



PROVAS BIOQUÍMICAS NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

1- INTRODUÇÃO

Os microrganismos realizam diversas reações bioquímicas essenciais à sua sobrevivência, as quais dependem tanto do seu sistema enzimático quanto da disponibilidade de nutrientes no ambiente em que se encontram. Certas atividades metabólicas, como a degradação de proteínas e aminoácidos ou a fermentação de carboidratos, resultam em produtos específicos que, quando detectados por meio de indicadores apropriados, podem auxiliar na identificação de grupos ou espécies microbianas, além de possibilitar a seleção de microrganismos com características de interesse.

A verificação dessas atividades pode ser realizada através de provas bioquímicas em laboratório. Para isso, utilizam-se meios de cultura específicos que contenham o substrato a ser analisado, fornecendo ao microrganismo as condições nutricionais e ambientais adequadas ao seu crescimento.

A Tabela 1, a seguir, apresenta um resumo de algumas das provas bioquímicas mais empregadas em laboratórios de microbiologia.

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 consequente 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 roxo-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: da Teoria a Prática – LOT2053

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

3- MATERIAL E EQUIPAMENTO

Material

- Alça de repicagem
- Laminas
- culturas de microrganismos
- Tubos com meio de cultura específicos líquido e sólido inclinado
- Peróxido de Hidrogênio 3%

Equipamento

- Estufa bacteriológica
- Fluxo laminar



Departamento de Biotecnologia
Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053

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 em meio líquido. Ver figura 1.
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- Com auxílio da alça de repicagem e em condições estéreis pegar uma amostra da cultura em meio líquido.
- 2- Inocular na placa de petri com **meio sólido** contendo **AMIDO**.
- 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.

III. PRODUÇÃO DE LACTASE

- 1- Com auxílio da alça de repicagem e em condições estéreis pegar uma amostra da cultura em meio líquido.
- 2- Inocular em **meio líquido** contendo **LACTOSE**.



- 3- Incubar na estufa a 37°C por 24 - 48horas.
- 4- Observar, se há formação de bolhas retidas no tudo de Duhan.

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: da Teoria a Prática – LOT2053

4.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

De acordo com os resultados obtidos preencher a tabela 2 a seguir.

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

PROVA	A	B	C	Gênero possível
Gram				
Citrato				
Lactase				
Amido				
Catalase				

(+) 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
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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena –EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina de Microbiologia: da Teoria a Prática – LOT2053

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