

7. 그람 염색(Gram staining)

1. 배경

1차 염료로 모든 세균을 보라색으로 염색시키는 크리스탈 바이올렛이 사용된다, 요오드는 크리스탈 바이올렛과 펩티도글리칸 사이의 작용을 증가시켜 염색을 촉진시키는 매염제 역할을 한다. 불용성인 크리스탈 바이올렛-요오드 복합체는 그람 음성균의 경우 알코올에 의해 탈색이 되지만 양성균은 탁색되지 않고 보라색을 유지한다.

그람 양성균의 경우 알코올에 의해 두꺼운 펩티도글리칸 층에서 물이 빠져나가 수축되면서 크리스탈 바이올렛-요오드 복합체가 빠져나갈 수 있는 세포벽의 구멍이 차단되어 보라색을 유지하게 된다. 반면에 그람 음성균은 양성균에 비해 펩티도글리칸 층이 얇고 세포벽에 있는 구멍이 크기 때문에 알코올이 외막의 지질 부위를 용해시키고 침투해 염료 복합체를 쉽게 제거하여 탈색이 된다. 대조염료인 사프라닌은 탈색된 그람 음성균을 2차로 염색시키는 작용을 하며, 사프라닌에 의해 음성균은 붉은색을 띠게 된다.

본 실험에서는 염색과정에 따른 그람 양성균 및 음성균의 색변화를 관찰 한 후 그람 양성 세균 및 음성 세균을 판정한다.

3. 준비물

- 미생물 순수 배양액(2종)
- 광학 현미경
- 슬라이드 글라스
- 백금이
- 알코올램프
- Crystal violet 용액
- Gram's iodine 용액
- Safranin O 용액
- 95% Ethanol

4. 방법

(1) 세균 시료의 도말

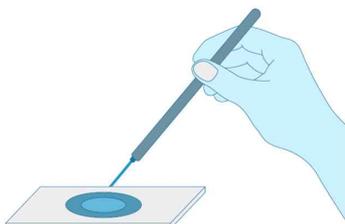
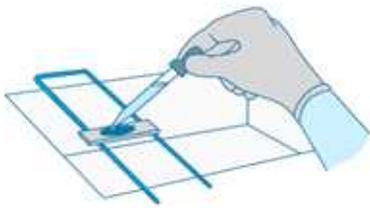


그림 10-6-2 시료의 도말

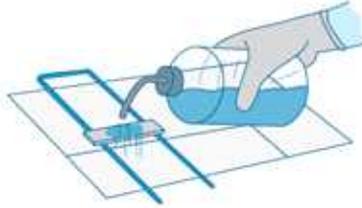
- ① 멸균된 백금을 이용하여 배양액으로부터 시료를 취한다.
- ② 백금에 묻은 시료를 슬라이드 글라스 위에 넓게 퍼바른다.
- ③ 시료가 도말된 슬라이드 글라스를 알코올램프에 빠르게 2~3회 통과시켜 균을 건조시켜 시료를 고정시킨다.

(2) 염색

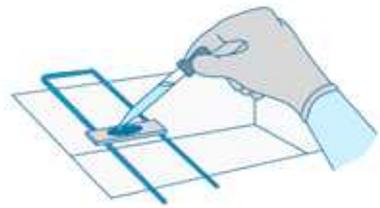
- ① 건조된 도말 시료에 crystal violet 용액을 1~2방울 가하여 1분간 염색한다.
- ② 세척병의 물 또는 흐르는 물로 약 2초 동안 조심스럽게 염색시약을 씻어내고 물기를 최대한 제거한다.
- ③ Gram's iodine 용액을 1~2방울 가하여 1분 동안 매염한다.
- ④ 물로 세척하고 물기를 제거한다.
- ⑤ 95% 에탄올을 1~2방울 가하여 약 30초간 탈색시킨다.
- ⑥ 물로 세척하고 물기를 제거한다.
- ⑦ Safranin O 용액을 1~2방울 가하여 1분간 대조염색한다.
- ⑧ 물로 세척하고 물기를 제거한다.
- ⑨ 흡수 종이 또는 티슈로 부드럽게 슬라이드 글라스 위의 수분을 흡수하여 제거하고 실온에서 건조시킨다.
- ⑩ 광학 현미경의 저배율부터 시작하여 균을 관찰하고 그린다.



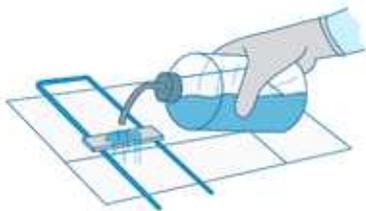
① 크리스탈 바이올렛, 1분



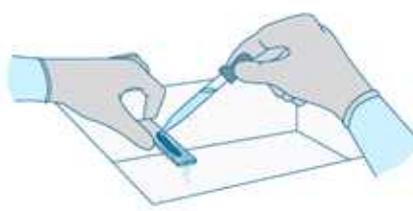
② 물로 세척



③ 그람 요오드, 1분



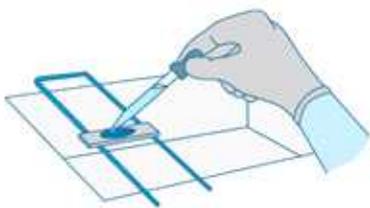
④ 물로 세척



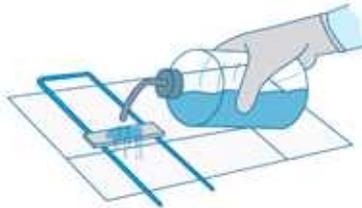
⑤ 95% 에탄올, 30초



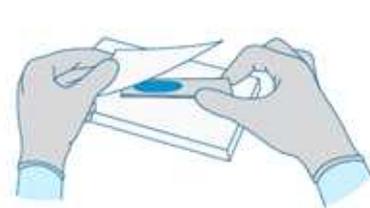
⑥ 물로 세척



⑦ 사프란인, 1분



⑧ 물로 세척



⑨ 수분 제거 및 건조

그림 10-6-4 Gram염색 과정

5. 결과 및 고찰

=> 그람 양성 및 음성균의 차이점 및 실험한 미생물의 그람 양성 및 음성 판정

표 10-4 Gram염색 과정에 따른 양성균과 음성균의 색 변화

염색과정	gram양성균	gram음성균
크리스탈 바이올렛(1차 염색약)	보라색	보라색
gram 요오드(매염제)	보라색	보라색
95% 에탄올(탈색제)	보라색	무색
사프라닌(대조 염색약)	보라색	붉은색