

저지종 송아지의 성장과 분변 미생물 간의 연관성 연구

김동현*, 임동현*, 박성민*, 박지후*, 김언태**, 최태정*, 염준식*

*국립축산과학원 낙농과

**국립축산과학원 난지축산연구센터

e-mail:kimdh3465@korea.kr

A Study of relationship between growth level and fecal microbial diversity in Jersey calves

Dong-Hyeon Kim*, Dong-Hyun Lim*, Seong-Min Park*, Ji-Hoo Park*,

Eun-Tae Kim**, Tae-Jeong Choi*, Jun-Sik Eom*

*Dairy Science Division, National Institute of Animal Science

**Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science

요약

본 연구는 저지종 송아지의 성장단계에 따른 분변 미생물의 다양성을 비교 분석하기 위해 수행되었다. 이유 전 젖소 송아지의 건강한 성장을 보장하고 질병을 최소화하는 것은 이유 후 최적의 성적과 농장 수익성을 위한 핵심 요소입니다. 장내 미생물총은 면역 기능 및 에너지 대사를 포함하여 초기 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 점차 인식되고 있습니다. 히트맵 분석 결과, 엔테로코쿠스 히라에(*Enterococcus hirae*)와 에스케리키아 페르구소니(*Escherichia fergusonii*)와 같은 특정 종은 1주차에 더 풍부했고, 리모실락토바실러스 로이테리(*Limosilactobacillus reuteri*)는 특정 샘플에서 4주차와 8주차에 두드러졌습니다. 알파 다양성 지수는 1주차에서 8주차로 증가하여 시간이 지남에 따라 미생물 군집이 더욱 균형 잡혔음을 시사합니다. 주 좌표 분석(PCoA) 결과, 1주차와 이후 주에 미생물 군집 구조가 뚜렷하게 나타났습니다. 이러한 연구 결과는 초기 미생물 군집 구성을 원하는 방향으로 유도하기 위해서는 적어도 1주 이내에 특정 유익균들이 안정적으로 정착하여 우점종이 되어야 한다는 점을 시사합니다.

2.1 공시동물 및 사양관리

본 시험은 국립축산과학원 축산자원개발부에서 수행하였고, 동물보호법 및 국립축산과학원 동물실험윤리위원회에서 검토 승인한 방법에 따라 진행되었다 (NIAS2024-0019).

공시동물은 총 10두의 저지종 송아지를 대상으로 시험을 진행하였으며, 모든 송아지는 출생 후 2시간 이내에 어미 소와 분리하여 3시간 이내에 어미 소의 초유(평균 단백질 16%, 지방 8.6%, 유당 3.0%)를 급여하였다. 3일령까지는 전환유, 이후에는 전유(단백질 4.1%, 지방 5.3%, 유당 4.5%)를 급여하였다. 7일령 이후에는 송아지 스타터(평균 조단백질 20%, 조지방 5.5%, 조회분 6.6%)와 혼합 건초(티모시 50%, 톨페스큐 50%; 평균 조단백질 7.7%, 조지방 1.2%, 조회분 6.0%, 중성세제불용성섬유소 60%, 산성세제불용성섬유소 34%)를 급여하였다.

2.1.1 분변 채취

주령별 분변 미생물의 다양성 분석을 위해 멸균 면봉 키트(fecal swab collection and preservation system, Norgen Bioteck, Ontario, Canada)를 사용하

1. 서론

장내 미생물은 반추가축의 성장과 면역체계 발달에 핵심적인 역할을 하며, 특히 송아지 초기 발달 단계에서 건강과 생산성을 좌우하는 중요한 요인으로 알려져 있다[1]. 이유 전후의 장내 미생물 군집 변화는 설사 등 질병 발생 위험과 직결될 뿐만 아니라 이후 사료 이용 효율과 증체율에도 영향을 미친다[2, 3]. 최근 연구들은 송아지의 장내 미생물 구성이 출생 직후부터 빠르게 변하며[4], 특정 균주가 초기 성장과 면역 형성에 결정적 기여를 한다는 점을 보고하고 있다[5]. 따라서, 송아지 바달 단계별 장내 미생물 군집 특성을 이해하는 것은 건강 관리와 농장 수익성 향상에 필수적이다. 본 연구는 저지종 송아지를 대상으로 일반성장과 저성장 그룹의 성장단계별 분변 미생물 다양성을 분석하여 초기 미생물 군집 발달과 그 의미를 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

여 1주, 2주, 4주 및 8주령의 기간에 분변을 채취하여 분석하였다. 샘플은 DNA 정제 전까지 80°C에서 보관하였다.

2.1.2 DNA 정제

DNA는 제조사의 프로토콜에 따라 PowerSoil® DNA 분리 키트(Cat. No. 12888, MO BIO)를 사용하여 추출하였다. 정제된 DNA의 순도와 농도는 분광 광도계(Nanodrop1000, Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd., Basingstoke, UK)로 측정했고 DNA의 무결성은 아가로스(0.7%) 겔 전기영동으로 확인했다. DNA 샘플은 후속 처리까지 80°C에 보관했다. 추출된 DNA는 Seeders(Seeders Inc., Daejeon, Korea)에서 추가로 시퀀싱, 처리 및 분석했습니다.

2.2 데이터 수집 및 처리

2.2.1 데이터 전처리

시퀀싱 후, Cutadapt(v3.2)[6]를 사용하여 원시 데이터에서 어댑터 및 프라이머 서열을 제거하였다. 또한, forward와 reverse 리드는 Cutadapt(v3.2)를 사용하여 각각 250bp와 200bp로 절단되었다[7].

2.2.2 ASV 생성

Amplicon Sequence Variant (ASV) 서열을 생성하기 위해, DADA2(v1.18.0)[8]를 사용하여 오류 교정, 병합, 노이즈 제거 과정을 수행하였다. 예상 오류가 2 이상인 서열은 제외되었다. 오류가 있는 리드는 구축된 오류 모델을 기반으로 제거하였다. 오류 교정 이후에는 overlapping을 통해서 paired-end 리드를 병합하였다. 길이가 350bp보다 짧은 ASV는 R(v4.0.3)을 사용하여 필터링 하였다. 미생물 군집 비교 분석을 위해, QIIME(v1.9)을 이용하여 정규화를 수행하였다. 이 과정에서, 모든 샘플 간 비교 가능성을 보장하기 위해서 리드 수가 가장 적은 샘플을 기준으로 서브 샘플링을 실시하였다. 최종적으로 생성된 ASV는 다운스트림 분석에 활용되었다.

2.2.3 분류학적 분석

각 ASV는 참조 데이터베이스(NCBI 16S)에서 가장 높은 유사성을 가진 생물체에 정렬되었으며, Bayesian classifier (DADA2_v1.18.0, confidence value: 50) 알고리즘이 사용되었다[9]. 다운스트림 ASV 분석에는 QIIME (v1.9.0)이 활용되었다.

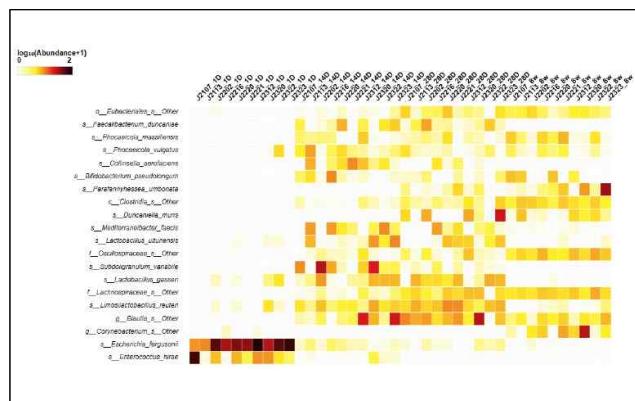
2.2.4 군집 다양성

세년 지수, 지니-심슨 지수, 그리고 Phylogenetic Diversity (PD) whole tree와 같은 알파 다양성 지표는 개별 샘플 내 종 다양성을 나타내기 위해 계산되었다. Mafft (v7.475)[10]와 FastTreeMP (v2.1.10)[11]를 이용하여 다중 정렬을 수행하고 ASV의 계통수를 구축하였다. 샘플 간 유전적 관계는 PCoA를 기반으로 시각화되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 상대적 풍부도

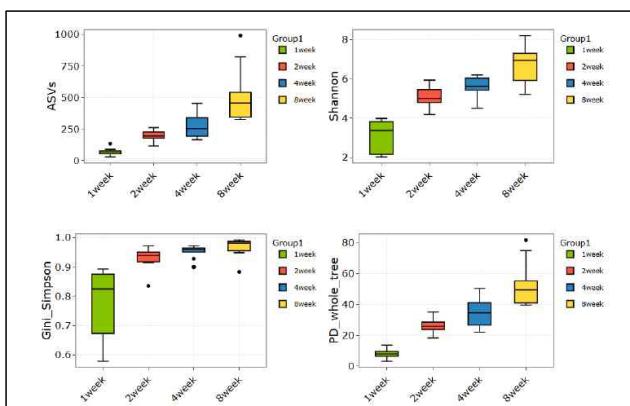
각 샘플별로 종 수준에서의 상대적 풍부도를 히트맵으로 확인한 결과(그림 1), 일부 종은 특정 시기에만 상대적 풍부도가 높게 나타나며(붉은색), 특히 *Enterococcus hirae*, *Escheichia fergusonii*와 같은 종은 생시에 두드러지게 나타남. 또한, *Limosilactobacillus reuteri*는 4주차와 8주차 특정 샘플에서 상대적 풍부도가 높게 나타나 샘플 간 미생물 군집의 차이가 있음을 보여줌



[그림 1] 종 수준에서 샘플 전체의 미생물 분류군의 상대적 풍부도에 대한 히트맵

3.2 알파 다양성

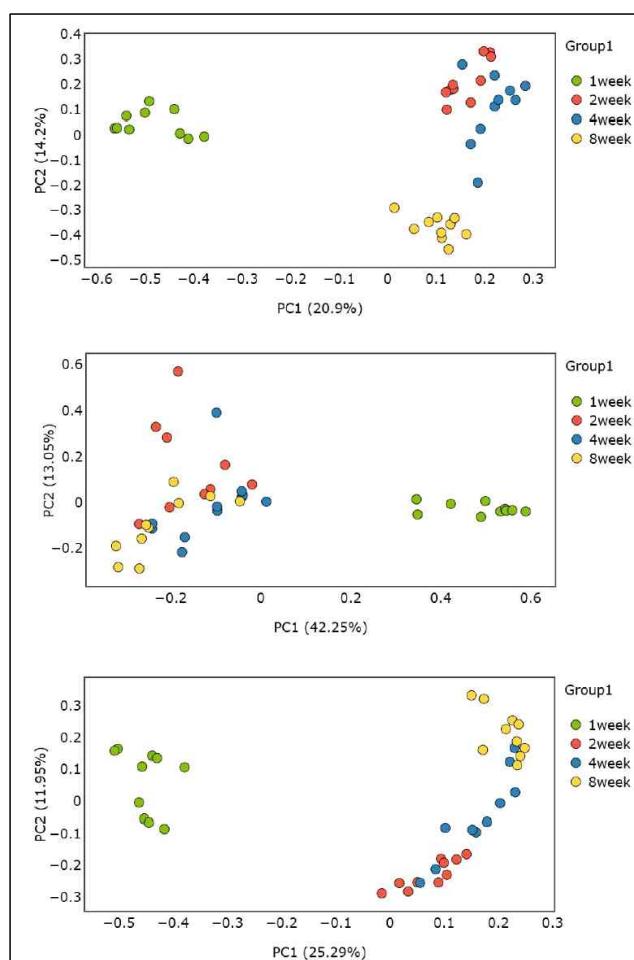
주령별 알파 다양성 (ASVs, 세년 지수, 지니-심슨 지수, PD Whole)를 기반으로 샘플 내 미생물 군집의 다양성과 균일성을 비교함(그림 2). 1주에서 8주로의 주령별 시간의 흐름에 따라 모든 지표에서 알파 다양성이 증가하고 있으며, 이는 시간이 지날수록 샘플 내 미생물 종이 점차 고르게 분포하고 있음을 시사함.



[그림 2] 주령별 ASVs, 세년 지수, 지니-심슨 지수 및 PD whole에 대한 알파 다양성

3.2 주 좌표 분석

PCoA 분석을 통해 샘플 집단 간 군집 구성 패턴을 시각적으로 확인하였으며(그림 3), 1주차 샘플은 PC1에 의해 구분되며 이는 해당 집단이 다른 군집들과 군집 구성 패턴의 차이를 보여주고 있음을 의미하며, 2주차 이후부터는 군집 구성이 유사하게 나타나는 것을 결과를 보여 줍니다.



[그림 3] Bary-Curtis (A), Weight unifrac (B) 및 Unweighted

unifrac 기반 주 좌표 분석

참고문헌

- Bauer, E., Williams, B.A., Smidt, H., Verstegen, M.W.A., Mosenthin, R. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 7, 35–51, 2006.
- Chung, H., Pamp, S.J., Hill, J.A., Surana, N.K., Edelman, S.M., Troy, E.B., Reading, N.C., Villablanca, E.J., Wang, S., Mora, J.R. Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota. *Cell*, 149, 1578–1593, 2012.
- Baldwin, R., McLeod, K., Klotz, J., Heitmann, R. Rumen Development, Intestinal Growth and Hepatic Metabolism In The Preand Postweaning Ruminant. *J. Dairy Sci.*, 87, E55–E65, 2004.
- Rey, M., Enjalbert, F., Combes, S., Cauquil, L., Bouchez, O., Monteils, V. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *J. Appl. Microbiol.*, 116, 245–257, 2014.
- Malmuthuge, N., Guan, L.L. Gut microbiome and omics: A new definition to ruminant production and health. *Anim. Front.*, 6, 8–12, 2016.
- Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, 17(1), 10–12, 2011.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581–583, 2016.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Knight, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335–336, 2010.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16),

5261–5267, 2007.

- [10] Katoh, K., & Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772–780, 2013.
- [11] Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one*, 5(3), e9490, 2010.