| 실험 제목 | 실험교사 서명 |
|---|---|
| 그람 염색법(Gram staining)을 통한 세균의 관찰 | |

| 학교 | 학년 | 반 | 번호 | 이름 |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |

## 1. 실험 목표

원핵세포의 세포벽 구조를 이해하고 그람 염색법을 이용한 그람양성균과 그람음성균을 구분할 수 있다.

## 2. 배경 이론

세균을 구분하기 위한 염색은 기본 3단계로 이루어지는데 먼저 1차 염색시약으로 균체를 염색하고 탈색시킨다. 이 때 세포구조물의 성질 차이에 의해 1차 염색약이 제거되기도 하고 염색시약이 제거되지 않고 그대로 남아있기도 한다. 그리고 1차 염색시약과 대비되는 색상의 2차 염색시약으로 염색시킨다. 1차 염색 후 탈색된 균체는 2차 염색시약에 의해 염색되지만 탈색되지 않은 균체는 2차 염색시약을 흡수하지 못하고 그대로 1차 염색시약의 색깔을 유지하게 된다. 이러한 분별 염색이 여러 세균을 관찰하기 위해 많이 개발되었다. 그 중 덴마크의 외과의사 그람 (Christian Gram)이 1884년에 개발한 그람 염색법 (Gram staining)이 세균학에서 가장 널리 사용되고 있다. 그람 염색은 염색된 결과에 따라 세균을 그람양성균과 그람음성균으로 나뉘어지는데 이는 세균 세포벽의 성분 조성에 따른 차이이다. 먼저 세균의 세포벽에 대하여 알아보자.

### 1) 원핵세포의 세포벽

세포벽은 세포막의 바깥쪽에 있는 비교적 단단한 껍질이다. 이 세포벽이 있어 세포의 모양을 유지하는 동시에 삼투압으로 인해 세포가 파괴되지 않도록 보호한다. 세포벽의 형태와 단단한 정도는 주로 펩티도글리칸 (Peptidoglycan)에 달려있다.

#### (1) 펩티도글리칸의 구조

펩티도글리칸은 동일한 소단위가 여러 번 반복되어 있는 엄청나게 큰 중합체이다. 이 중합체는 두 종류의 당분자인 N-아세틸글루코사민 (N-acetylglucosamine)과 N-아세틸뮤

람산 (N-acetylmuramic acid) 등 여러 종류의 아미노산으로 이루어진다. 펩티도글리칸 소단위가 이루는 사슬은 펩티드 사이의 교차결합으로 연결된다. 대부분의 그람음성균의 세포벽에는 펩티드 연결다리가 없다. 이렇게 교차결합이 이루어지면 펩티도글리칸은 촘촘하게 서로 연결된 망상구조로 이루어진 거대한 주머니 모양이 된다. (그림 1)

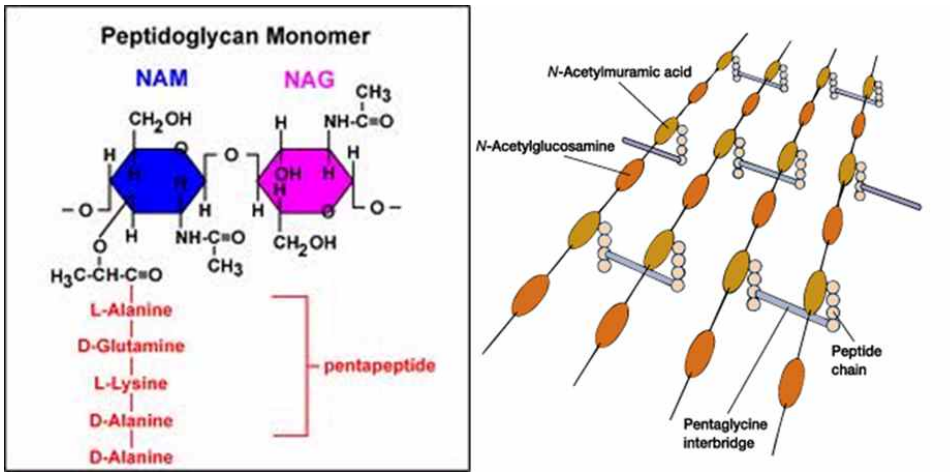
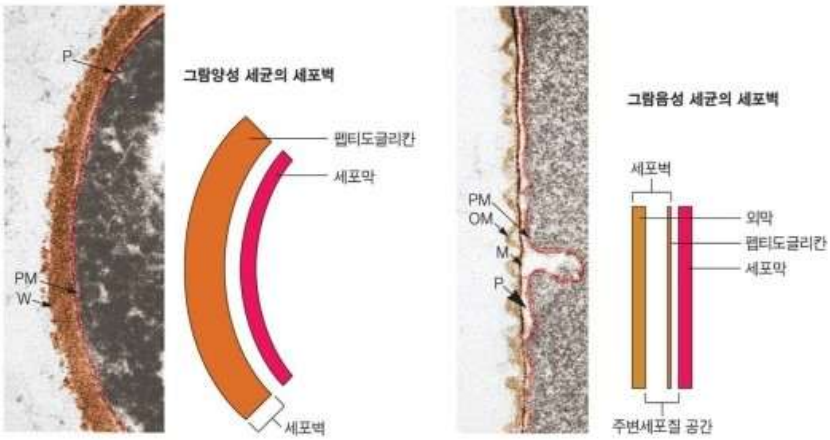



**그림 1 펩티도글리칸 소단위의 구성과 구조**




PM:세포막, OM:외막, M:펩티도글라이칸, P:주변세포질

**그림 2 그람양성균과 그람음성균의 세포벽**

### (2) 그람양성균의 세포벽

그람양성균의 세포벽은 보통 두껍고 균일하며 주로 펩티드 연결다리를 이용하여 펩티도글리칸 구조를 연결한다. 그람양성균의 세포벽에는 많은 양의 테이코산 (Teichoic acid)이 포함되어 있다. 테이코산은 펩티도글리칸의 표면으로 돌출되어 있고 이 분자가 음으로 하전되어 있으므로 그람양성균의 세포벽은 음전하를 띠게 된다. 테이코산의 기능은

아직 잘 알려져 있지 않았으나 세포벽의 구조를 유지하는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 그람음성균에는 테이코산이 존재하지 않는다. 대표적인 그람양성균으로는 포도상구균, 연쇄상구균, 폐렴균, 나병균, 디프테리아균, 파상풍균, 탄저균, 방선균 등이 있다.

### (3) 그람음성균의 세포벽

그림 2을 보면 그람음성균은 세포 바깥층의 구조가 그람양성균에 비해 훨씬 더 복잡한 것을 알 수 있다. 세포막 다음 층을 이루는 펩티도글리칸 층은 아주 얇아서 전체 바깥층 무게의 5~10%에 지나지 않는다. 대표적인 그람음성균으로는 살모넬라균, 이질균, 티푸스균, 대장균, 콜레라균, 페스트균, 임균, 수막염균, 스피로헤타 등이 있다.

## 2) 시료의 처리와 염색

미생물학은 일반적으로 너무 작아서 육안으로는 잘 보이지 않는 생물체를 연구하는 학문이다. 따라서 미생물학 연구에는 반드시 현미경을 사용한다. 그러므로 현미경의 작동원리와 현미경 시료를 준비할 줄 아는 것은 매우 중요하다. 일반적으로 쉽게 사용 가능한 광학현미경으로 살아 있는 미생물을 직접 관찰할 수도 있다. 그러나 시료를 고정시킨 다음 염색하면 관찰이 더 쉽고 형태적인 특징을 잘 살릴 수 있으며 장기보관이 가능하다.

### (1) 고정 (Fixation)

염색하여 현미경으로 관찰하는 세포는 살아있는 세포와 가능한 비슷해야 한다. 고정(Fixation)이란 세포나 미생물을 내부 및 외부 구조가 보존된 채로 슬라이드에 부착시키는 과정이다. 시료를 고정하면 세포의 형태를 파괴하는 효소가 비활성화 되고 세포구조가 단단해져 염색과 관찰과정에서 변형되지 않는다. 고정하는 동안 미생물은 모두 죽은 채로 슬라이드에 단단하게 부착된다. 열처리는 기본적이고 고전적인 방법으로 많이 사용된다.

### (2) 그람 염색법 (Gram Staining)

**제 1단계: 염색**

염기성 염료인 crystal violet으로 염색 (1분간)

**제 2단계: 착색**

염색된 세균에 iodine 용액을 처리하면 crystal violet과 iodine이 반응하여 불용성 복합체(CV-I)를 형성 (1분간)

**제 3단계: 탈색**

착색된 세균에 탈색제인 알코올 또는 아세톤을 처리하면 불용성 복합체 용해 (15초)

그람양성균은 크리스탈 바이올렛이 결합한 채로 남아 있어 보라색을 유지하나 그람음성균은 탈색되어 무색이 된다.

**제 4단계: 대조염색**

분홍색의 염기성 염료인 safranin-o으로 염색하면 백색으로 탈색되었던 그람음성균은 분홍색으로 염색 (40초)

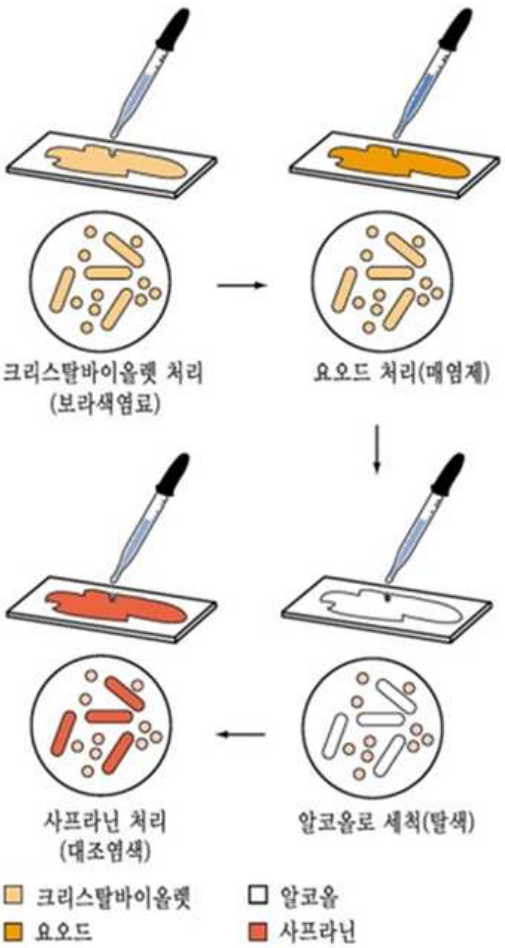



**그림 3 그람 염색 과정**

**(3) 그람 염색법의 원리**

그람양성균과 그람음성균은 기본적으로 세포벽의 물리적인 특성이 서로 다르다. 그람양성균에서 세포벽을 제거하면 그람음성균처럼 염색된다. 펩티도글리칸 자체가 염색되는 것은 아니고 그람양성균의 두꺼운 펩티도글리칸 층이 크리스탈 바이올렛이 제거되는 것을 막는 것으로 생각된다. 그람 염색을 할 때 먼저 크리스탈 바이올렛으로 세균을 염색한 다음 요오드를 처리하여 염료가 잘 부착되어 있도록 한다. 그 다음 에탄올로 탈색하면 그람양성균에서는 알코올이 두꺼운 펩티도글라이칸을  탈수시키면서 분자간 공간을

좁히게 되어 크리스탈바이올렛과 요오드의 불용성 복합체가 빠져나가지 못하게 막아버리는 것으로 생각된다. 그러므로 요오드와 결합한 염료가 짧은 탈색과정에서 빠져나가지 못하고 보라색을 유지하는 것이다. 반면, 그람음성균 세포벽의 인지질 세포막이 알코올에 쉽게 용해되고 펩티도글라이칸 층도 얇아서 크리스탈바이올렛과 요오드의 불용성 복합체가 빠져나갈 수 있다.

## 3. 실험 재료 및 기구

그람양성균, 그람음성균, 광학현미경, 슬라이드글라스, 커버글라스, 여과지,
백금이(loop), 알코올램프, 라이터
크리스탈 바이올렛, 그람요오드, 95% 에탄올, 사프라닌용액
세척병, 장갑, 폐수통

## 6. 실험 방법

① 시약을 제조한다.

- 염색시약 (크리스탈 바이올렛 용액) : a액과 b액을 혼합하여 사용
  a액 - Crystal violet 2g / 20ml EtOH
  b액 - Ammonium ocalate 0.8g / 80ml $H_2O$
- 착색시약 (그람요오드 용액):
  Potassium iodine 2g과 iodine 1g을 10ml $H_2O$에 순차적으로 녹인 후에 300mL이 되도록 $H_2O$로 채움 (갈색병에 보관)
- 탈색시약 : 95% ethanol 또는 ethanol:acetone을 1:1로 혼합한 용액
- 대조염색시약(사프라닌 용액): 2.5% safranin ethanol 용액 5ml을 495ml $H_2O$와 혼합

② 바닥에 여과지를 깔고 슬라이드 글라스 2개를 올려 놓은 뒤 시료를 구분할 수 있도록 유성펜으로 A와 B를 라벨한다.

③ 백금이를 붉은색으로 뜨거워질 때까지 가열하여 멸균하고 공기중에서 5~10초간 식힌 뒤 백금이를 시료A 튜브에 넣어 백금이의 끝에 묻힌다.

④ 시료 A가 묻은 백금이를 슬라이드 글라스에 도말한다.

⑤ 슬라이드의 끝 부분을 잡고 알콜램프 불꽃 위를 왔다 갔다 스쳐지나가며 완전히 건

조시킨다.

⑥ ③~⑤의 과정을 시료 B에 대해서도 동일하게 실시한다.

⑦ 시료 A, B가 전부 염색될 수 있도록 **크리스탈 바이올렛 용액**을 슬라이드 글라스에 충분히 뿌려주고 **1분** 동안 염색시킨다. (염색)

⑧ 분비된 비이커(폐수통)에 슬라이드를 기울여서 크리스탈 바이올렛 용액을 버리고 세척병의 증류수를 뿌려 염색약을 씻어준다.

**주의: 이 때 물줄기가 고정된 세균을 향하지 않게 하고, 물이 위에서 아래로 흘러내리면서 씻기도록 해준다. (세척과정)**

⑨ ⑦~⑧의 과정과 같이 그람 요오드 용액(착색시약)을 슬라이드 글라스에 충분히 뿌려주고 1분 동안 처리한 뒤 세척해 준다. (착색)

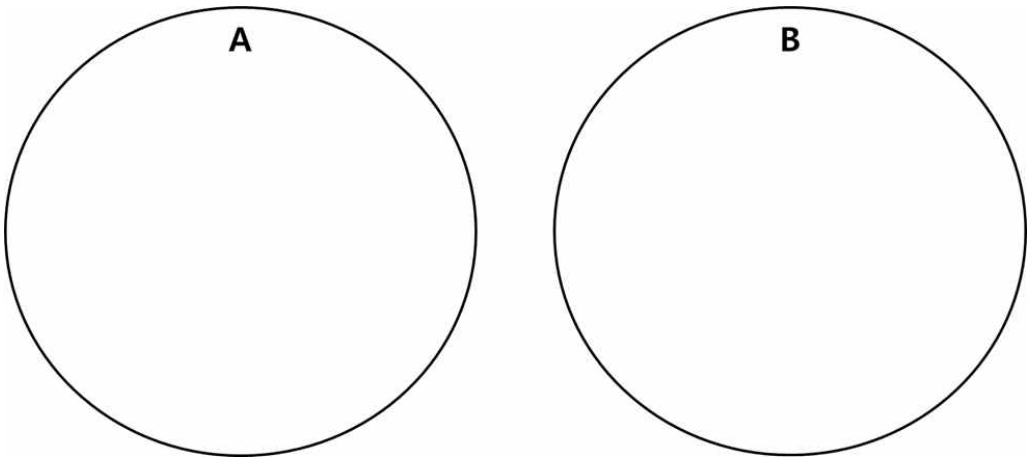
⑩ 95% 에탄올(탈색시약)으로 15초간 탈색 (색소가 녹아 나오지 않고 도말면의 보라색이 보이지 않을 때까지)한 뒤 세척해 준다. (탈색)

⑪ 사프라닌 용액(대조염색시약)에 40초간 처리한 뒤 세척한다. (대조염색)

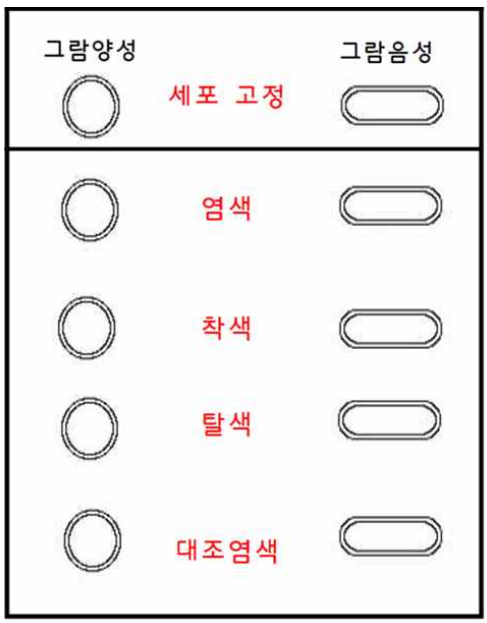
⑫ 기포가 생기지 않도록 커버글라스로 덮은 뒤 현미경으로 관찰한다.

## 7. 실험 결과 및 고찰

1) 현미경으로 관찰되는 세균의 색과 모양을 그려보고 그람양성균과 그람음성균으로 분류해 보자.




2) **염색 → 착색 → 탈색 → 대조염색**의 상태일 때의 그람양성균과 그람음성균에서 세포의 색이 어떻게 변할지 예상해 보자.




**고찰이란?**

실험을 통하여 결과를 얻었을 때, 실험 과정과 결과에 대해 생각하고 연구하는 것을 의미한다. 실험 결과가 좋던 나쁘던 관계없이 실험 과정에서 발생할 수 있는 오류에 대해 생각하여 기재하고, 실험 결과에 대해 전체적인 정리를 하고, 더 나아가 실험과정과 결과를 이용하여 더 깊이 연구할 수 있는 실험에 대해 생각하고, 어떤 분야에 응용할 수 있는지에 대해 생각해보도록 하자.

## 8. 토론

1) 앞으로는 미생물의 다양성에 대한 연구가 더욱 활발하게 진행될 것이다. 실제로 지구상에 존재하는 미생물 중에서 1% 정도만 배양 가능한 것으로 추정하고 있다. 많은 종류의 미생물 중에서 우리는 그람 염색법으로 그람양성균과 그람음성균으로 미생물을 분류해 보았다.

그렇다면, 새로운 미생물 분리기술은 물론 배양할 수 없는 미생물까지 분류할 수 있는 새로운 미생물 분류기법에는 무엇이 있을지 토론해 보자.

## 9. 실험 후 느낀점 및 배운점