Laminas
- 3 Tubos (A, B e C) com as culturas de microrganismos distintos
- Tubos com meio de cultura líquido e sólido inclinado
- Reagente de Kovacs
- Peróxido de Hidrogênio 3%

### Equipamento

- Estufa bacteriológica
- Fluxo laminar



#### **4- PROCEDIMENTO**

Para cada uma das culturas bacterianas fornecidas (Tubo 1, 2 e o Controle), realizar os procedimentos descritos a seguir:

##### **4.1 PROVAS BIOQUÍMICAS**

###### **I. UTILIZAÇÃO DO CITRATO COMO FONTE DE CARBONO ORGÂNICO**

1. Com auxílio da alça de repicagem e em condições estéreis pegar uma amostra da cultura problema que está em meio líquido.
2. Semear no tubo com **meio sólido inclinado de Citrato**. Ver figura 1.
3. Incubar na estufa a 37°C por 24 horas.
4. Observar, se o meio de cultura se tornou azul, teste positivo, a bactéria utilizou o citrato liberando CO<sub>2</sub>. Se o meio ficou inalterado (verde) a prova negativo.

###### **II. METABOLISMO DO TRIPTOFANO (INDOL)**

1. Com auxílio da alça de repicagem e em condições estéreis pegar uma amostra da cultura problema que está em meio líquido.
2. Inocular no tubo com **meio líquido INDOL**. Ver figura 1.
3. Incubar na estufa a 37°C por 24 horas.
4. Adicionar de 3 a 5 gotas, pelas paredes do tubo, do reagente de Kovacs
5. Observar, se há a formação de um anel vermelho na superfície do tubo o teste é positivo, caso contrário o teste é considerado negativo.

###### **III. PRODUÇÃO DE AMILASE**

1. Com auxílio da alça de repicagem e em condições estéreis pegar uma amostra da cultura problema que está em meio líquido.



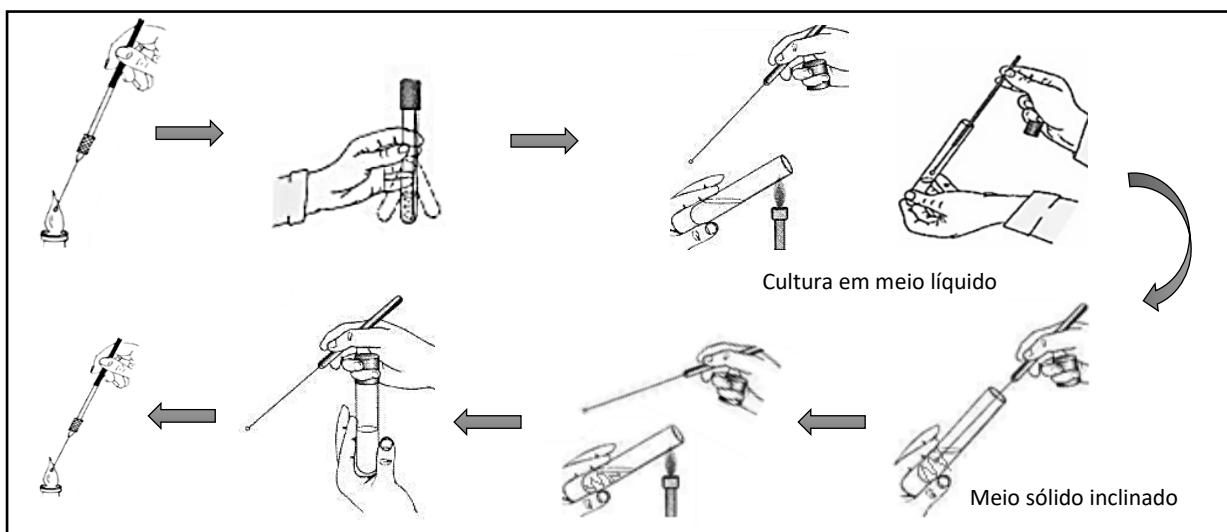
**Departamento de Biotecnologia**  
**Disciplina de Microbiologia Experimental – LOT2050**

2. Semear no tubo com **meio sólido inclinado** de **AMIDO**. Ver figura 1.
3. Incubar na estufa a 37°C por 24 - 48 horas.
4. Adicionar 3 gotas do reagente de **Lugol** na cultura crescida
5. Observar, se há formação de color roxa-preta no meio o teste é negativo, se não há coloração o teste será positivo, indicando que a bactéria produziu a enzima amilase para degradar o amido.

#### **IV. PRODUÇÃO DE CATALASE**

1. Colocar 1 mL de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) 3% diretamente no tubo com a cultura.
2. Observar, se há formação de bolhas o teste é positivo indicando a presença da enzima catalase. Se não há formação de bolhas o teste é negativo.

Figura 1. Semeadura em tubo com meio inclinado.



#### **4.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Escola de Engenharia de Lorena – EEL**

**Departamento de Biotecnologia**  
**Disciplina de Microbiologia Experimental – LOT2050**

De acordo com os resultados obtidos na Coloração de Gram e nas provas bioquímicas realizadas preencher a tabela 2 a seguir. Segundo a literatura e a Tabela 3 a que gênero microbiano corresponde cada cultura?

Tabela 2: Resultados obtidos para colocação de Gram e provas bioquímicas para as culturas A, B e C.

PROVA	CULTURA			Gênero possível
	A	B	C	
Gram				
Citrato				
Indol				
Amido				
Catalase				
Oxidase				

(+) Positivo (-) Negativo (+/-) Reação fraca

**ANEXO. MEIOS DE CULTURA E REAGENTES UTILIZADOS.**

**1. MEIO CASO-BOULLON**

Peptona de caseína ..... 17 g/L  
Peptona de soja ..... 3 g/L  
Cloreto de sódio..... 5 g/L  
Glicose ..... 2.5 g/L  
Hidrogenofosfato dipotássico ..... 2.5 g/L  
pH 7.3

**2. MEIO CITRATO (MEIO SIMONS)**

Di-hidrogenofosfato de amônio ..... 1 g/L



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Escola de Engenharia de Lorena – EEL**

---

**Departamento de Biotecnologia**  
**Disciplina de Microbiologia Experimental – LOT2050**

Hidrogenofosfato dipotássico .....	1 g/L
Cloreto de sódio.....	5 g/L
Citrato de sódio .....	2 g/L
Sulfato de magnésio .....	0.2 g/L
Azul de bromotimol .....	0.08 g/L
Agar .....	15 g/L
pH 6.9	

**3. MEIO MULLER HINTON**

Extrato de carne .....	2 g/L
Hidrolisado ácido caseína .....	17.5 g/L
Amido .....	1.5 g/L
Glicose .....	1 g/L
Agar .....	15 g/L
pH 7.3	

**4. MEIO LIQUIDO INDOL**

Triptona .....	20 g/L
Peptona .....	6.1 g/L
Sulfato de amônio e ferro (III) .....	5 g/L
Tiosulfato de sódio .....	0.2 g/L
Agar .....	15 g/L
pH 7,3	

**5. REAGENTE DE KOVACS**

Álcool butílico .....	75 mL
p-dimetil aminobenzaldeído .....	3 g/L
Ácido clorídrico .....	25 mL