

Research Article

# 저지종 젖소의 반추위 내 미생물 균총 변화와 고창증 발병간의 상관관계 연구

김상범<sup>1,†</sup>, 오종석<sup>1,†</sup>, 정하연<sup>1</sup>, 정영훈<sup>1</sup>, 박범영<sup>1</sup>, 하승민<sup>1</sup>, 임석기<sup>2</sup>, 이성실<sup>3</sup>, 박지후<sup>1</sup>, 박성민<sup>1</sup>, 김언태<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원,

<sup>2</sup>전북대학교 국제농업개발협력센터,

<sup>3</sup>경상대학교 동물생명과학과

## The Study on the Relationship between Changes of Rumen Microflora and Bloat in Jersey Cow

Sang Bum Kim<sup>1,†</sup>, Jong Seok Oh<sup>1,†</sup>, Ha Yeon Jeong<sup>1</sup>, Young Hun Jung<sup>1</sup>, Beom Young Park<sup>1</sup>,  
Seung Min Ha<sup>1</sup>, Seok Ki Im<sup>2</sup>, Sung Sill Lee<sup>3</sup>, Ji Hoo Park<sup>1</sup>, Seong Min Park<sup>1</sup>, Eun Tae Kim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Republic of Korea,

<sup>2</sup>International Agricultural Development and Cooperation center, Chonbuk National University, Republic of Korea,

<sup>3</sup>Department of Animal Science & Biotechnology, Gyeongsang National University, Republic of Korea

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the relationship between changes of rumen microflora and bloat in Jersey cow. Jersey cows (control age: 42 months, control weight: 558kg; treatment age: 29 months, treatment weight 507kg) were fed on the basis of dairy feeding management at dairy science division in National Institute of Animal Science. The change of microbial population in rumen was analyzed by using next generation sequencing (NGS) technologies due to metabolic disease. The diversity of *Ruminococcus bromii*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium merycicum* and *Butyrivibrio fibrisolvens* known as major starch fermenting bacteria was increased more than 36-fold in bloated Jersey, while cellulolytic bacteria community such as *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens* was increased more than 12-fold in non-bloated Jersey. The proportion of bacteroidetes and firmicutes was 33.4% and 39.6% in non-bloated Jersey's rumen, while bacteroidetes and firmicutes were 24.9% and 55.1% in bloated Jersey's. In conclusion, the change of rumen microbial community, in particular the increase in starch fermenting bacteria, might have an effect to occur the bloat in Jersey cow.

(Key words : Bloat, Microbial diversity, Jersey cow, Rumen)

### I. 서론

고창증은 반추동물이 트림으로 가스를 배출할 수 있는 양보다 반추위에서 가스가 과다하게 생성될 때 발병한다(Majak et al., 2003). 2001년 6월부터 1년간 서부 캐나다 지역 낙농가에서 실시된 조사에서 총 355 두의 젖소가 폐사했는데, 폐사된 젖소 중 184 두를 사후검사 및 병리조직학적 검사한 결과, 11 두의 젖소가 고창증으로 폐사하였다(Waldner et al., 2009). 인도의 안드라프라데시주 60개의 낙농가 중 39개의 농가에서 부적절한 사료급여와 사양방식으로 인해 송아지에서 고창증이 발병해 경제적인 손실을 초래하였다(Sreedhar and Sreenivas, 2015). 고창

증 예방을 위해 젖소의 영양사료 및 사양관리분야에서 많은 연구가 되어오고 있지만, 아직까지도 고창증은 농가의 주요 경제적 손실의 원인 가운데 하나이다(Cheng et al., 1998; Wang et al., 2012). 고창증은 유리가스 고창증과 포말성 고창증 두 가지로 나뉜다(Cheng et al., 1998; Wang et al., 2012). 유리가스 고창증은 비정상적으로 과도한 사료섭취로 인해 반추위의 중앙신경계를 연결하는 미주신경의 손상뿐만 아니라 식도와 위 유문의 물리적 막힘으로 인해 발생된다. 특히 외부 이물질로 인해 식도가 막힐 경우, 반추위 발효로 인해 생성되는 가스는 트림으로 배출되지 못해 고창증이 발병되곤 한다(Cheng et al., 1998; Majak et al., 2003). 포말성 고창증은 고단백질 조사료, 미세사료입자 그리고

<sup>†</sup> These corresponding authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author : Eun Tae Kim, Dairy Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 31000, Republic of Korea, Tel: +82-41-580-3399, Fax: +82-41-580-3419, E-mail: etkim77@korea.kr

박테리아가 세포 외 다당류(exopolysaccharide)를 생성하기 좋은 조건이 원인이 되어 발생된다(Howarth et al., 1986; Majak et al., 2003; Wang et al., 2012). 알팔파와 클로버류의 단백질은 용해성 단백질로서 반추위 내 미생물 발효로 인한 가스생성을 빠르게 증가시킨다(Howarth et al., 1986; Majak et al., 2003; Wang et al., 2012). 사료 내 엽록체의 과열로 생성된 미세사료입자는 반추위 생성 gas와 결합하여 반추위 내 거품 생성을 증가시킨다(Hironaka et al., 1973; Howarth et al., 1986; Wang et al., 2012). 세포 외 다당류 또는 세균성 점성물질은 반추위 내 박테리아가 증식하기 좋은 조건을 만들어 주며, 미세사료 입자와 함께 반추위 gas와 결합하여 거품을 생성한다(Majak et al., 2003; Wang et al., 2012; Pitta et al., 2014). 많은 양의 알팔파와 곡물 사료를 젖소에게 급여하였을 때 박테리아가 다량 증식되고 세균성 점성 물질이 증가되는데(Majak et al., 2003; Min et al., 2006), 특히 알팔파가 어리고 곡물 사료의 품질이 좋을수록 반추위 내 미생물 성장이 증가하여 고창증을 자주 일으키곤 한다(Majak et al., 2003). 최근 연구들에서 사료의 형태나 물리적 사료입자 보다 미생물 생성물이 고창증 발병에 영향을 준다는 결과가 보고되고 있다(Majak et al., 2003; Min et al., 2006; Pitta et al., 2010; Pitta et al., 2016).

따라서, 본 연구를 통해 저지중 젖소의 반추위 내 미생물 군총의 급작스런 변화와 고창증 발병간의 연관성을 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시축 및 공시사료

국립축산과학원 낙농과에서 사양중인 Jersey종 젖소(29개월령, 507 kg) 가운데 고창증 발병으로 인해 갑작스럽게 폐사한 젖소의 반추위액과 캐놀라가 장착된 저지중(42 개월령,

558 kg)으로부터 반추위액 샘플을 각각 채취 하였다. 사료급여는 국립축산과학원 낙농과 젖소 사양관리 규정에 준하여 젖소가 섬유질배합사료(TMR)를 자유채식 하도록 하였다 (Table 1).

### 2. 미생물 다양성 군집 분석

채취한 저지중 반추위액 샘플을 PowerMax Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Inc., CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출한 후 PicoGreen(Turner BioSystems, Inc., CA, USA)과 Nanodrop spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., DE, USA)를 이용하여 260/280 nm와 260/230 nm 흡광도 값을 측정하였다. DNA를 정량분석하고 MiSeq™ platform (Illumina, CA, USA)을 이용한 16S rRNA 분석을 마크로젠(Macrogen Inc., Seoul, Korea)에 의뢰하여 실시하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 전분 분해균 변화

반추위 내 전분 및 탄수화물 분해균에 속하는 박테리아 군은 *Streptococcus bovis*, *Bifidobacterium* spp., *Butyrivibrio* spp., *Ruminococcus bromii* 및 *Lactobacillus* sp 등이 있다(Xia et al., 2015; Pitta et al., 2016). Figure 1에서 보는 바와 같이 저지중 젖소의 반추위액 내 전분 분해균들의 Heat-map 분석 결과에서는 *Ruminococcus bromii*가 고창증으로 인해 폐사한 젖소에서 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다. Figure 2에서는 특이적 차이를 보인 *Ruminococcus bromii*이외의 대표적인 전분 분해균인 *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium merycicum* 그리고 *Butyrivibrio fibrisolvens*의 정상우와 고창증으로 폐사한 젖소간의 정량 분석 결과를 보여주고 있다 (Figure 2). 특

Table 1. Ingredients of the total mixed diet

Item	Diet
Ingredients, kg	
Concentrate	9.0
Soybean meal	1.0
Corn silage	23.0
Hay	4.0
Alfalfa	3.5
Timothy	3.0
Vitamin and minerals	0.3
Total	43.8

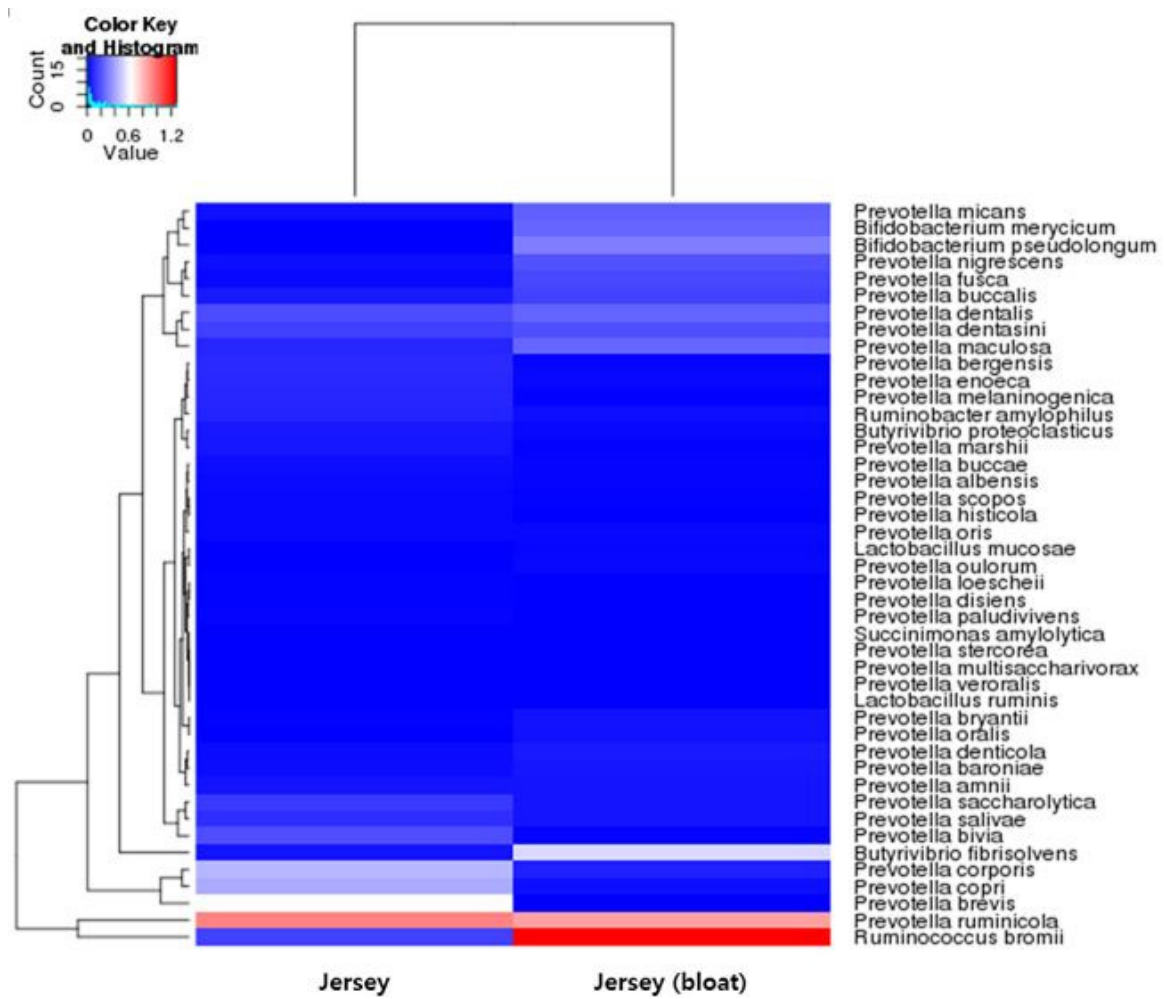


Figure 1. The heat map analysis of starch - digesting bacteria in the rumen by the metabolic disorder in Jersey cow.

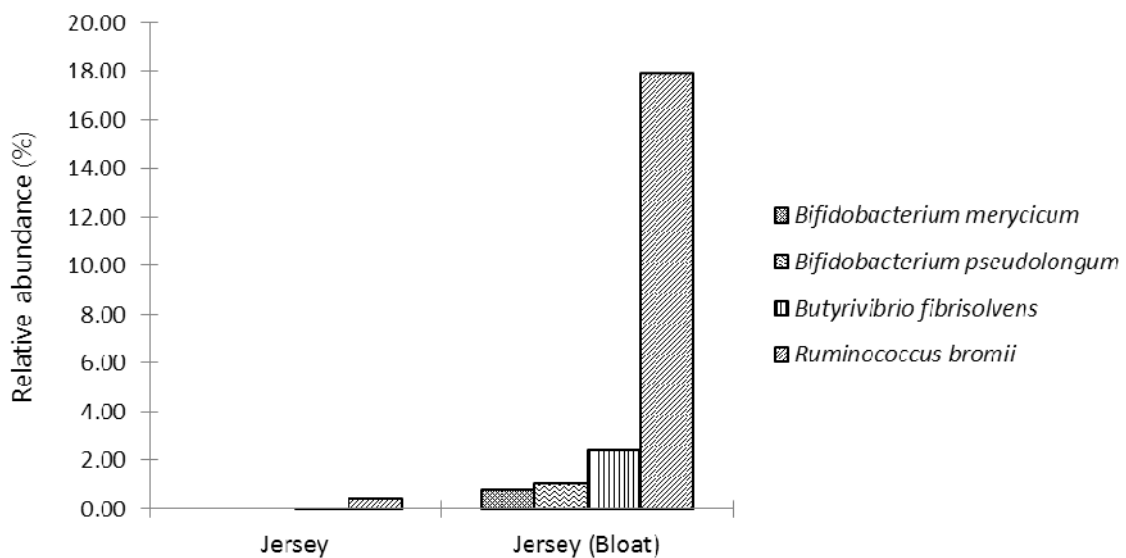


Figure 2. The relative abundance of major starch - digesting bacteria by the metabolic disorder in Jersey cow.

히, Figure 2에서 보는 바와 같이 정상우에서는 *R. bromii* 0.48%, *B. pseudolongum* 0%, *B. merycicum* 0% 그리고 *B. fibrisolvans* 0.13%의 전분 분해균이 차지한 반면 고창증으로 인해 폐사한 저지종 젖소에서는 *R. bromii* 17.93%, *B. pseudolongum* 1.08%, *B. merycicum* 0.81% 그리고 *B. fibrisolvans* 2.46%로서 폐사축에서 전분 분해균 균종의 비율이 훨씬 높은 것을 알 수 있었다. 특히, 전분 분해균의 대표적인 *R. bromii*는 정상우 보다 폐사축의 반추위 내 에서 약 36배나 높은 비율을 차지하고 있는 것으로 나타났다. Table 1에서는 저지종 젖소에 급여 했던 TMR 사료의 주원료 배합비를 보여준다. 두당 43.8kg 급여량 가운데 잠재적으로 고창증을 유발할 수 있는 원료들은 농후사료 9kg, 대두박 1kg, 옥수수 사일리지 23kg 그리고 알팔파 3.5kg로서 총 섭취량의 83%에 달한다. 단백질 원료를 제외하고 전분질 사료인 농후사료 및 옥수수 사일리지 비율만 따져도 총 섭취량의 73%이다. 따라서 폐사우의 경우 사료 골라먹기 등 이상섭취로 인해 반추위 내 균종의 급작스런 변화로 고창증이 발생한 것으로 판단된다. 이는 Majak 등(2003) 연구에서 유리가스 고창증은 반추동물이 과도한 곡물을 섭취했을 때 반추위 내 과산증을 유발되고 반추위 운동을 저하시켜 발생한다고 주장한 결과와 일치한다. 본 연구에서 대표적인 전분분해균인 *R. bromii*는 폐사우에서 17.93%로 *B. pseudolongum* 1.08%, *B. merycicum* 0.81% 및 *B. fibrisolvans* 2.46%와 비교 하였을 때 전분 분해균 중에서도 우점 하였다. 정상우에서도 *R. bromii*는 0.48%, *B. pseudolongum*과 *B. merycicum*의 0% 및 *B. fibrisolvans* 0.13%로서 전분 분해균 중 *B. pseudolongum*, *B. merycicum*은 정상우에서 존재하지 않으며 *R. bromii*가 *B.*

*fibrisolvans*에 비해 약 4배 많았다. Ze 등(2012)의 연구결과에서 보면, *R. bromii*가 다른 전분 분해균보다 분해력이 뛰어난 뿐만 아니라, 다른 전분 분해균의 분해 능력을 강화시켰다. 본 연구에서도 고창증 유발 원인으로 추정하고 있는 *R. bromii*의 우점 균종변화 결과가 기존 연구와 비슷한 결과를 보여준다.

## 2. 섬유소 분해균 변화

*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* 및 *Ruminococcus flavefaciens* 등의 균은 반추위 내 대표적인 섬유소 분해균이다(Koike and Kobayashi, 2001). Figure 3에서 보듯 정상우에서 *R. albus* 0.68%, *R. flavefaciens* 1.61% 그리고 *F. succinogenes* 1.7%로 차지하고 있는 반면, 폐사우에서는 *R. albus* 0.26%, *R. flavefaciens* 0.06% 그리고 *F. succinogenes* 0%로 정상우에서 약 12배정도 우점하는 것으로 보이고 있다. 이전 연구에서 *F. succinogenes*은 pH 6.1~6.9의 범위 안에서 정상적인 성장이 가능하다고 보고하였고(Weimer, 1993), *R. albus*는 pH 6.0에서 *R. flavefaciens*는 pH 6.2정도에서 성장을 멈춘 것으로 관찰되었다(Russell and Dombrowski, 1980). 따라서 정상우에 비해 폐사우에서 섬유소 분해균의 균종 군집이 낮은 것은 폐사우의 반추위 내 pH가 6.0이하로 떨어졌을 것으로 판단된다. 또한 폐사우에서 *R. albus*의 군집이 가장 높은 것은 pH 저항성이 *R. flavefaciens*와 *F. succinogenes*보다 크기 때문이며, Weimer (1993)의 연구에 따르면 *R. flavefaciens*와 *F. succinogenes*의 발효특성이나 성장환경이 비슷하여 두 균이 같은 환경에서 클 경우 서로 성장을 방해하여 균종의 수가

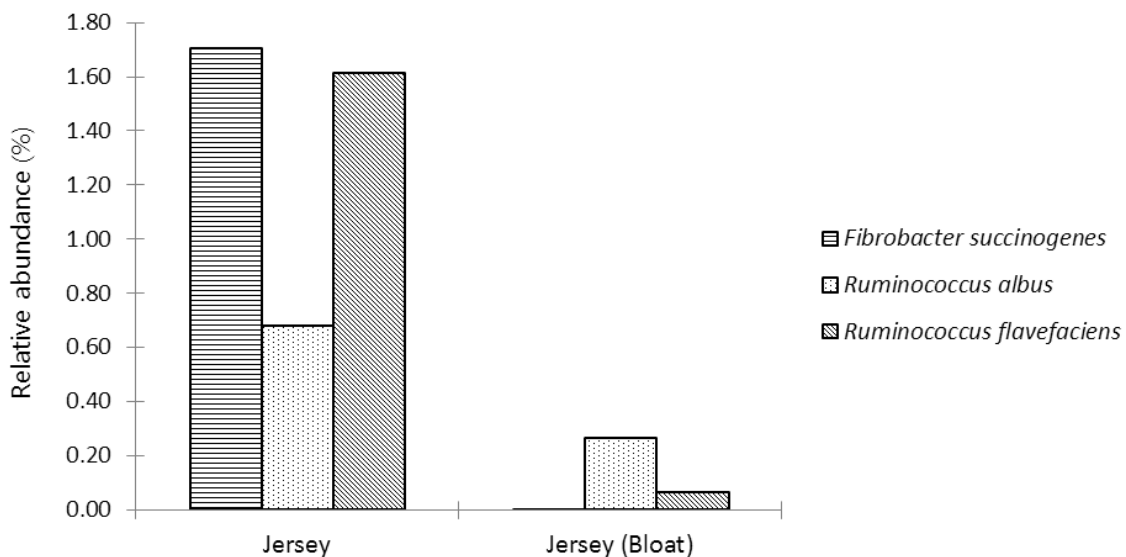


Figure 3. The relative abundance of cellulolytic bacteria by the metabolic disorder in Jersey cow.

감소한다고 보고하였다. 반면 정상우에서 *R. albus*의 수가 가장 적고, *R. flavofaciens*와 *F. succinogenes*의 수치가 비슷한 이유는 반추위 내 적정 pH를 유지하고 섬유소가 풍부해 섬유소 분해균이 성장하기 좋은 환경 때문인 것으로 판단된다.

### 3. 미생물 균총 변화

Figure 4에서 보듯이 정상우에서 Bacteroidetes는 33.4%, Firmicutes는 39.6%, 폐사우에서도 Bacteroidetes는 24.9%, Firmicutes는 55.1%를 각각 차지하고 있으며 Firmicutes 우점 비율은 정상우보다 폐사우에서 높았다. 본 실험결과와 반대로 Pitta 등(2010)의 연구에서 젓소에게 고창증을 유발하는 추파소맥을 급여하였을 때 Bacteroidetes는 증가하였고, Firmicutes는 감소 하였다. 또한 Grilli 등(2016)의 실험에서 염소에게 알팔파 생초를 급여하였을 때 Bacteroidetes가 증가하였으며, 염소는 고창증이 발생하였다. 그러나 Pitta 등(2016)의 실험에서 추파소맥을 급여하였을 때 본 실험과 동일하게 반추위에서 Bacteroidetes는 감소하였고, Firmicutes는 증가하였다. 따라서 Pitta 등(2016)의 연구에서는 미생물 균총의 단순한 변화가 고창증 발병의 원인이 아닌 것으로 보고하였고 본 실험의 결과가 이를 뒷받침한다. 또한 Pitta 등(2016)의 연구에서는 미생물에 의한 생물막 생성을 가속화 시키는 특정 미생물이 고창증의 주요 원인이라 보고 있으며, Grilli 등(2016) 실험에서도 고창증은 Bacteroidetes 속의 알려지지 않은 특정한 박테리아균이 일으킨다고 추정하였다. 따라서 본 연구에서는 *R. bromii*, *B. pseudolongum*, *B. merycicum* 및 *B.*

*fibrisolvens* 등의 전분 분해균 뿐만 아니라 폐사우 반추위 Bacteroidetes에 속하는 알려지지 않는 미생물이 고창증 발병에 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

결론적으로 과다한 농후사료 섭취로 인해 반추위 내 미생물의 균총 변화 가운데 특정 전분 분해균의 급격한 증식이 반추위 내 pH를 저하시키고, 반추위 내 가스를 과다하게 생성하여 고창증 발병으로 인한 폐사와 밀접한 연관성이 있을 것으로 판단된다.

## IV. 요약

본 연구는 고창증 발병으로 폐사된 저지종 젓소의 반추위액과 캐놀라가 장착한 저지종 젓소의 반추위액을 샘플링하여 반추위 내 미생물 균총의 급작스런 변화에 따른 반추위 발효와 고창증 발병간에 연관성을 알아보려고 진행되었다. 채취한 반추위액 샘플은 PowerMax Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Inc., CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출한 후 PicoGreen (Turner BioSystems, Inc., CA, USA)과 Nanodrop spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., DE, USA)를 이용하여 260/280 nm와 260/230 nm 흡광도 값을 측정하였다. DNA를 정량분석하고 MiSeq™ platform (Illumina, CA, USA)을 이용한 장내 미생물 균총의 다양성 분석을 마크로젠(Macrogen Inc., Seoul)에 의뢰하여 실시하였다. 반추위액 내 미생물 균총 분석 결과, 전분 분해균의 경우 고창증 발병으로 인한 폐사우의 반추위 내에서 *R. bromii*가 우점 하였으며, *R. bromii*,

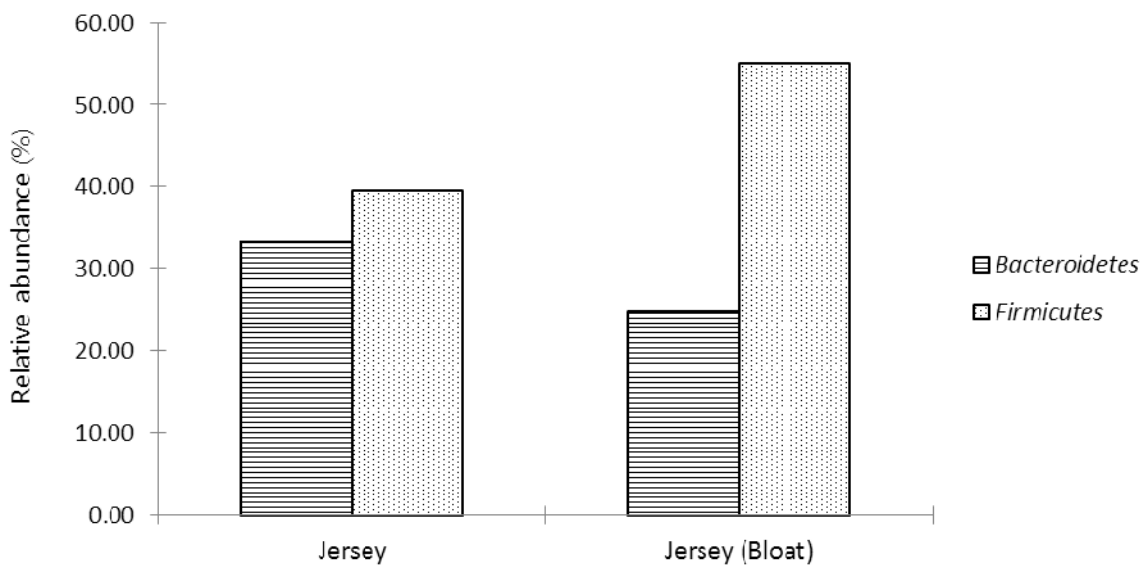


Figure 4. The relative abundance of bacteria (phylum) by the metabolic disorder in Jersey cow.

*B. pseudolongum*, *B. merycicum* 및 *B. fibrisolvans* 등과 같은 전분 분해균들이 정상우 대비 36배 높았다. 반면 반추위 발효와 밀접한 관련이 있는 *F. succinogenes*, *R. albus* 및 *R. flavefaciens* 등과 같은 대표적인 섬유소 분해균 비율은 정상우에서 고창증 발병으로 인한 폐사우 대비 12배 높았다. 이와 같은 결과를 볼 때, 반추위 내 균총 가운데 *R. bromii*, *B. pseudolongum*, *B. merycicum* 및 *B. fibrisolvans* 등과 같은 전분 분해균들의 급격한 증가가 반추위 내 pH 저하 및 가스 생성 증가를 초래했고 이는 저지중 질소의 고창증 발병으로 인한 폐사와 밀접한 연관이 있었을 것으로 판단된다.

## V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01269701-젖소의 대사변화와 장내 미생물 발효 및 유생산성간의 상관관계 구명)의 지원에 의해 이루어진 것임

본 연구는 2018년도 농촌진흥청 축산과학원 전문연구원 과정(김언태) 지원사업에 의해 이루어진 것임

## VI. REFERENCES

- Cheng, K.J., McAllister, T.A., Popp, J.D., Hristov, A.N., Mir, Z., and Shin, H.T. 1998. A review of bloat in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 76: 299-308.
- Grilli, D.J., Mrázek, J., Fliegerová, K., Kopečný, J., Lama, S.P., Cucchi, M.E.C., Sosa, M. A., and Arenas, G. N. 2016. Ruminant bacterial community changes during adaptation of goats to fresh alfalfa forage. *Livestock Science*. 191:191-195.
- Hironaka, R., Miltimore, J.E., McArthur, J.M., McGregor, D.R., and Smith, E.S. 1973. Influence of particle size of concentrate on rumen conditions associated with feedlot bloat. *Canadian Journal of Animal Science*. 531:75-80.
- Howarth, R.E., Cheng, K.J., Majak, W., and Costerton, J.W. 1986. Ruminant bloat. In *Proceedings of 6th International Symposium on Ruminant Physiology*, Banff (Canada). pp.10-14.
- Koike, S., and Kobayashi, Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS microbiology letters*. 204:361-366.
- Majak, W., McAllister, T.A., McCartney, D., Stanford, K., and Cheng, K.J. 2003. Bloat in cattle. Alberta Agriculture Food and Rural Development Information Packaging Centre: Edmonton, Canada. pp. 1-24.
- Min, B.R., Pinchak, W.E., Anderson, R.C., Fulford, J.D., and Puchala, R. 2006. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal of Animal Science*. 84:2546-2554.
- Pitta, D.W., Pinchak, W.E., Dowd, S.E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., and Wickersham, T.A. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microbial Ecology*. 59:511-522.
- Pitta, D.W., Pinchak, W.E., Dowd, S., Dorton, K., Yoon, I., Min, B.R., Fulford, J.D., Wickersham, T.A., and Malinowski, D.P. 2014. Longitudinal shifts in bacterial diversity and fermentation pattern in the rumen of steers grazing wheat pasture. *Anaerobe*. 30:11-17.
- Pitta, D.W., Pinchak, W.E., Indugu, N., Vecchiarelli, B., Sinha, R., and Fulford, J.D. 2016. Metagenomic analysis of the rumen microbiome of steers with wheat-induced frothy bloat. *Frontiers in Microbiology*. 7(689), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00689>.
- Russell, J.B., and Dombrowski, D.B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 39:604-610.
- Sreedhar, S., and Sreenivas, D. 2015. A study on calf mortality and managerial practices in commercial dairy farms. *Livestock research international*. 3:94-98.
- Waldner, C.L., Kennedy, R.I., Rosengren, L., and Clark, E.G. 2009. A field study of culling and mortality in beef cows from western Canada. *The Canadian Veterinary Journal*. 50:491-499.
- Wang, Y., Majak, W., and McAllister, T.A. 2012. Frothy bloat in ruminants: cause, occurrence, and mitigation strategies. *Animal Feed Science and Technology*. 172:103-114.
- Weimer, P.J. 1993. Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose-fed continuous culture. *Archives of Microbiology*. 160:288-294.
- Xia, Y., Kong, Y., Seviour, R., Yang, H.E., Forster, R., Vasanthan, T., and McAllister, T. 2015. In situ identification and quantification of starch-hydrolyzing bacteria attached to barley and corn grain in the rumen of cows fed barley-based diets. *FEMS Microbiology Ecology*. 91: fiv077, doi:10.1093/femsec/fiv077
- Ze, X., Duncan, S.H., Louis, P., and Flint, H.J. 2012. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *The ISME Journal*. 6:1535-1543.

(Received : March 27, 2018 | Revised : June 20, 2018 | Accepted : June 21, 2018)