

DU-도전학기 결과보고서

성 명		학 번	
단과대학		학과(전공)	
도전학기 과제명	<p>[국문] 토양 내 초산균의 분리와 검증</p> <p>[영문] Independent Research: Isolation and verification of <i>Acetobacter</i> from soil</p>		
지도교수 의견	<p>짧은 기간 안에 해결하기 어려운 과제였음에도 성실히 수행하여 기존 연구의 조사와 실험 진행까지 마쳤다. 학부생답지 않게 적절한 정보만을 취사선택하여 활용할 줄 알았고, 학기 중에 미생물학 과목을 수강하지 않은 학생임에도 스스로 기술과 방법을 체득하여 큰 문제없이 실험을 수행했으며, 학부과정 외의 지식인 생물정보학의 기초도 이해했다. 연구노트 작성을 권하니 독학하여 일반 공책에 필요한 양식을 갖추고 간이 실험노트를 만들기도 했다. 학생의 열정은 칭찬받아 마땅하고 응용력과 이해 능력은 높이 평가할 만하다.</p>		

1. 도전 과제의 목표

생태와 조성이 확인되지 않은 흙으로부터 시료를 채집한 후 특정한 미생물을 선별한다. 이 과정에서 과제를 해결하기 위한 자료와 방법을 스스로 탐색하고 생물학 데이터를 활용하는 훈련을 할 것이다. 이를 통해 선행 연구 조사에 익숙해지고 생물학 데이터베이스에 접근하며 자료를 분석하는 생물정보학을 이해할 수 있을 것으로 기대했다. 또한, 과제를 해결하기 위해 적절한 실험을 설계하며 학부과정에서 접하기 힘든 연구 방법론을 체험할 수 있을 것으로 예상했다. 본 도전은 반응의 산물로 초산을 생성하는 원생생물(초산균; *Acetobacter*)을 표적으로 선별배지를 만들고 이를 획득하는 실험의 설계와 진행 과정 전체를 과제로 삼았다.

2. 도전 과제 내용

1) 선행 연구 조사

초산균은 산소와 에탄올을 이용하여 아세트산을 합성하는 호기성 그람 음성 세균으로, 초산균의 검증에는 주로 16s rRNA 분석 방법이 이용된다(Raspor). 초산균은 구형, 막대형, 나선형의 모양을 갖는다(Walker). 초산균 배양에 적합한 온도는 28~30° C로 알려져 있다(Ndoye, Saeki). 초산균의 선별과 배양에는 주로 GYC배지와 GYP배지를 사용한다. Glucose는 초산균의 탄소 공급원 및 에너지원으로 이용되는 육탄당 유기화합물이고, Yeast extract는 원핵생물이 스스로 합성하지 못하는 여러 영양분을 공급하기 위해 첨가하는 효모 유래 추출물이다. 탄산칼슘은 본래 본연의 색을 갖고 있다가 초산과 반응하면 투명해지므로 초산 생성 여부를 확인하는 데에 사용된다(Song). 본 도전의 1차 균주 선별 과정에서는 단백질의 합성을 저해함으로써 진핵생물의 정상적인 생체활동을 방해하는 Cycloheximide 10% 수용액을 추가로 사용했다. BTB용액은 용액의 pH에 따라

황색, 녹색, 청색을 띠는 특성이 있어 산염기 지시약으로 이용된다. 본 연구에 사용되는 검증배지에서는 산성을 나타내는 아세트산의 검출을 돕기 위해 배지에 BTB용액을 첨가한다(Bellankimath).

2) 실험 설계 및 배지 제작

본 도전의 목표인 초산 생성 세균의 선별을 위해 적절한 특수배지를 고안한다. 초산 생성 세균의 서식 환경과 배양 조건을 조사한다. 시료에서 초산 생성 세균으로 보이는 균주만을 골라내고 순수 분리 및 계대 배양한다. 이후 순수한 균주를 후에 활용할 수 있게끔 초저온 냉동고에 반영구 보관하는 동시에 미생물 종의 규명을 위해 외부 업체에 동정을 의뢰한다.

우선 Cycloheximide를 함유한 고체 배지를 제작하여 미생물을 1차 선별하는 데에 사용했다. 배지의 조성은 다음과 같다. Glucose 5g, Yeast extract 1g, Ethanol 3mL, Calcium carbonate 3g, Agar 2.5g, Cycloheximide solution 100 μ L, DI water 100mL

이후 산염기 지시약인 BTB 용액을 함유한 고체 배지를 제작하여 1차 선별한 미생물을 재차 검증하는 데에 사용했다. 배지의 조성은 다음과 같다. Glucose 5g, Yeast Extract 1g, Ethanol 3mL, Calcium Carbonate 3g, Agar 2.5g, Bromothymol Blue 2.5mg, DI water 100mL

3) 시료 채집 및 초대배양

교내 여러 지역에서 흙을 채집한다. 단, 흙은 표면에서 15~20cm정도 깊이에 있는 것을 10% 농도로 증류수에 희석한다(Bellankimath). 희석한 흙을 다시 계대 희석하여 서로 다른 농도의 희석액을 만들고, 준비된 배지에 평판도말(spreading)한다. 그 가운데에 주변이 투명하게 변한 균주를 얻어내고 선상도말(streaking)을 반복하여 순수 분리한다.

4) 계대배양 및 균주 보존

미생물을 계대 배양할 때에는 도달하는 미생물의 개체 수를 일정하게 유지해야 한다. 미생물의 특성상 육안으로의 개체 수 확인은 매우 어려우므로, 분광 광도계를 이용하여 수용액의 흡광도를 측정함으로써 개체 수를 어렵한다.

순수하게 분리한 균주를 다시 평판도말하여 순수한 콜로니를 대량으로 늘린 후 4° C의 저온 냉동실에 보관한다. 이렇게 제작된 배지는 매 실험에 사용되는 미생물의 출처로 이용된다.

또한, 미생물 균집을 일부 채취하여 -80° C의 초저온 냉동고에 보관한다. 초저온 상태에서의 미생물의 훼손을 방지하기 위해 GYE 액체 배지(Glucose 5g; Yeast extract 1g; Ethanol 3mL; DI water 100mL)에 단기간 배양한 뒤, 동결보호제인 글리세롤 50% 수용액과 1:1 비율로 섞는다. 글리세롤은 투과성이 좋아 세포막 사이를 잘 침투하며, 세포내 얼음 생성을 억제한다.

5) 미생물 동정

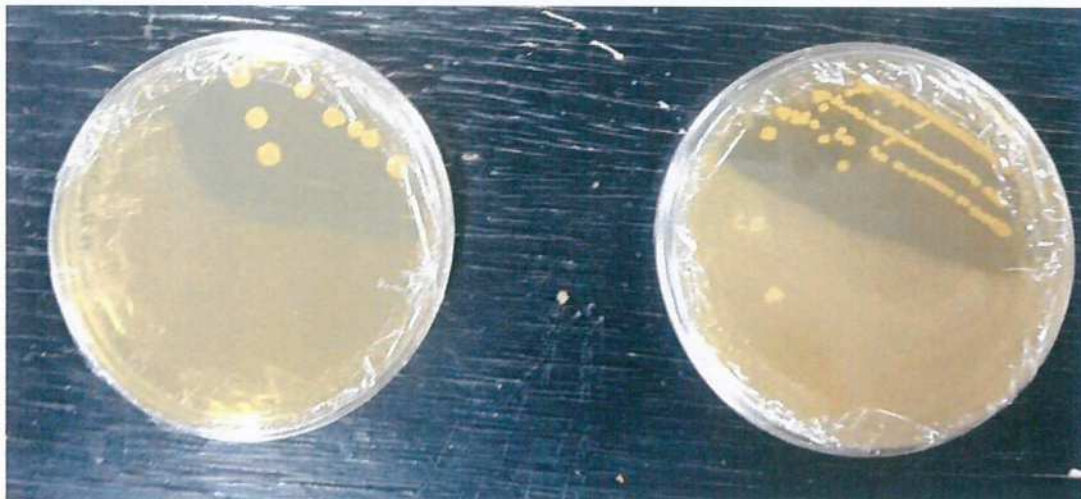
순수 배양된 미생물의 배지 또는 글리세롤 보존액을 외부 바이오 연구 업체((주)코스모진텍)에 보내 미생물 종 규명을 의뢰한다. 미생물 동정으로 얻은 염기 서열 정보를 바탕으로 생물학 정보 시스템에 검색하여 종명을 확인한다. 미국 국립 생물 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)의 데이터베이스를 활용하여 유사한 유전 정보를 가진 기존의 시료들을 찾을 수 있다. 그 가운데 가지고 있는 시료와 일치도가 가장 높은 종을 추려낸다.

6) 연구 결과의 공유

연구의 성과물을 공유하기 위해 적절한 학술지를 탐색하고 논문을 작성, 투고하는 연습을 한다. Elsevier에서 운영하는 Science Direct 학술지 데이터베이스를 활용하여 주제에 맞는 학술지를 찾아내고 해당 학술지에서 요구하는 양식에 맞게 편집하고자 했으나, 도전 기간 내에 해결하는 데에 어려움을 겪고 학술지 탐색까지의 과정만을 수행했다.

3. 도전 과제의 성과

본 도전 과제의 1차 목표인 연구 대상의 특성과 그 선별 및 배양 방법의 조사, 최종 과제인 초산 생성 세균의 분획 실험 설계는 도전 1주차에 마쳤다. 같은 주에 초산 생성 세균의 생태와 특성을 이용한 특수배지를 고안, 수행 계획을 완성했다. 곧바로 실험을 시작하여 초산 생성 세균으로 보이는 시료를 2개 얻어냈다.



분리해낸 두 균주

1) 미생물의 염기 분석과 종 규명

도전 2주차에는 얻은 시료를 외부 업체에 보내고 염기 서열 분석을 의뢰했다. 염기 분석에는 16S rRNA PCR(16 small subunit 리보솜 RNA 중합효소 연쇄반응) 방법이 사용되었으며, 정방향 증폭에 27F, 역방향 증폭에 1492R 프라이머가 작용했다.

동정 결과물인 유전자 염기서열을 검색하고 비교한 결과, 분리해낸 두 미생물은 *Acinetobacter courvalinii*로 보였다(Zhang). *Acinetobacter*는 호기성, 그람 음성균으

로, *Acetobacter*와 유사한 특성을 갖는다(Kuo). 또한, *Acinetobacter*는 인돌-3-아세트산을 생성하므로, 아세트산 생성균을 찾고자 하는 본래의 목적을 일부 달성했다(Lin). 하나, 본 도전의 주제였던 *Acetobacter*와는 다른 종이므로, 새로이 시료를 채취했다. 이번에 얻은 미생물이 생산하는 인돌-3-아세트산은 식물의 성장을 촉진하는 호르몬으로도 작용하는 특징이 있어 도전을 마친 후에 이에 관한 별개의 실험을 진행한다(권). 미생물 동정을 의뢰하고 결과를 기다리는 사이에 글리세롤 동결 보존액을 제조하여 시료를 초저온 냉동고(deep freezer)에 보관하는 한편, 추가 실험을 설계 및 진행했다.

두 시료는 같은 종으로 추정되어 두 번째 균주의 결과지와 분석은 생략한다.

① 염기 서열의 비교 결과

1번 시료 정방향 증폭 결과 분석

>ref|AF602910.1| *Acinetobacter* sp. SS-192 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence
Length=1497

Score = 2013 bits (1080), Expect = 0.0
Identities = 1097/1100 (99%), Gaps = 2/1100 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 30  CATGC-AGTCSAGCGGGGAGGGTTCCTTCGGTAACCTGACCTAGCGGGGACGGGTGAGTA 88
      |||
Sbjct 46  CATGCAGTCSAGCGGGGAGGGTTCCTTCGGTAACCTGACCTAGCGGGGACGGGTGAGTA 105

Query 89  ATGCTTAGGAATCTGCCATTTAGTGGGGGACACATTCGGAAGGAATGCTAATACCGCA 148
      |||
Sbjct 106  ATGCTTAGGAATCTGCCATTTAGTGGGGGACACATTCGGAAGGAATGCTAATACCGCA 165

Query 149  TACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGGCCATAATGATGAGCCTAAGT 208
      |||
Sbjct 166  TACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGGCCATAATGATGAGCCTAAGT 225

Query 209  GGGATAGCTAGTGGTGGGTAAGGGCCATCCAAAGGCGAAGATCTGTACCGGGTCTGAG 268
      |||
Sbjct 226  GGGATAGCTAGTGGTGGGTAAGGGCCATCCAAAGGCGAAGATCTGTACCGGGTCTGAG 285

Query 269  AGGATGATCGGCCACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCTACGGGAGGCAAGCAGTG 328
      |||
Sbjct 286  AGGATGATCGGCCACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCTACGGGAGGCAAGCAGTG 345

Query 329  GGGAAATTGGCAATGGGGCAAGCCGATCCAGCCATGCCGGTGTGTGAAGAAGGCC 388
      |||
Sbjct 346  GGGAAATTGGCAATGGGGCAAGCCGATCCAGCCATGCCGGTGTGTGAAGAAGGCC 405

Query 389  TTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACCTAGATTAATCTCTAGGATAG 448
      |||
Sbjct 406  TTTTGGTTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACCTAGATTAATCTCTAGGATAG 465

Query 449  TGGTCTTACTCGGATATAAGCACTGGCTAACCTCTGGTACGACGGTGGTATATACG 508

```

1번 시료 역방향 증폭 결과 분석

>ref|NR_148843.1| *Acinetobacter* courvalinii strain ANC 3623 16S ribosomal RNA, partial sequence
Length=1489

Score = 1995 bits (1080), Expect = 0.0
Identities = 1082/1083 (99%), Gaps = 0/1083 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 33  GGGCCCTCTTTCAGTTCAGCTAGCTACTTCTGGTGCACAACTCCCATGGTGTGACGGG 92
      |||
Sbjct 1429  GGGCCCTCTTTCAGTTCAGCTAGCTACTTCTGGTGCACAACTCCCATGGTGTGACGGG 1370

Query 93  GGGTGTGTACAAGGGCCGGGADGTAATTCACCGGGCATTCGATCGGATTTACTAGCG 152
      |||
Sbjct 1369  GGGTGTGTACAAGGGCCGGGADGTAATTCACCGGGCATTCGATCGGATTTACTAGCG 1310

Query 153  ATTCGACTTCAAGGATCGAGTTCGACGCTCCAAATCGGACTACGATCGGCTTTTGTAG 212
      |||
Sbjct 1309  ATTCGACTTCAAGGATCGAGTTCGACGCTCCAAATCGGACTACGATCGGCTTTTGTAG 1250

Query 213  ATTAGCATCCTATCGCTAGGTAGCAACCCCTTTGTACCGCAATGTAGCAGTGTGTAGC 272
      |||
Sbjct 1249  ATTAGCATCCTATCGCTAGGTAGCAACCCCTTTGTACCGCAATGTAGCAGTGTGTAGC 1190

Query 273  CCTGGCGTAAAGGGCAATGATGACTTACGCTGCTCCCGGCTTCTCCAGTGTGTCACTG 332
      |||
Sbjct 1189  CCTGGCGTAAAGGGCAATGATGACTTACGCTGCTCCCGGCTTCTCCAGTGTGTCACTG 1130

Query 333  GCAGTATCCTTAAAGTCCCAATCCGAAATGCTGGCAAGTAAAGGAAAGGGTTCGGCTCGT 392
      |||
Sbjct 1129  GCAGTATCCTTAAAGTCCCAATCCGAAATGCTGGCAAGTAAAGGAAAGGGTTCGGCTCGT 1070

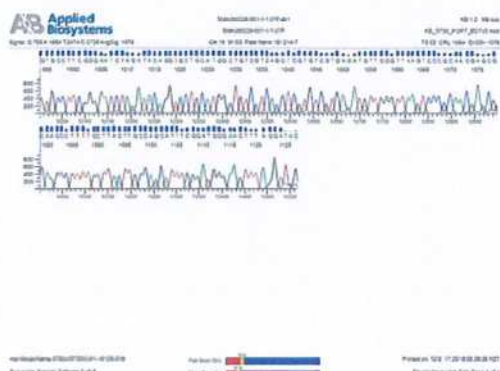
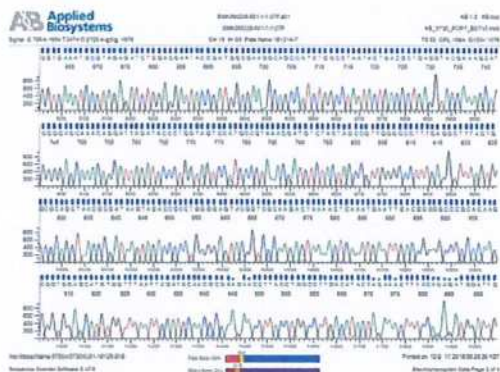
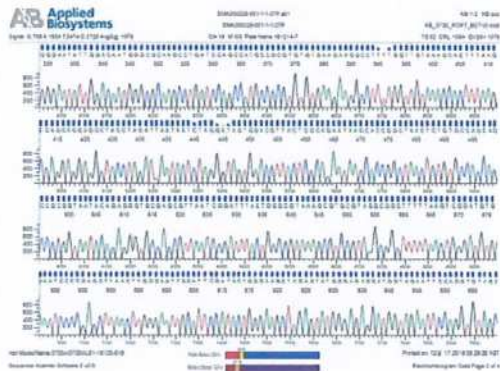
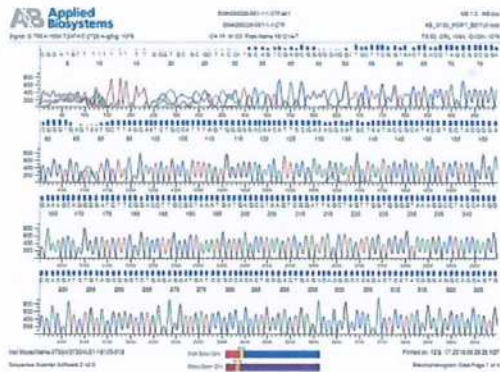
Query 393  TGGGGACTTAAACCAACATCTCAAGACAGAGCTGAGSACAGCCATGCGACACCTGTAT 452
      |||
Sbjct 1069  TGGGGACTTAAACCAACATCTCAAGACAGAGCTGAGSACAGCCATGCGACACCTGTAT 1010

Query 452  TCACTTCCCAAGCCACATTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 512

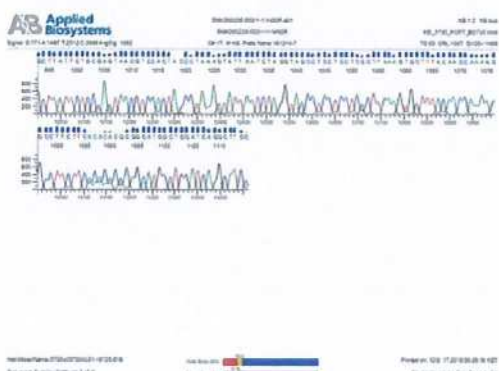
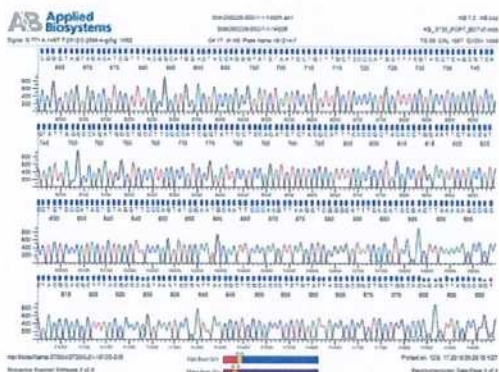
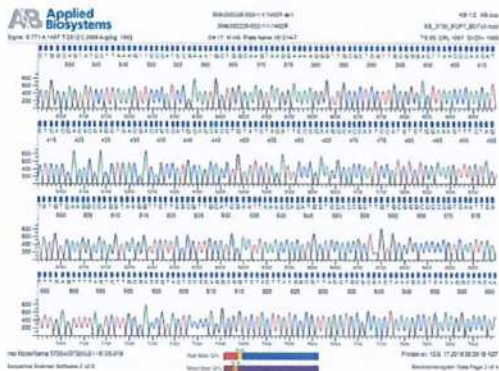
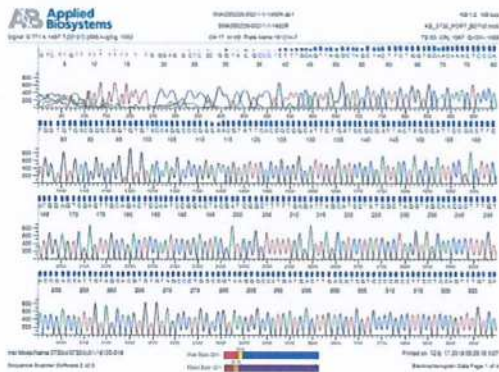
```

② 염기 서열 분석의 결과

1번 시료 정방향 증폭 결과지



1번 시료 역방향 증폭 결과지



2) 미생물의 동결 및 반영구 보존

미생물을 4° C에 보관함으로써 미생물을 단기간 보존할 수 있다. 하지만, 미생물의 장기 보존을 위해서는 -80° C의 초저온 냉동고에 보관해야 한다. 이 과정에 미생물의 손상을 방지하기 위해 글리세롤 동결보존액을 사용한다. 글리세롤 동결 보존액을 만들고 동결 보관하는 과정은 다음과 같다.

- ① 미생물 시료를 GYEC 고체 배지에서 덜어 GYE 액체 배지에 48시간 이상 배양한다.
- ② Glycerol 원액 500 μ L와 DI water 500 μ L를 혼합하여 글리세롤 동결보존액을 제조한다.
- ③ 미생물 배양액 500 μ L를 동량의 글리세롤 동결보존액과 혼합한 뒤, 초저온 냉동고에 보관한다.

※ 일반 용기는 초저온 상태에서 변형할 우려가 있으므로, 동결용 튜브를 사용하거나 철저히 밀봉해야 한다.



동결보존액에 혼합된 미생물 시료 초저온 냉동고에 보관된 보존용 시료

3) 막걸리를 이용한 배지 보완 실험

아직 BTB 지시약 등 2차 검증 실험에 필요한 재료가 도착하지 않았을 때 이전에 사용한 배지와 함께 막걸리를 이용해 만든 새로운 배지(이하 MC 배지)를 사용하여 두 배지를 비교하려 했다. 이번 실험을 통해 전통 식초 제조법을 응용한 배지가 기존의 초산균 배양 배지와 어떤 차이가 있는지 확인한다. 본 실험에서는 막걸리를 이용한 새로운 배지에서의 생합성이 더욱 활발할 것으로 기대했다.

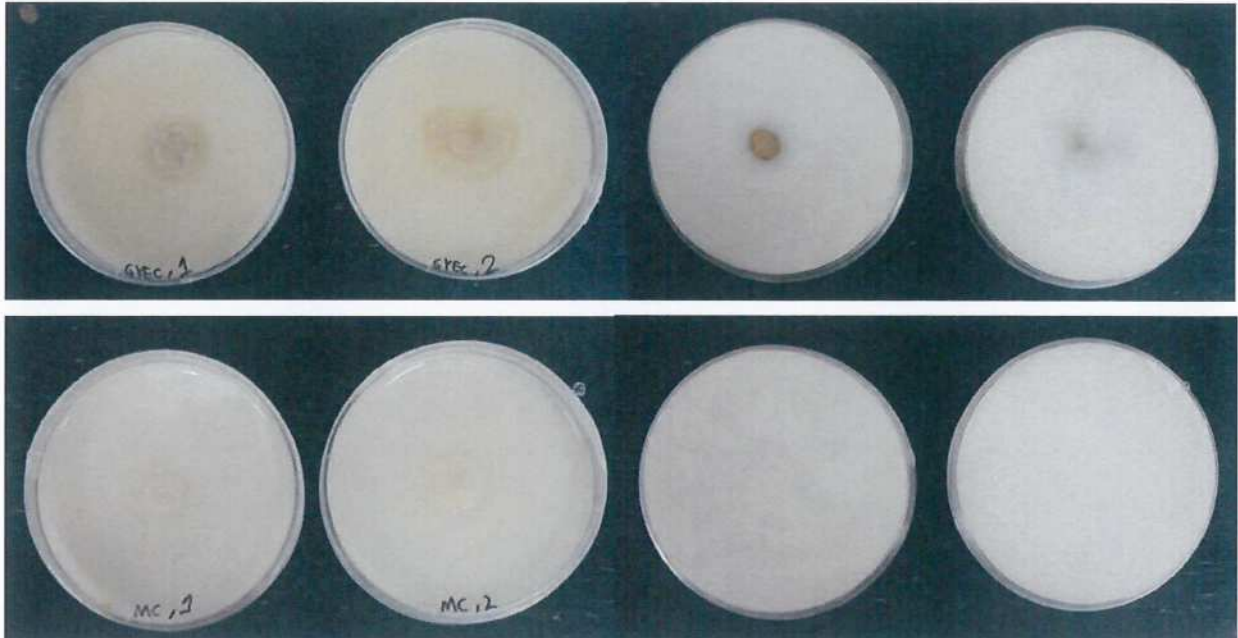
이번 실험에 사용된 배지의 조성은 다음과 같다.

Calcium carbonate 3g, Agar 2.5g, 서울생살균막걸리 100mL



완성된 MC배지의 예시

시료를 묻힌 지 10일이 된 날에는 GYEC 배지의 바닥 면이 선명하게 투명해졌음을 확인할 수 있었다. 그에 반해, MC 배지의 바닥 면에서는 별다른 변화를 관찰할 수 없었다. 이로 미루어보아 기존의 GYEC 배지에서 미생물의 초산 생성 활동이 더 활발히 이루어졌으며, 새로이 개발한 MC 배지는 초산 생성에 부적합했다. 따라서 본 실험은 의미 있는 연구로 인정받기 어렵다고 판단하여, 실험을 중단했다.



기존 GYEC 배지와 MC 배지의 겉면과 바닥면

4) 지시약을 이용한 배지 보완 실험

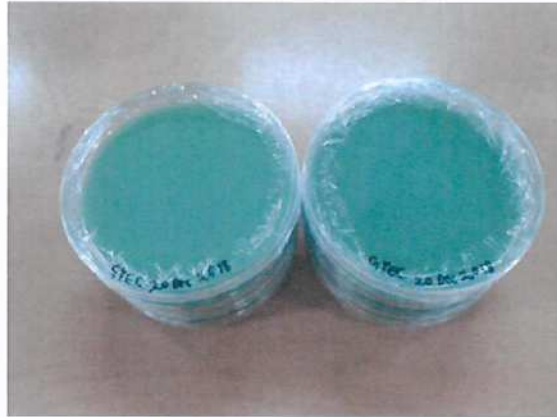
산염기 지시약을 이용하여 아세트산 생성 세균의 선별에 더욱 용이한 특이적 배지를 제작했다. 이번 실험에 사용된 BTB 용액은 중성에서 녹색, 염기성에서 청색, 산성에서 황색을 나타낸다. 따라서 이번에 개발한 배지는 평상시에 녹색을 보이다가 배양하던 미생물이 초산을 생성하면 배지에 포함된 BTB 용액이 산성의 영향을 받아 미생물 주변이 황색으로 변할 것으로 예상했고, 이는 실제로 확인되었다. 균주가 *Acinetobacter* 로 알려진 후 반복한 실험에서 배지가 반대로 청색으로 변할 수 있음을 확인했다.

이번 실험에 사용된 배지의 조성은 다음과 같다.

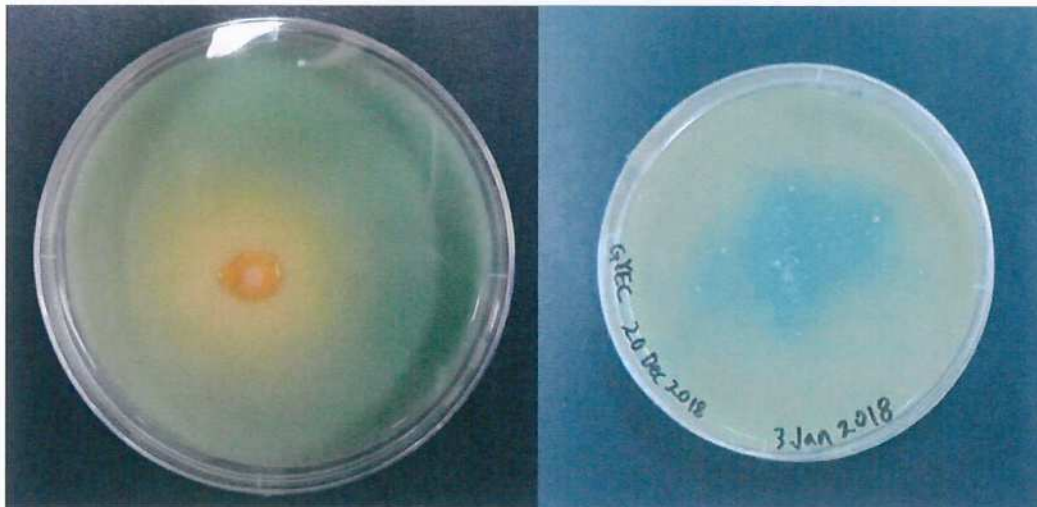
Glucose 5g, Yeast Extract 1g, Ethanol 3mL, Calcium Carbonate 3g, Agar 2.5g, Bromothymol Blue 2.5mg, DI water 100mL



GYEC 배지 제작 과정



완성된 GYEC 배지



보완된 GYEC에서 자라는 균주 반복 실험에서 새로 찾아낸 균주

5) 관련 학술지 탐색

이번 도전에서는 아쉽게도 기간 내에 독립된 연구로서 충분한 수준의 결과물을 얻지 못했다. 하지만, 본래 도전 내용은 ‘1. 문헌 조사와 실험 설계’, ‘2. 실험의 진행’, ‘3. 논문 출판 과정 이해’였으므로, 마지막 하위과제인 연구 결과물의 공유 과정을 익히기 위해 본 도전 기간 동안 수행한 연구와 관련된 주제를 다루는 학술지들을 조사하기로 했다.

① *International Journal of Food Microbiology*

네덜란드의 세계적 출판사, Elsevier가 출판하는 식품미생물학 학술지다. Web of Science, SCOPUS, MEDLINE 등, 과학과 생물학 분야의 권위 있는 인용 색인들에 등재되어있다. 과학 학술지 검색 데이터베이스인 Science Direct에 이 학술지와 *Acinetobacter* 키워드를 동시에 검색했을 때, 2017년 출판 논문 중 14건, 2018년 출판 논문 중 21건, 금년에만 6건이 발견되었다. 해당 학술지는 최근 본 연구에서 이용할 소재인 *Acinetobacter*에 관련된 논문을 특히 많이 출판하고 있으므로, 연구 결과를 공유하기에 적합한 학술지로 보인다. 또, Elsevier 출판물의 특성상 엄격한 원고 양식을 적용하지 않아 원고 편집의 부담이 적다.

② *Journal of Microbiology*

독일에 본사를 두고 있으며, *Nature*의 출판사로 잘 알려진 Springer가 출판하는 미생물학

학술지다. 이 학술지도 Web of Science, SCOPUS, MEDLINE 등 주요 인용 색인들에 등재되어 있으며, 국제 저널임에도 불구하고 국내 학술단체인 한국 미생물학회에서 편집을 담당한다는 점 때문에 국내 연구자들이 유독 많이 활동한다는 특이사항이 있다.

③ *Food Microbiology*

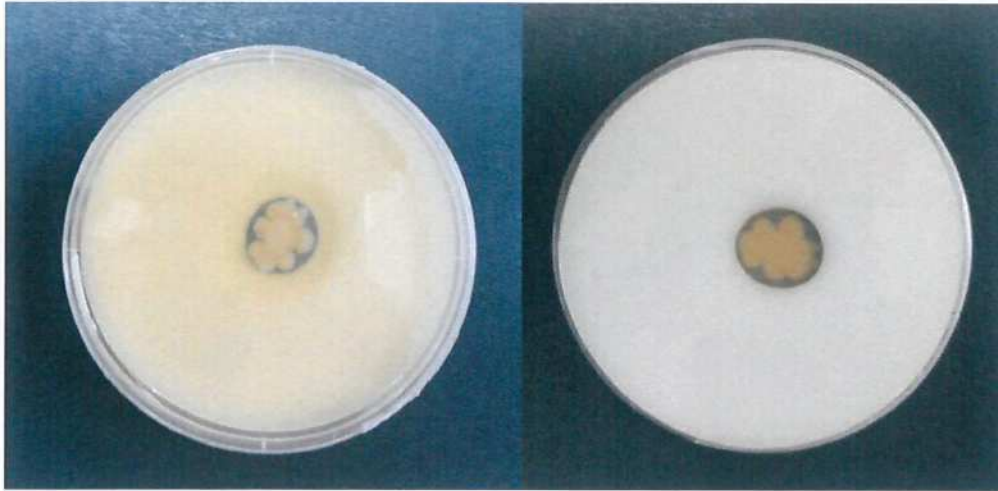
Elsevier가 출판하는 또 다른 식품미생물학 학술지다. 학술지의 목표와 범위가 식품 미생물학 전범위고 다루는 주제가 미생물의 독성, 발효 및 부패라 하고자 하는 연구와 잘 맞다. *International Journal of Food Microbiology*와 마찬가지로 원고 편집에 드는 시간과 노력이 적다.

4. 자기평가

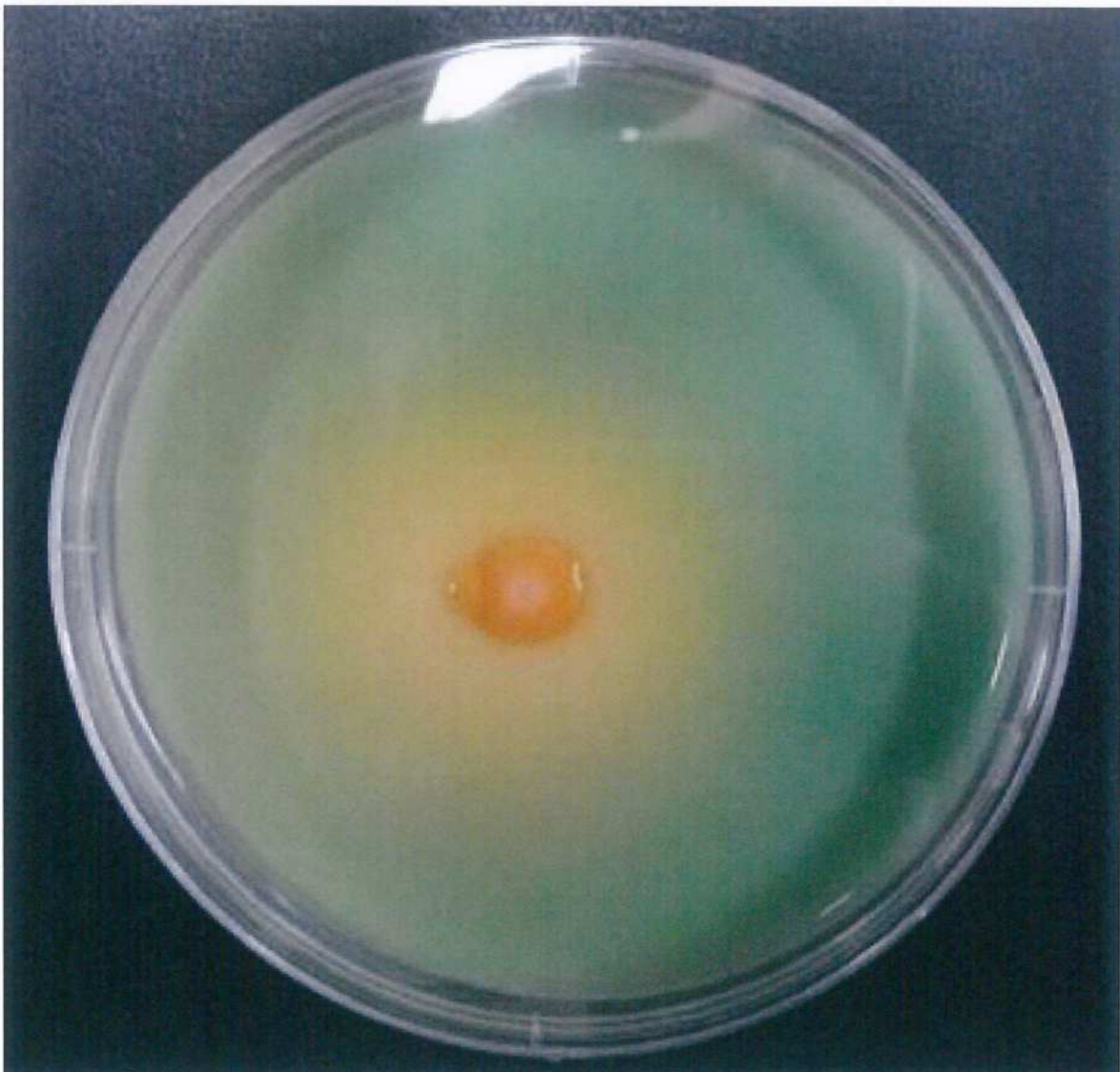
생명과학, 특히 미생물학 연구의 특성상 다른 지역과 환경에서의 실험이 매년 같은 결과를 기대하기는 어렵다. 나름대로 사전 조사를 철저히 하여 초산균의 특성을 이용한 선별 방법과 배지를 개발했으나, 유사한 특성을 지닌 다른 균을 얻었다. 본래 목표한 *Acetobacter aceti*를 선별해냈다면 더없이 좋았겠지만, 역시 초산을 생산하는 *Acinetobacter*를 얻어냈기에 내가 고안한 선별법과 실험 과정이 일리 있었다는 확신이 들었다. 또, 미생물 염기서열 정보를 이용하여 해당 미생물의 종명을 알아내는 과정에서 생물정보학적 방법을 활용했는데, 수박 곱핥는 마냥 빙산일각만을 체험했지만 스스로 활용법을 터득했다는 점에서 의미 있었다. 누군가의 구체적 지시 없이 과제를 해결하기 위해 자료를 수집하고 실험을 설계, 진행했고, 이에 문제는 없었다. 보통 연구자들은 사전 조사, 실험의 설계와 진행, 논문 작성에 거의 같은 시간을 할애한다고 한다. 이번 도전에서는 계절학기의 특성상 실험을 설계하고 진행하는 데에만 거의 모든 시간을 소비할 것 같다. 만일 시간이 넉넉하게 주어졌다면 *Acetobacter* 종을 선별할 수 있었을 것이다.

5. 최종 결과물

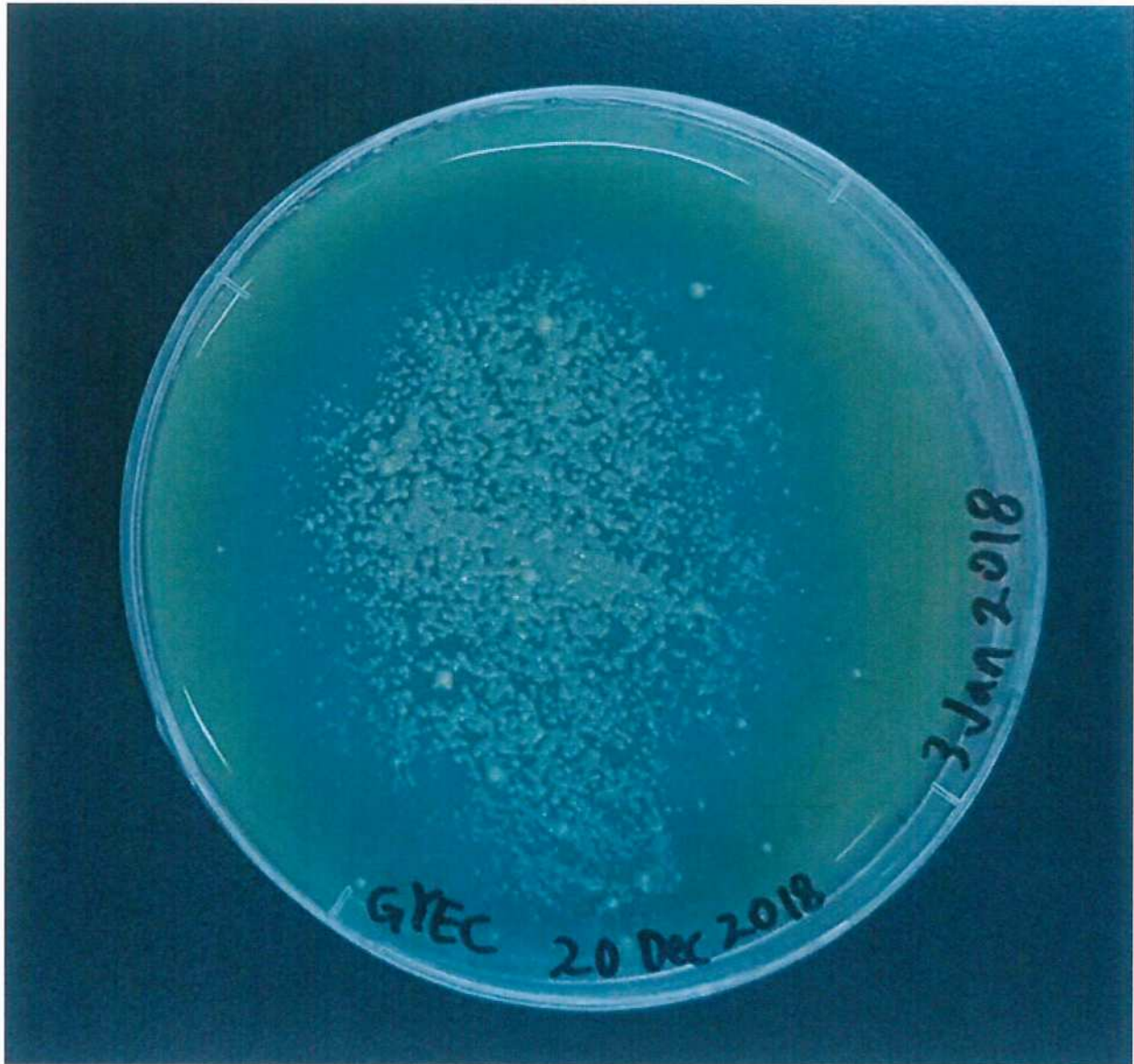
1) 바닥이 투명해진 GYEC 배지



2) 검중배지와 산성 대사산물을 생성하는 *Acinetobacter*



3) 검증배지와 혐기성 대사산물을 생성하는 미확인 미생물



4) 미생물 염기서열

① 1번 샘플 16s rRNA 27F 프라이머 PCR 반응 결과

CATGC-AGTCGAGCGGGGAGGTTGCTTCGGTAACTGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
 TGCTTAGGAATCTGCCATTTAGTGGGGGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCAT
 ACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAAATGATGAGCCTAAGTCG
 GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAG
 GATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
 AATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTT
 GGTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACCTAGATTAATACTCTAGGATAGTGGA
 CGTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGT
 GCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGAT
 GTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTTCGATACTGGGAAGCTAGAGTATGGGA
 GAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGAT
 GCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTG
 AGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACT
 AAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAT
 GCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATACTAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGT
 GCCTTCGGGAATCTAGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTACTTGCCAGCATTTCGGATGGGAACCTT
 A-GGATAC

② 1번 샘플 16s rRNA 1492R 프라이머 PCR 반응 결과

CGCCCTCTTTGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGAACAAACTCCCATGGTGTGACGGGC
 GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGAT
 TCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGAT
 TAGCATCCTATCGCTAGGTAGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCT
 GGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAG
 TATCCTTAAAGTTCCCATCCGAAATGCTGGCAAGTAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
 GGACTIONAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATCTAGA
 TTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTTCTAGTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTT
 CTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCA
 TTTGAGTTTTAGTCTTGGGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCC
 ACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGT
 ATCTAATCCTGTTTTGCTCCCCATGCTTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGGCCAGATGGCT
 GCCTTCGCCATCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTA
 CCATCCTCTCCATACTCTAGCTTCCCAGTATCGAATGCAATCCCAAGTTAAGCTCGGGG
 ATTTACATCCGACTTAAAAAGCCGCCTACGCACGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTAAC
 GCTCGCACCCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGCGA
 GTAACGTCCACTACCCTAAAGTATTAATCTAGGTAGCCTCCTCCTCGCTTAAAGTGCTTT
 ACAACCAAAGGCCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGC


③ 2번 샘플 16s rRNA 27F 프라이머 PCR 반응 결과

CATGCAAGTCGAGCGGGGAAGGTTGCTTCGGTAACTGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
TGCTTAGGAATCTGCCATTTAGTGGGGGACAACATTCGAAAGGAATGCTAATACCGCAT
ACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAAATGATGAGCCTAAGTCG
GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAG
GATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTT
GGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACCTAGATTAATACTCTAGGCTAGTGGA
CGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGT
GCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGAT
GTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTTCGATACTGGGAAGCTAGAGTATGGGA
GAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGAT
GGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACA
GGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTG
AGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACT
AAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATACTAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGT
GCCTTCGGGAATCTAGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCGTAAATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCTTACTTGCCAGCATTTTCGGATGGGAA
CTTTAAGG

④ 2번 샘플 16s rRNA 1492R 프라이머 PCR반응 결과

CGTGGT-ACTGCCCTCTTTGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGCAACAAACTCCCATGGT
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATT
ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTT
TTTGAGATTAGCATCCTATCGCTAGGTAGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTG
TGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCGCCTTCTCCAGTTTGT
CACTGGCAGTATCCTTAAAGTTCCCATCCGAAATGCTGGCAAGTAAGGAAAAGGGTTGCG
CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCT
GTATCTAGATTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTTCTAGTATGTCAAGGCCA
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCC
GTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGT
TAGCTGCGCCACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGA
CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCATGCTTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGG
CCAGATGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACC
TGGAATTCTACCATCCTCTCCATACTCTAGCTTCCCAGTATCGAATGCAATTCCCAAGTT
AAGCTCGGGGATTTACATCCGACTTAAAAAGCCGCTACGCACGCTTTACGCCAGTAAA
TCCGATTAACGCTCGCACCCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCT
TATTCTGCGAGTAACGTCCACTATCCTAAAGTATTAATCTAGGTAGCCTCCTCCTCGCTT
AAAGTGCTTTACAACCATAAGGCCCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCC
CATTGTCCA-TATT-CCCACTGCTGCCTCC

출산권 검출 실험

유전공학 실험실 [redacted] 

2018.12.3 ~ 2019.1.15

12.4

18:30 Glucose 25g, Yeast extract 5g, Ethanol 15ml, CaCO₃ 15g, Agar 12.5g
Cycloheximide 500μl, DI water 500ml.
GYEC배지 20개 제조.

12.5

09:10 군내 15군데에서 지표 15~20cm 깊이의 흙 채집.

1mg/9ml 증류수에 현탁. 10⁻⁶ 농도로 희석.

13:15 200μl씩 GYEC 배지에 도말.

14:25 27°C 배양기에 보관

12.8

14:40 두 개 배지에서 투명한 고리 만드는 파생물 발견.

순수균주 계대배양 위해 선상도말



12.10

08:55 순수 균주로 보이는 클론4 덩어리 다시 선상도말



12.12

11:30 클론4 덩어리 평판도말. cosmo genetech에 full sequencing 주문.

Date

Page

12.14

09:20 보고서 제출

10:00 8일 배지 곰팡이 오염 발견. 폐기.

Glucose 12.5g, Yeast extract 2.5g, Ethanol 7.5mL, CaCO₃ 2.5g, Agar 6.25g

Cycloheximide 250μL, DI water 250mL

GYES 배지 10개 제조.

12.15

11:00 시료 1,2 글리세롤 동결 후 초저온 냉동고 보관.

14:00 막걸리 100mL에 CaCO₃ 3g, Agar 2.5g 용해
MC 배지 3개 제조.

20:20 시료 1,2 GYES와 MC 배지에 문힌 뒤 27°C에 배양.

12.17

09:40 미생물 동정 결과 등류 1,2 균주 모두 *Acinetobacter*로 확인.

20:30 GYES, MC 배지 미생물 정착 확인. GYES의 미생물 균체 미세하게 투명해짐.

12.20

09:50 Glucose 10g, Yeast extract 2g, Ethanol 6mL, CaCO₃ 6g, Agar 5g, Bromothymol Blue 5g,
DI water 200mL

GYES 배지 8개 제조.

12.24

09:10 GYES, MC (12.15) 폐기. → GYES는 투명, MC는 그대로.

12.27

11:00 과일나무 아래에서 $\frac{1}{2}$ 리 채집. 1.65g을 증류수(DI water) 15mL에 희석.

2.

12월 27일

11:10 증관총 (12~13ml 농도에서 200 μ L 취출, ~~12.20~~ 배지에 도말. 배양기에 보관.
 18:35 GYEC (12.20)에 1,2 샘플 재어넣음.

~~12.29~~
 12.29

09:00 GYEC (12.27) 완전히 덮임. 폐기 후 같은 방식으로 샘플 준비.

13:25 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} 농도로 희석 후 200 μ L씩 도말, 37 $^{\circ}$ C에 배양.

12.31

08:50 2 배지 (12.27) 곰팡이 오염 발견. 폐기.

1.3

20:25 10^{-6} , 10^{-8} 농도 배지 (12.29) 폐기.

20:50 10^{-4} (12.29)에서 클로린 처리 후 DI water 1ml에 희석. 10^{-4} 로 재차 희석하여 GYEC (12.20)에 100 μ L 도말. 37 $^{\circ}$ C 배양.

1.9

08:45 GYEC (1.3) 청색으로 변함.

참고문헌

- Bellankimath, A., et al. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6, 1255-1265 (2017).
- Kuo, S., & Chen, T. *Antimicrobe*. Acinetobacter species.
- Lin, G.H., et al. *Microbiological Research*. 216, 30-39 (2018).
- Ndoye, B., et al. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 916-923 (2006).
- Raspor, P., & Goranovic, D. *Critical Reviews in Biotechnology*. 28, 101-124 (2008).
- Saeki, A., et al. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 61, 138-145 (1997).
- Song, N.E., Cho, H.S., & Baik, S.H. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47, 452-460 (2016).
- United States Environmental Protection Agency. *Chemicals under the Toxic Substances Control Act*.
- Walker, T. K., & Tosic, J. *Journal of the Institute of Brewing*. 52, 238-249 (1946).
- Zhang, Z., et al. *Journal of Computational Biology*. 7, 203-214 (2000).
- 권혁도 & 송홍규. *미생물학회지*. 50권, 302-307 (2014).

※ 분량 제한 없음

※ 참고문헌이 있을 시 정확히 명시