

Gram positivi e Gram negativi

Scoperti nel 1677 da Leeuwenhoek, i batteri sono considerati le unità più piccole, semplici e diffuse in natura. Sono microrganismi unicellulari procarioti, con caratteristiche che li rendono idonei a vivere negli ambienti più disparati e a adattarsi con facilità alle varie condizioni.

Grazie agli studi condotti da Koch nel 1876 sul bacillo dell'antrace fu possibile attribuire ai batteri un'azione patologica nei confronti dell'uomo e, proprio dai risultati che ottenne, Koch enunciò i quattro postulati che dimostrano l'origine microbica delle malattie.

I quattro postulati di Koch

Un microbo si considera responsabile di una malattia infettiva se:

1. è presente in tutti i casi riscontrati di quella malattia;
2. può essere isolato dall'ospite malato e può essere fatto crescere in una coltura pura;
3. inoculando una coltura pura del microbo in un ospite sano (ma sensibile alla malattia), la malattia si riproduce;
4. il microbo può essere isolato anche dall'ospite infettato sperimentalmente.

Negli studi microbiologici è pratica comune aumentare il contrasto con il mezzo circostante affinché si possa ottenere una migliore osservazione dei germi. Questo aumento di contrasto è ottenuto mediante la colorazione.

In batteriologia i coloranti utilizzati sono solo di tipo basico, poiché la cellula procariota è uniformemente acida. Tra le colorazioni più comuni vi è la colorazione di Gram, che deve il nome al patologo danese Christian Gram il quale la mise a punto nel 1884 permettendo così di evidenziare due tipologie di batteri e classificarli come Gram positivi e Gram negativi.

I batteri Gram positivi si colorano in violetto, mentre i Gram negativi appaiono rossi. La diversa colorazione è legata alle differenze nella composizione e nella struttura della parete batterica dei due gruppi di batteri.

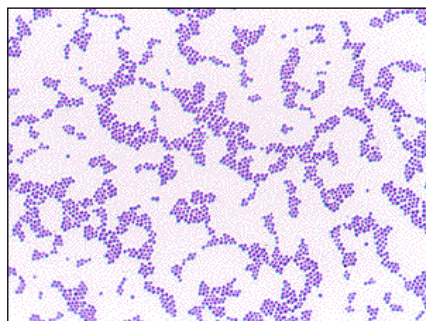
I Gram positivi trattengono il colorante basico (violetto di genziana) anche dopo decolorazione con alcol o acetone, per cui si colorano in viola, mentre i Gram negativi non trattengono tale colorante (dopo trattamento con alcol o acetone) e si colorano in rosso con un colorante di contrasto (safranina o fucsina fenicata) aggiunto successivamente (dopo la decolorazione).

Struttura della parete cellulare

Quasi tutti i batteri hanno una parete rigida, permeabile, di spessore variabile (10-80 μm) che circonda e racchiude completamente il batterio, conferendogli proprietà quali forma, protezione dalla lisi per osmosi, sensibilità agli agenti chimici e fisici, capacità tintoriale, carattere antigenico e sensibilità ai batteriofagi.

Nei Gram positivi, la principale componente della parete è il **peptidoglicano**, un polisaccaride complesso, che forma uno spesso strato (di 20-80 nm) all'esterno della membrana cellulare. La parete batterica dei Gram positivi è molto polare e si oppone al passaggio di sostanze che la potrebbero danneggiare.

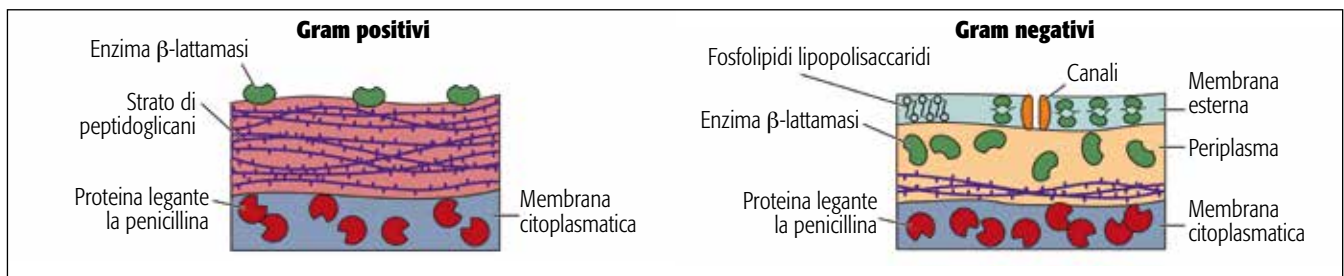
Nei Gram negativi, invece, la parete cellulare è formata da due strati: uno strato sottile di **peptidoglicano**, molto ridotto rispetto ai Gram positivi, e una **membrana esterna** composta da lipopolisaccaridi (LPS), ovvero grosse molecole le cui componenti sono, come suggerisce il nome, fosfolipidi e polisaccaridi, oltre a una componente proteica. La membrana esterna della parete dei Gram negativi è parzialmente permeabile a piccole molecole grazie alla presenza di proteine che assolvono la funzione di canali in grado di lasciare entrare e uscire sostanze idrofile.



Staphylococcus epidermidis



Escherichia coli



Differenze nella costituzione della parete cellulare dei Gram positivi e dei Gram negativi.

Le fasi della colorazione di Gram

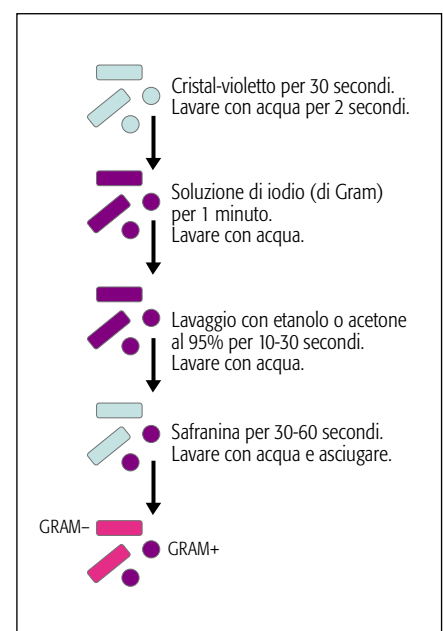
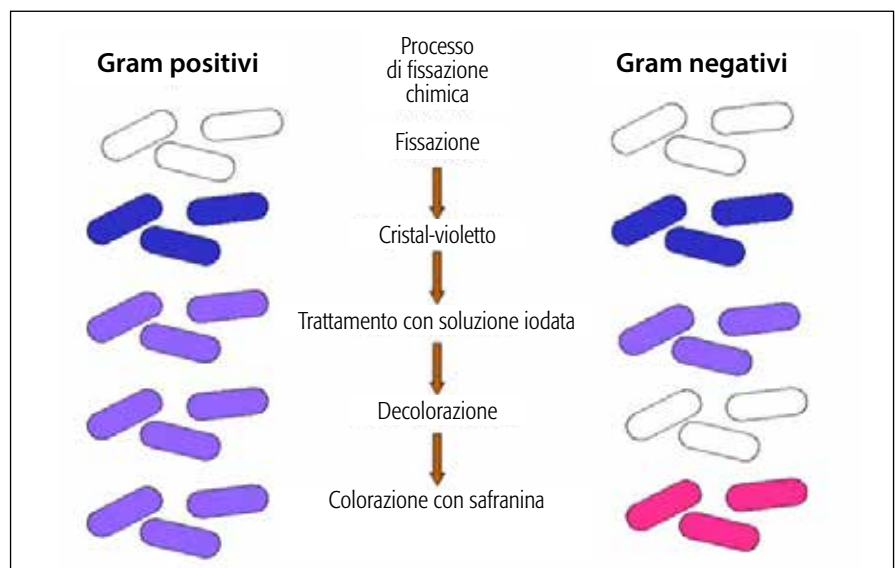
La colorazione di Gram viene eseguita in tempi successivi e produce una colorazione blu/violetta nei Gram positivi, mentre i Gram negativi, dopo decolorazione, appaiono rossi. Questo avviene perché i Gram positivi, grazie alla loro spessa parete cellulare, riescono a trattenere il colorante blu/violetto evitando che, durante la fase di decolorazione, il complesso che il colorante forma con la parete venga dissociato. I Gram negativi, invece, si decolorano e assumono il colore rosso del secondo colorante aggiunto. Possiamo distinguere le seguenti fasi:

Fase 1 – FISSAZIONE: striscio di cellule fissato al calore.
Fase 2 – CRISTAL-VIOLETTO: ricoprire per 2-3 minuti lo striscio con il cristal-violetto, in modo che le cellule si colorino di viola.
Fase 3 – TRATTAMENTO CON SOLUZIONE IODATA (1 minuto): le cellule resteranno viola.
Fase 4 – DECOLORAZIONE: decolorare per 1-2 minuti in alcol. Le cellule Gram positive saranno viola, quelle Gram negative risulteranno invece incolori.

Fase 5 – COLORAZIONE CON FUCSINA O SAFRANINA: le cellule Gram negative assumeranno una colorazione la cui tonalità andranno dal rosa al rosso.

L'osservazione della morfologia (quasi tutti i cocci sono Gram positivi mentre i bacilli, con alcune eccezioni, sono negativi), abbinata alla colorazione che i batteri assumono, costituisce il primo livello di classificazione dei procarioti.

Componente o struttura	Gram positivi	Gram negativi
Spessore	18-80 nm	8-10 nm
Membrana esterna	assente	presente
Peptidoglicano	30-70% del peso della parete	20% del peso della parete
Acidi teicoici	presenti	assenti
Proteine	rare	presenti
Lipidi	presenti in poche specie	presenti
Lipopolisaccaridi	assenti	presenti
Lipoproteine	assenti	presenti



Le fasi della colorazione di Gram.