



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 mantém 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 mantém 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, Amido e Catalase em amostras de Microrganismos distintos como método para auxiliar a identificação de diferentes gêneros bacterianos.

3- MATERIAL E EQUIPAMENTO

Material

- Alça de repicagem
- Laminas
- 2 Tubos (A e B) 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 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**.
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 CO₂. Se o meio ficou inalterado (verde) a prova negativa.

II. PRODUÇÃO DE AMILASE

- 1- Inocular na placa de petri com **meio sólido de AMIDO**. Ver figura 1.
- 2- Incubar na estufa a 37°C por 24 - 48 horas.
- 3- Adicionar 3 gotas do reagente de **Lugol** na cultura crescida
- 4- 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.

III. 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.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina de Microbiologia Experimental – LOT2050

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
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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena –EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina de Microbiologia Experimental – LOT2050

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