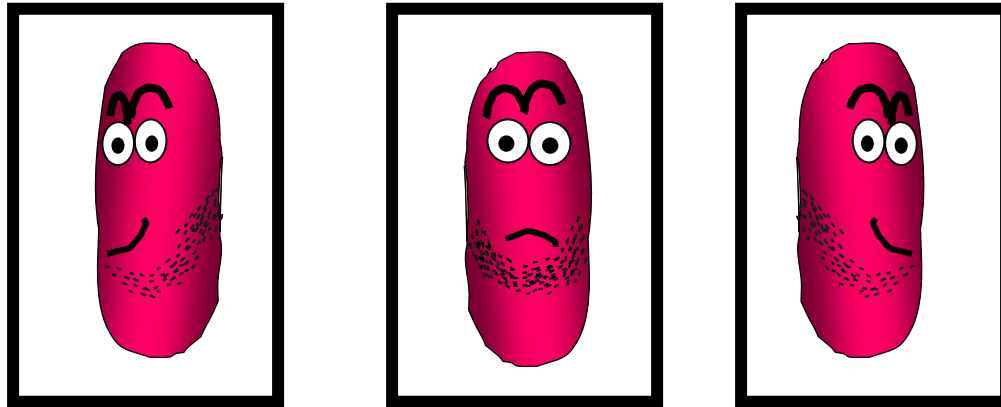


I terreni differenziali servono per raggiungere un'identificazione su base fenotipica



**I caratteri che si cercano
riguardano in genere:**

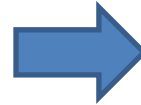
Strategie di produzione di energia

Prodotti finali della fermentazione

Degradazione di composti complessi

Terreni per identificazione

Per rivelare alcune
caratteristiche biochimiche



Raggiungere
l'identificazione di specie

Caratteristiche legate alla
produzione di energia

Test della citocromo-ossidasi

Tipo di catena respiratoria

fermentazioni

Analisi dei substrati fermentabili e
produzione di gas

OF-test

Tipo di metabolismo: fermentazione
o ossidazione di uno zucchero

Riduzione dei nitrati

Capacità o meno di usare il nitrato
come accettore terminale di elettroni

Rosso metile

Tipo di fermentazione ad acidi misti

Test di Voges Proskauer

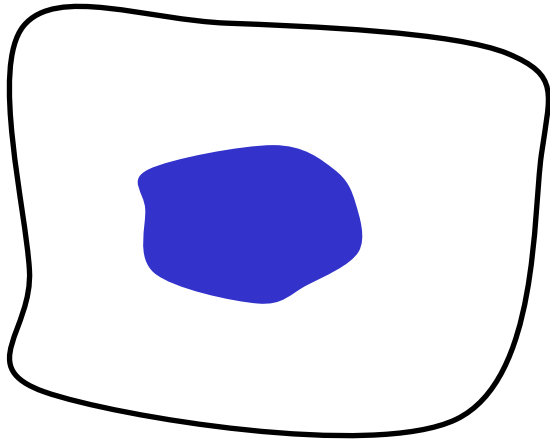
Tipo di fermentazione butanediolica

CITOCROMO_OSSIDASI

Sulle colonie isolate, oltre all'esame microscopico,
si possono effettuare direttamente alcuni test

Citocromo C- ossidasi

La presenza del citocromo C identifica uno dei
due tipi di catena respiratoria che si trovano tra
i batteri



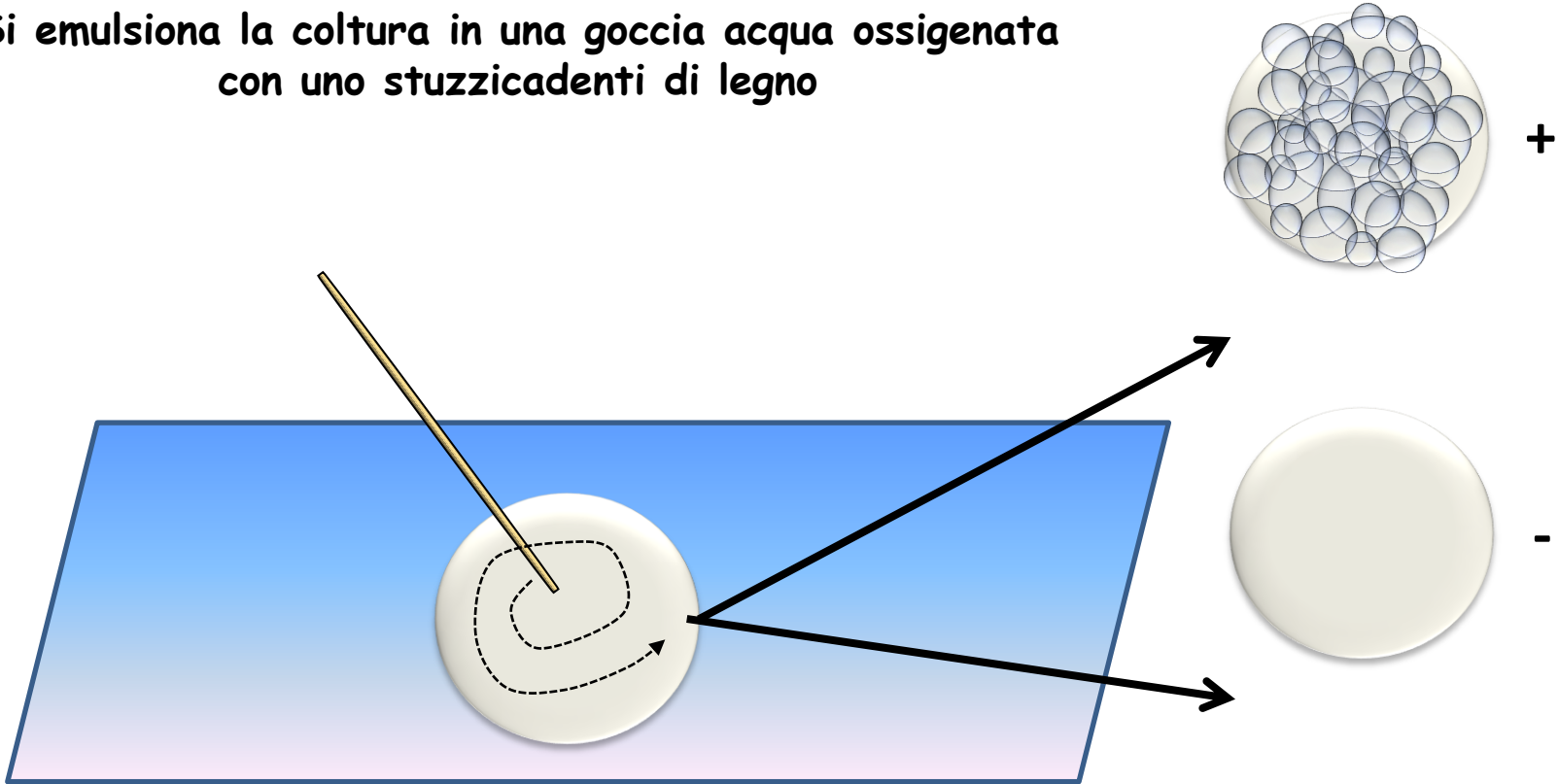
Il Citocromo C- può ossidare un
substrato artificiale (tetra o di-
metil-p-fenilendiamina)

Che assume un colore blu
(tetrametil-) o marrone (dimetil-)

Negativo: es. *E. coli*; positivo es. *Pseudomonas*

Test della CATALASI (capacità di detossicazione da H_2O_2)

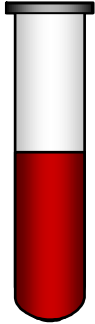
Si emulsiona la coltura in una goccia acqua ossigenata
con uno stuzzicadenti di legno



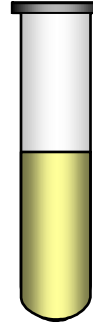
RIDUZIONE DI NITRATI A NITRITI-1

Mette in evidenza la capacità di usare NO_3 come accettori di elettroni (respirazione anaerobia)

Si aggiungono acido alpha-naftilamino-sulfanilico e N,N-dimetil-1-naftilamina, che mettono in evidenza la presenza di NITRITI



POSITIVO
I nitrati sono stati
ridotti a nitriti

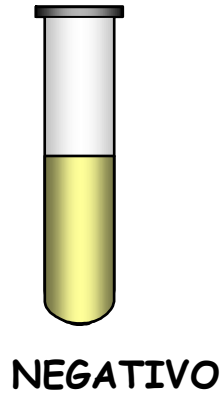


NEGATIVO: non
ci sono nitriti, i
motivi possono
essere due

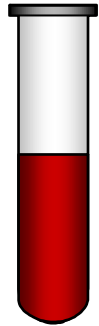
La reazione $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$
non è avvenuta (sono
ancora presenti I nitrati)

La reazione $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ è avvenuta ma è stata
seguita dalla reazione $\text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2$
(I nitrati non sono più presenti)

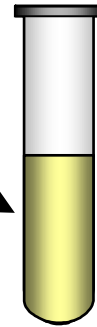
RIDUZIONE DI NITRATI A NITRITI-2



si aggiunge polvere di Zn^0 :
fortemente riducente



Non riduzione di NO_3



riduzione di $\text{NO}_3 \rightarrow \text{N}_2$

Il terreno non vira: I nitrati sono stati
convertiti a NO_2 e poi a N_2 . L'aggiunta di
 Zn non cambia l'aspetto del terreno

Il terreno vira: I nitrati erano ancora
presenti, sono stati convertiti a NO_2
dallo Zn e hanno reagito

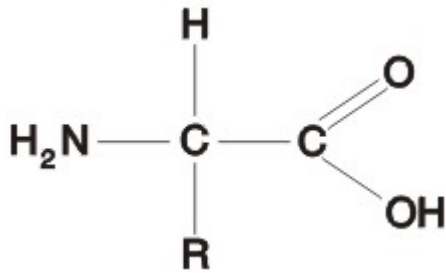
I batteri capaci di $\text{NO}_3 \rightarrow \text{N}_2$ sono
"denitrificanti" (vedi ciclo azoto)

Decarbossilazione di aminoacidi

I test di
decarbossilazione
si eseguono su

LISINA
ORNITINA
ARGININA

aminoacido



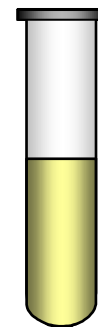
AMINA primaria



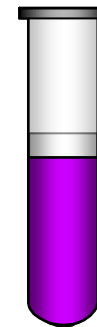
Innalzamento
del pH

L'indicatore è il "porpora di bromocresolo",
giallo chiaro in campo acido e viola in
campo alcalino

Il test va eseguito in atmosfera a ridotto
tenore di O₂: per il test liquido si
aggiunge olio minerale sterile



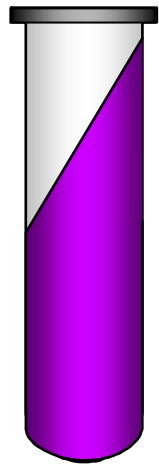
NEGATIVO



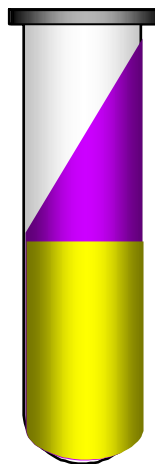
POSITIVO

IL test della Lisina decarbossilasi può anche essere eseguito su un terreno multitest solido (Lysine Iron Agar: L.I.A.)

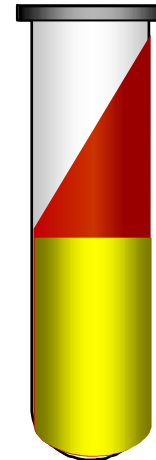
Il L.I.A. si semina come il K.I.A.



LD +



LD -



**Aminoacido
Deaminasi +
(Vedi DIAP 9)**

Su L.I.A. si può osservare anche la produzione di H₂S (vedi Diap n°16)

DEAMINAZIONE DI AMINOACIDI

Proteus

Providencia

Morganella

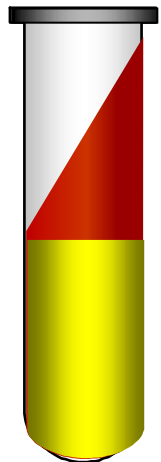
Producono aminoacido-ossidasi aspecifiche,
che deaminano tutti gli aminoacidi

Alcuni prodotti di deaminazione reagiscono
con FeCl_3 (10%) dando composti colorati

TRIPTOFANO $\longrightarrow$ A. INDOLPIRUVICO; + FeCl_3 $\longrightarrow$



FENILALANINA $\longrightarrow$ A. FENILPIRUVICO; + FeCl_3 $\longrightarrow$



Aminoacido
Deaminasi +

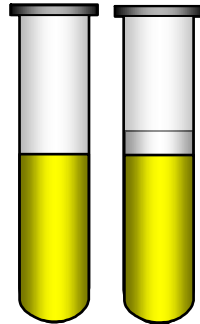
La presenza di un'aminoacido-ossidasi, su L.I.A.,
provoca una modificazione del colore dell'indicatore
nello *slant*, che passa da viola a rosso cupo

UTILIZZAZIONE DI ZUCCHERI

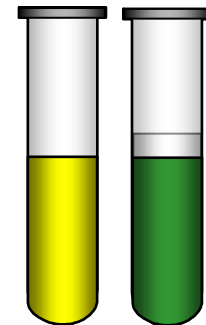
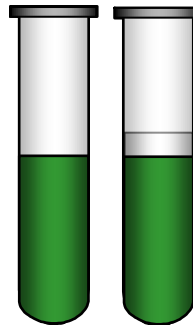
O/F TEST (ossidazione/fermentazione)

(batteri capaci di fermentare: possono
o meno essere in grado di respirare)

Fermentazione



Non attacco



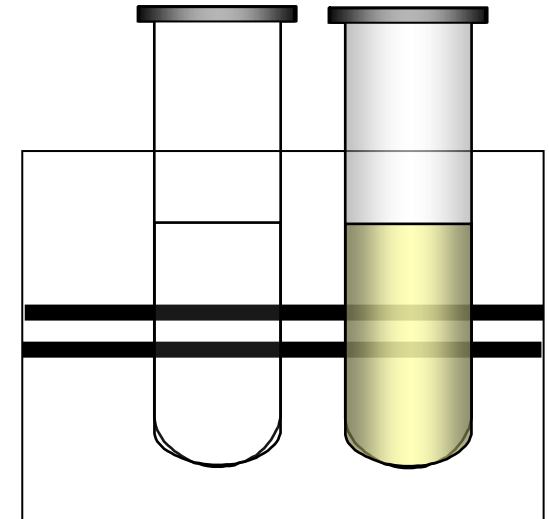
Ossidazione

(batteri con metabolismo
esclusivamente respiratorio)

Si inoculano due tubi e si aggiunge ad uno
dell'olio minerale sterile per creare
un'atmosfera di anaerobiosi.

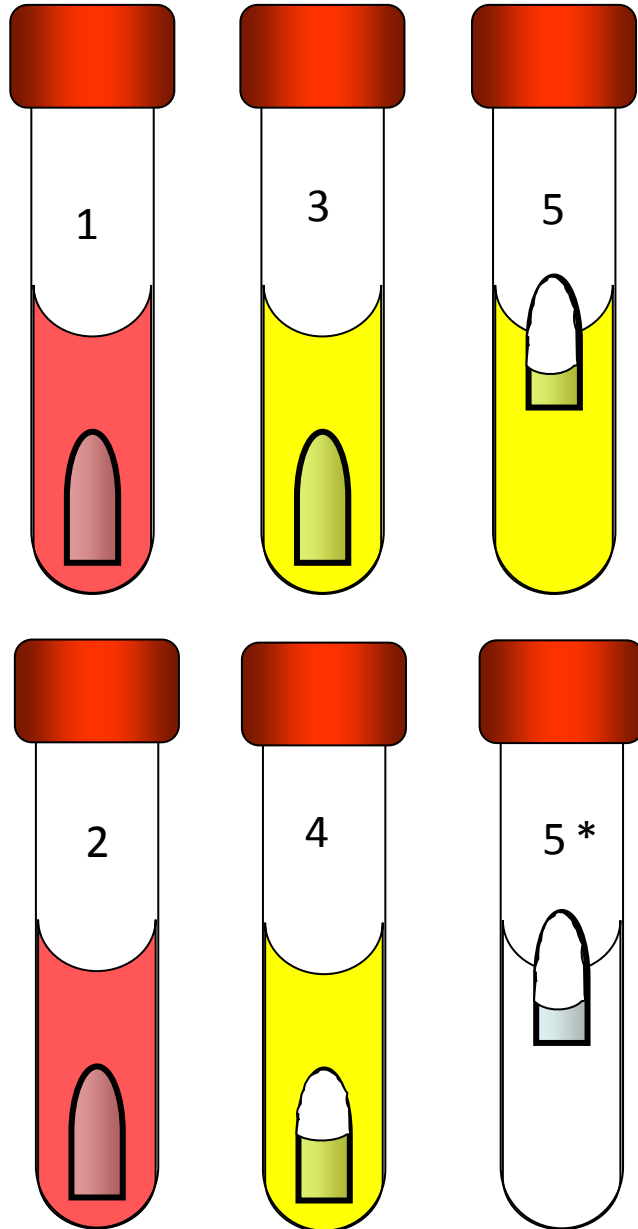
ASSIMILAZIONE

Capacità di
utilizzare una
sostanza come
fonte di carbonio



Messa in evidenza
dalla crescita

UTILIZZAZIONE DI ZUCCHERI-1



FERMENTAZIONE

Batteri che possiedono un
metabolismo fermentativo

Terreno base+ zucchero 1-0,5%+
indicatore + "campanella"

1- Controllo non
inoculato

2-Fermentazione
negativa

3-Fermentazione
positiva no gas

4-Fermentazione
positiva + gas

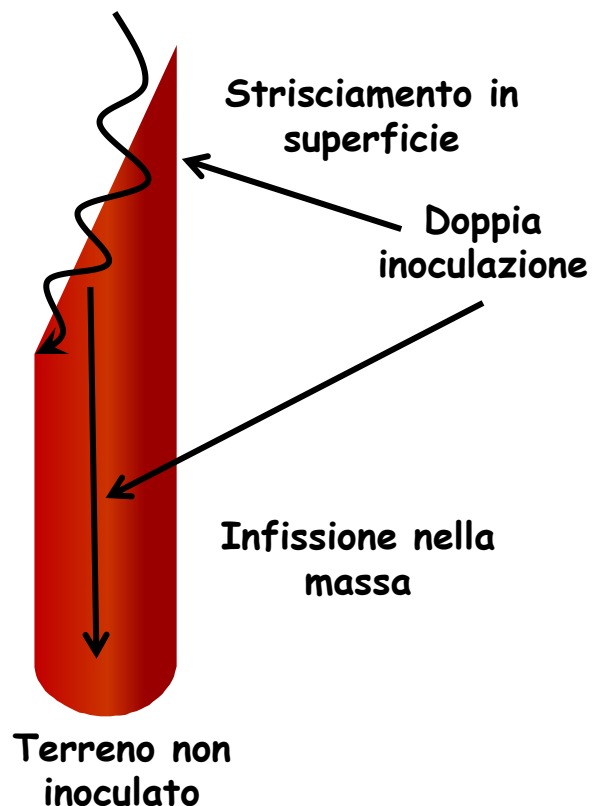
5-Fermentazione
positiva + gas (debole)

5*-Fermentazione
positiva + gas*

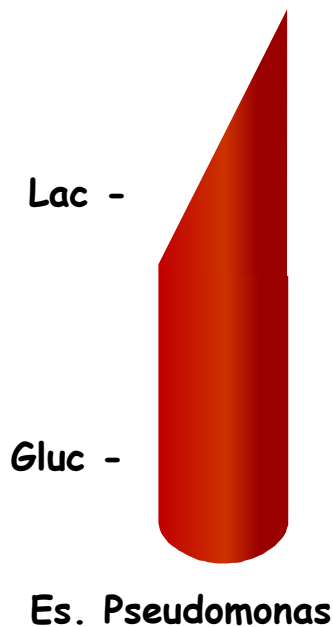
* Alcuni batteri possono ridurre l'indicatore di pH
usandolo come accettore di e- e renderlo incolore.
la presenza di gas rivela l'avvenuta fermentazione

La fermentazione di alcuni zuccheri può essere valutata anche in terreni "multitest"

Uno di questi, molto usato, è il K.I.A.
(Kligler Iron Agar)



La fermentazione del Glucosio si valuta nella zona inferiore (butt) la fermentazione del lattosio in quella superiore (slant)



Con il terreno K.I.A. è possibile rivelare anche la produzione di H_2S vedi DIAPS 13-14

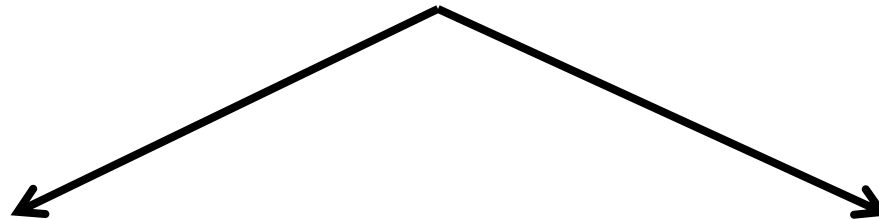
H_2S può essere prodotto
durante i processi

DESOLFORAZIONE

RIDUZIONE DI SOLFATI

Si mette in evidenza
inoculando per infissione in
terreni ricchi in sali di ferro

Questo test è spesso accoppiato ad
altri come



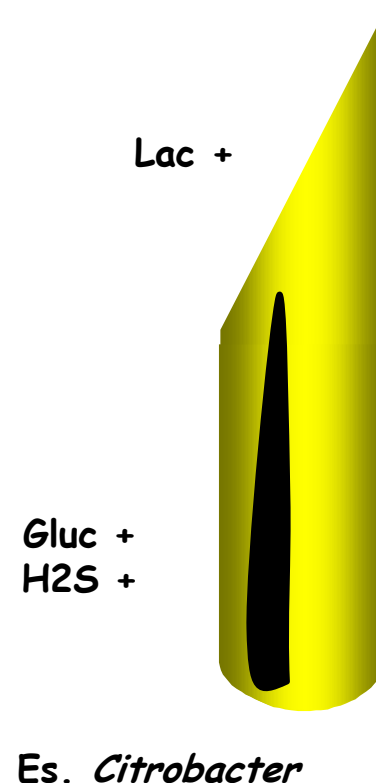
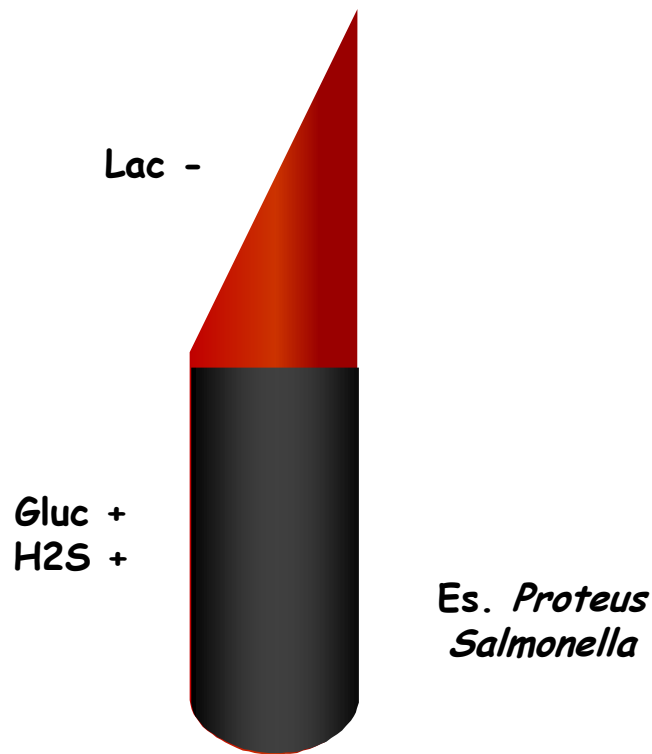
fermentazione di glucosio e lattosio
Agar "Kligler" (K.I.A. doppio zucchero + ferro)

Decarbossilazione di lisina
(Lysine Iron Agar)
Vedi DIAP 16

PRODUZIONE DI H₂S

Con il terreno K.I.A. è possibile rivelare la produzione di H₂S grazie alla presenza di sali di ferro con i quali l'H₂S forma solfuro ferrico (nero)

Il solfuro si forma nella zona inferiore, dove l'ossigeno è scarso



H_2S può essere prodotto
durante i processi

DESOLFORAZIONE

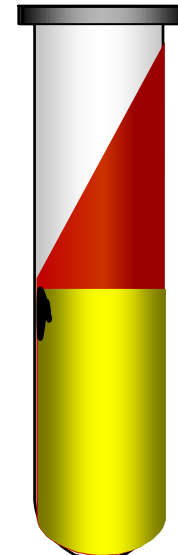
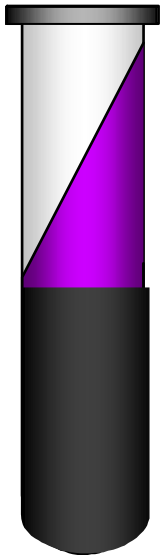
RIDUZIONE DI SOLFATI

La produzione di H_2S risente
del pH del terreno: un
eccesso di acido la inibisce

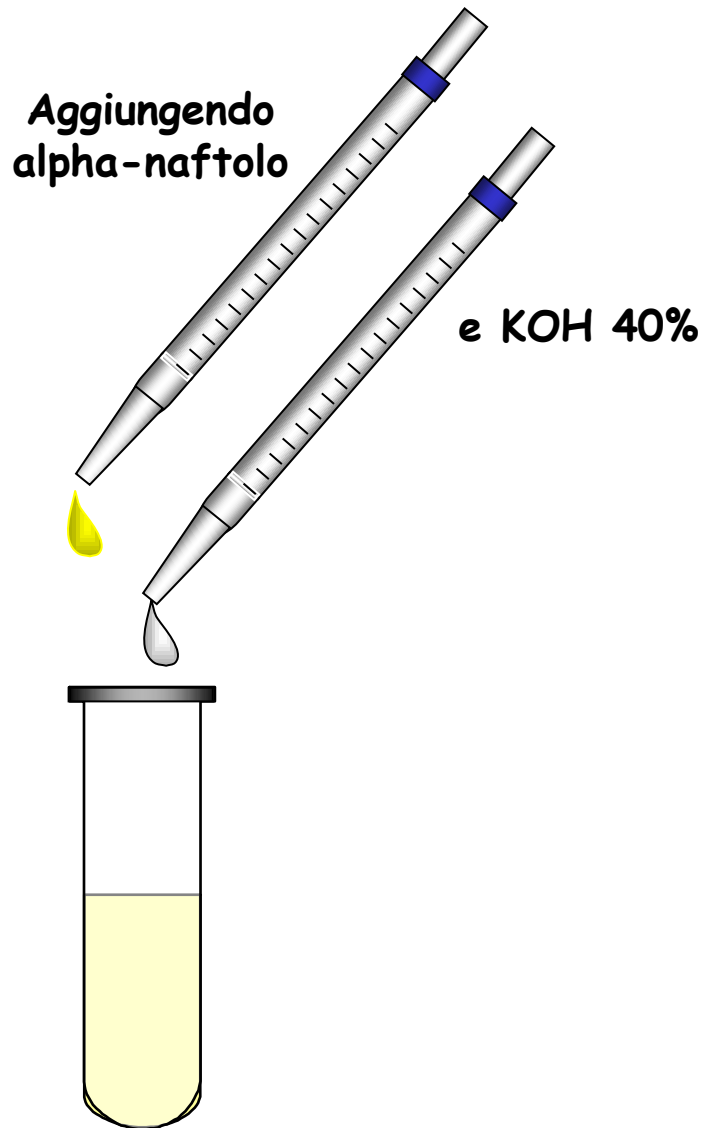
Per evitare il rischio di non
riconoscere alcuni batteri che
potrebbero dare un test negativo
quando fermentano gli zuccheri
presenti nel terreno,

sono stati allestiti terreni che accoppiano il test dell' H_2S alla
decarbossilazione della lisina, che alza il pH

Il sistema di rivelazione di questo terreno è poco sensibile e solo le specie
LD+ producono H_2S in modo abbondante,



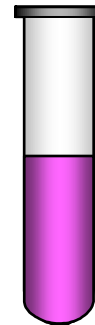
PRODOTTI FINALI DI FERMENTAZIONI (Voges-Proskauer)



Le specie con una fermentazione
BUTANEDIOLICA (es. *Klebsiella*)

producono acetil-metil-carbinolo
(prodotto intermedio)
durante la fermentazione del glucosio

Si individuano con la reazione di
Voges-Proskauer



POSITIVO
Es Klebsiella
Enterobacter



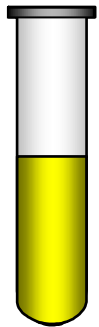
NEGATIVO
Es. Escherichia
Salmonella

PRODOTTI FINALI DI FERMENTAZIONI (RM)

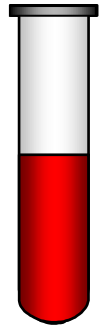
Le specie con una fermentazione
a acidi misti (es. *E. coli*,
Salmonella)

Abbassano il pH di un brodo
glucosato fino a $<4,3$

A questo pH il Rosso Metile vira



NEGATIVO
Es Klebsiella
Enterobacter



POSITIVO
Es. Escherichia
Salmonella

Il test si esegue aggiungendo 2-3-
gocce di Rosso metile a una
brodocoltura di 48 h, con lo stesso
terreno usato per il test VP

La caratteristica di questo tipo di fermentazione è che il pH resta inferiore a 4,3
anche DOPO 48 h. (altri tipi di fermentazione raggiungono gli stessi valori alle 24
h, ma poi il pH tende a risalire)

Capacità di utilizzare come fonti
di carbonio i sali degli acidi

se l'acido viene metabolizzato
il pH aumenta (oltre 8)

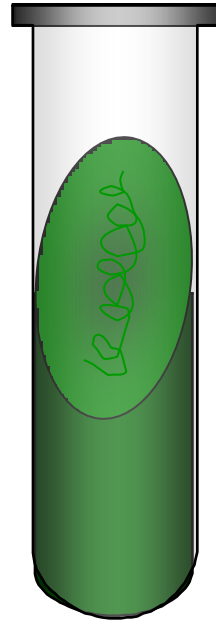
L'indicatore "blu di
bromotimolo" che è verde
a pH neutro e giallo a pH
acido, vira al blu

CITRICO

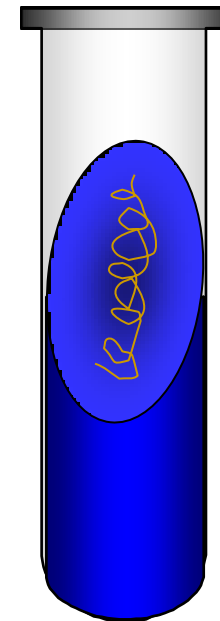
MALONICO

MUCICO

ACETICO



NEGATIVO

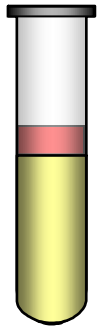


POSITIVO

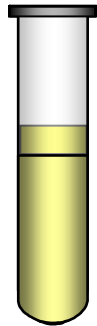
PRODUZIONE DI INDOLO

Alcuni microrganismi producono indolo a partire dal triptofano

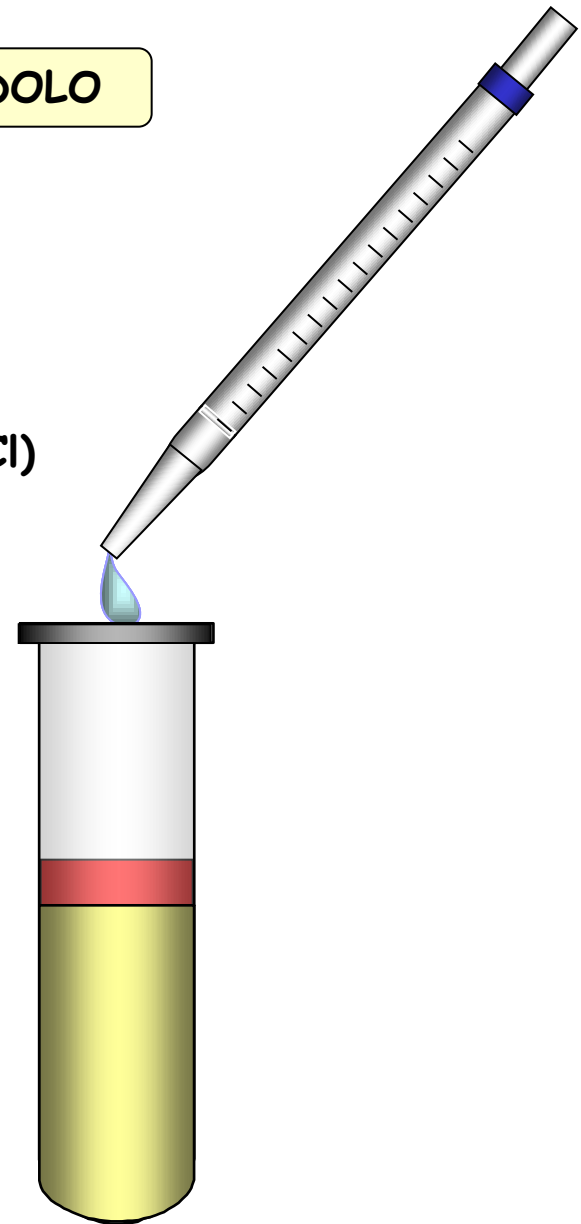
Si aggiunge il reattivo di Kovàcs
(p-dimetilaminobenzaldeide in alcol isoamilico e HCl)
a una coltura di 18-24h



POSITIVO
E. coli

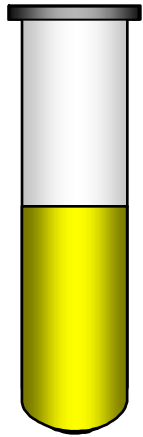


NEGATIVO
Salmonella

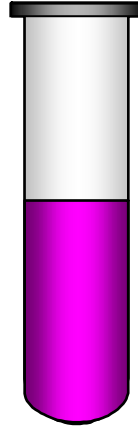


SCISSIONE DELL'UREA

L'ureasi è un esoenzima
che scinde l'urea in NH_3



NEGATIVO
Es. *Escherichia*
Salmonella
Shigella



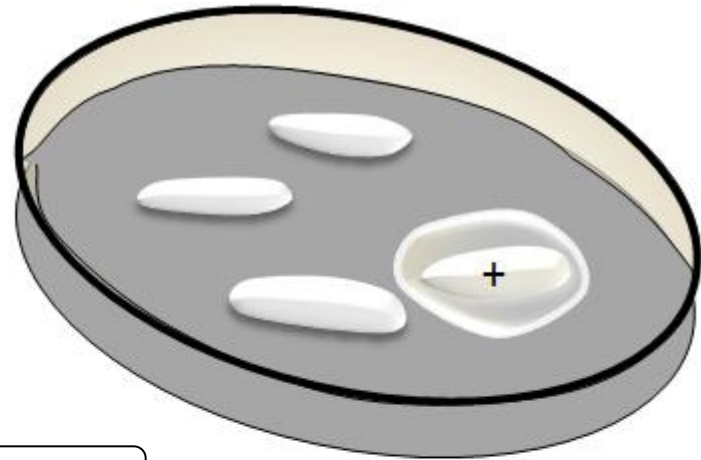
POSITIVO
Es. *Proteus* *Klebsiella*
Yersinia

Provoca un innalzamento del pH
messo in evidenza dall'indicatore
(Rosso Fenolo)

IDROLISI DI PROTEINE O POLISACCARIDI

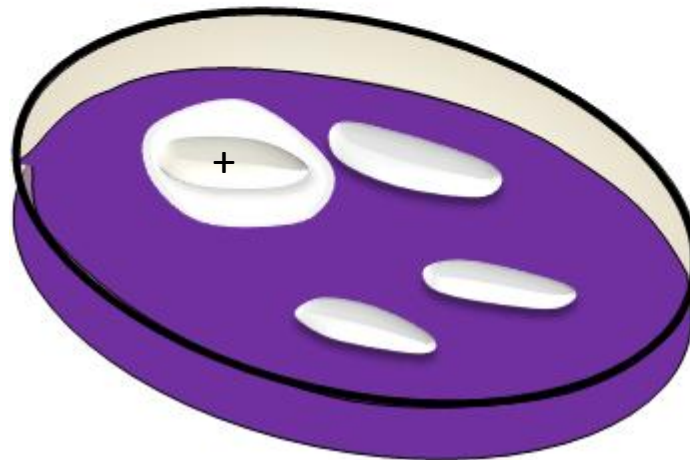
opacizzata con acido per rivelare
la zona di idrolisi

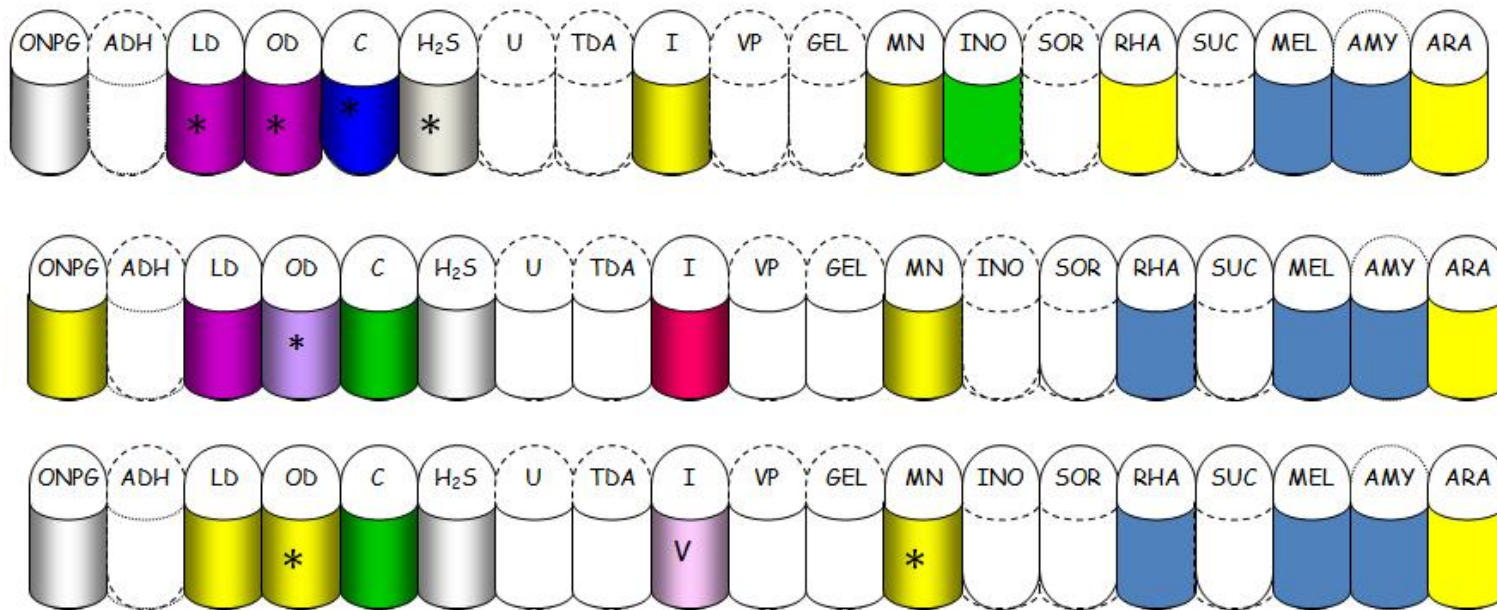
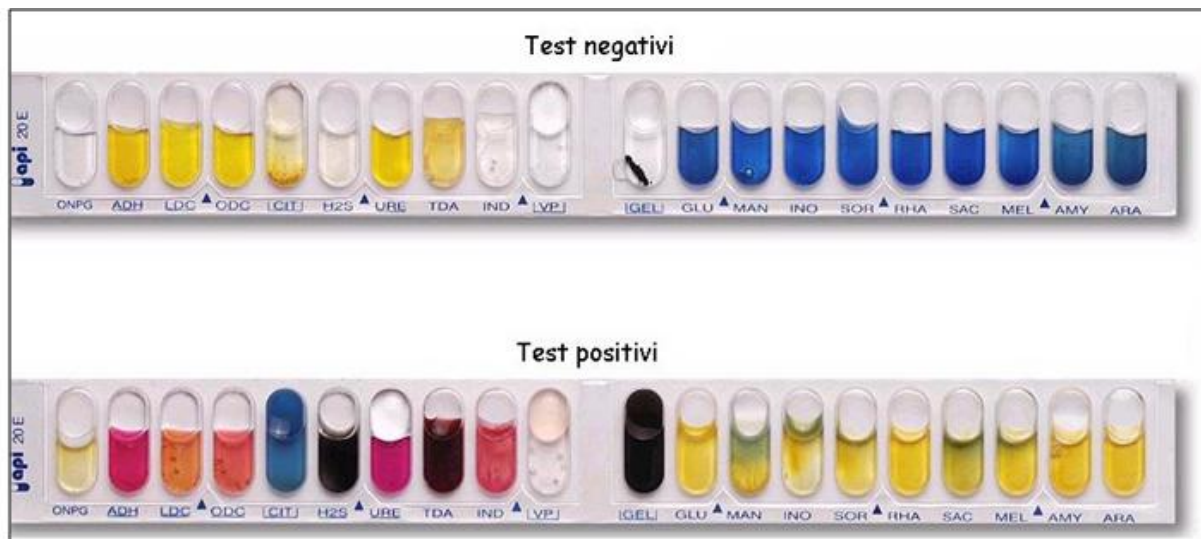
Gelatina



Amido

L'avvenuta idrolisi è rivelata
dall'aggiunta di iodio che
colora l'amido dove non è
idrolizzato





**I test possono essere usati per
l'identificazione**

**Anche in sistemi miniaturizzati a
automatizzati**

VALORE DI DISCRIMINAZIONE DI UN TEST

**I test vanno scelti in base al loro valore di
discriminazione all'interno del gruppo di interesse**

$$2(n^{\circ} \text{ positivi} * n^{\circ} \text{ negativi}) + \frac{1}{2} n^{\circ} \text{ variabili } (n^{\circ} \text{ pos} + n^{\circ} \text{ neg})$$

**Questo valore va moltiplicato per un valore arbitrario, scelto
da chi opera, che esprime la "convenienza" del test**

**Che può tener conto, per esempio, della relativa frequenza, nel
contesto considerato, delle specie che sono discriminate dal test**

Valutazione del potere di discriminazione

$$2(n^{\circ} \text{ positivi} * n^{\circ} \text{ negativi}) + \frac{1}{2} n^{\circ} \text{ variabili } (n^{\circ} \text{pos} + n^{\circ} \text{neg})$$

	Test-1	Test-2	Test-3	Test-4
OTU-a	55	99	15	27
OTU-b	10	23	45	100
OTU-c	3	87	72	95
OTU-d	99	98	33	0
OTU-e	100	0	61	97

$$1) 2 (2*1) + \frac{1}{2} (2*(2+1)) = 7$$

$$3) = 0$$

$$2) 2 (2*1) + \frac{1}{2} (2*(2+1)) = 7$$

$$4) 2 (3*1) + \frac{1}{2} (1*(3+1)) = 5$$

IDENTIFICAZIONE IN BASE ALLA PROBABILITÀ

Si calcola la probabilità che un ceppo in esame ha di appartenere a una determinata specie, in relazione al risultato di ogni singolo test (%+) o (%-)

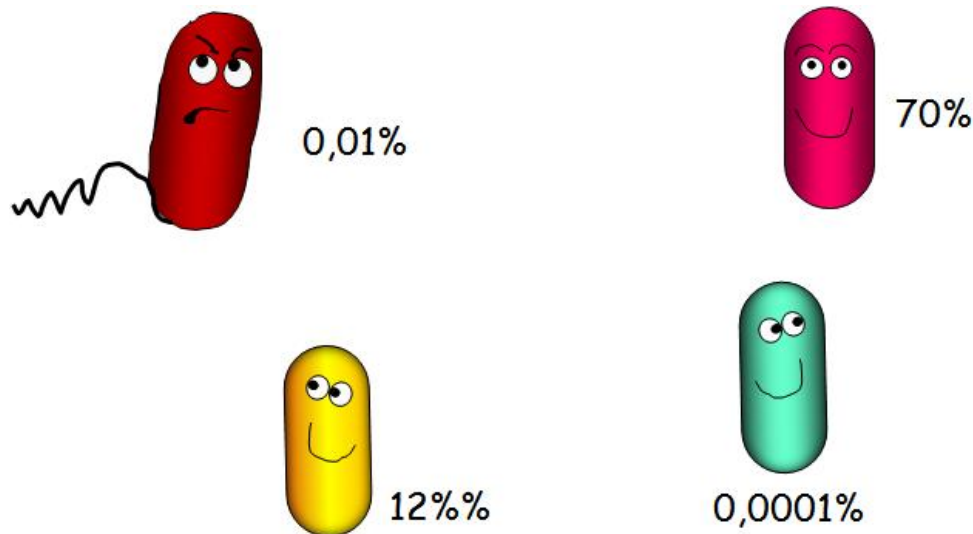
Il valore della probabilità viene corretto in modo da tener conto del possibile errore umano e di eventuali false negatività legate al ceppo in esame

Carattere+	$((x*(1-0,001)+((1-x)*0,01))$
Carattere-	$((1-x)*(1-0,01)+(x*0,01))$

	Lac(%/100)	Lac+	Lac-
<i>S. marcescens</i>	0,02	0,03	0,97
<i>E.coli</i>	0,95	0,95	0,059

IDENTIFICAZIONE IN BASE ALLA PROBABILITÀ

Le singole probabilità vengono poi moltiplicate tra loro e ogni risultato è diviso per la sommatoria dei risultati ottenuti e moltiplicato per 100, per dare la probabilità percentuale che il ceppo in esame ha di appartenere a ognuna delle specie considerate



Se la sommatoria delle probabilità è molto bassa, va presa in considerazione la possibilità che il profilo non sia giusto (errori di lettura o coltura mista) o anche che la specie a cui appartiene il ceppo in esame non sia compresa nella base dati