

Research Article

고온 스트레스 영향에 따른 홀스타인종 젖소의 반추위내 미생물 군총 변화

김동현^{1,a}, 김명후^{2,a}, 김상범³, 하승민¹, 손준규¹, 이지환¹, 허태영¹, 이재영¹,
박지후¹, 최희철¹, 이현정¹, 박범영¹, 기광석¹, 김언태^{1,*}
¹국립축산과학원, ²부산대학교 동물생명자원학과, ³농촌진흥청

Effects of Heat-stress on Rumen Bacterial Diversity and Composition of Holstein Cows

Dong Hyeon Kim^{1,a}, Myung Hoo Kim^{2,a}, Sang Bum Kim³, Seung Min Ha¹, Jun Kyu Son¹,
Ji Hwan Lee¹, Tai Young Hur¹, Jae Yeong Lee¹, Ji Hoo Park¹, Hee Chul Choi¹, Hyun Jeong Lee¹,
Beom Young Park¹, Kwang Seok Ki¹ and Eun Tae Kim^{1,*}

¹National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Cheonan 31000, Korea

²Department of Animal Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

³Rural Development Administration, Jeonju 54875, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect of heat-stressed environment on rumen microbial diversity in Holstein cows. Rectal temperature and respiration rate were measured and rumen fluid was collected under normal environment (NE; Temperature humidity index (THI)=64.6) and heat-stressed environment (HE; THI=87.2) from 10 Holstein cows (60±17.7 months, 717±64.4 kg) fed on the basis of dairy feeding management in National Institute of Animal Science. The rumen bacteria diversity was analyzed by using the Illumina HiSeq™ 4000 platform. The rectal temperature and respiratory rate were increased by 1.5°C and 53 breaths/min in HE compared to that in NE, respectively. In this study, HE exposure induced significant changes of ruminal microbe. At phylum level, *Fibrobacteres* were increased in HE. At genus level, *Ruminococcaceae bacterium* P7 and YAD3003, *Butyrivibrio* sp. AE2032, *Erysipelotrichaceae bacterium* NK3D112, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Lachnospiraceae bacterium* FE2018, XBB2008, and AC2029, *Eubacterium celulosolvens*, *Clostridium hathewayi*, and *Butyrivibrio hungatei* were decreased in HE, while *Choristoneura murinana nucleopolyhedrovirus*, *Calothrix parasitica*, *Nostoc* sp. KVJ20, *Anabaena* sp. ATCC 33047, *Fibrobacter* sp. UWB13 and sp. UWB5, *Lachnospiraceae bacterium* G41, and *Xanthomonas arboricola* were increased in HE. In conclusion, HE might have an effect to change the rumen microbial community in Holstein cows.

(Key words: Heat-stressed environment, Microbial diversity, Holstein cows)

I. 서론

전 세계 온실가스 배출량이 지속적으로 증가함에 따라 미래에는 기온 상승을 중심으로 한 기후변화가 예상된다. 국내 기온도 지난 30년간(1981~2010년) 1.2°C 상승하였으며, 고온 다습한 기후 특성으로 변화하고 있는 추세이다(Joo et al., 2009). 젖소의 생산성은 주변온도, 습도, 바람 및 일조량 등의 환경변화에 따라 민감하게 변화하며, 국내 사육중인 젖소는 대부분 홀스타인 종으로 고온 스트레스에 취약하다고 알려져 있다(Armstrong, 1994; Nguyen et al., 2016). 젖소가 고온 스트레스에 노출되면 사료섭취량, 산유량, 유질,

수태율 등 생산성 저하로 이어지므로(Hansen, 2007; Hammami et al., 2013; Nguyen et al., 2016), 앞으로 낙농산업에 기후변화로 인한 고온 스트레스가 미칠 부정적인 영향들에 대한 해결할 방안을 모색해야 할 것으로 보인다. 반추위내 미생물은 반추동물이 필요로 하는 에너지 요구량의 70~80%를 공급한다(Nocek and Russell, 1988). 착유우의 경우, 반추위내 미생물은 영양대사 측면에서 휘발성 지방산 생산, 비타민 B 및 미생물체단백질 합성에 중요한 역할을 담당하며, 이는 궁극적으로 젖소의 건강과 효율적인 우유 생산에 결정적인 역할을 한다(Nocek and Russell, 1988). 반추위내 미생물 군집 구성은 출생 후 성장을 하면서 빠

^aThese authors contributed equally to this study.

*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(E. T. Kim)

르게 변화하며(McCann et al., 2014) 사료(Golder et al., 2014), 사육환경(Jami et al., 2013), 섭취행동(Prendiville et al., 2010)과 유전적 요인(Weimer et al., 2010)에 의해 변화됨이 알려져 있다. 또한, 여러 연구들을 통해 반추위내 미생물 군집 구성 차이는 사료 효율(Hernandez-Sanabria et al., 2012), 유생산량 및 유 성분(Jami et al., 2014, Lima et al., 2015)과 상관 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 하지만 미생물 군집 변화에 대한 유전적 요인을 포함한 반추위내 미생물 군집 구성과 상대적 함량에 대한 자료는 제한적이다. 특히 고온 스트레스와 같은 환경적인 요인 변화로 인한 반추위 미생물 균총 변화에 대한 정보는 젖소의 고온기 적응성과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각됨에 따라 많은 연구들이 진행되고 있다.

따라서, 본 연구는 고온 환경에서의 홀스타인종의 젖소 반추위내 미생물 군집 구성 변화를 분석하고, 반추위내 미생물과 고온 스트레스의 연관성을 알아보하고자 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물, 사료 및 실험설계

본 실험에 이용된 동물은 동물보호법과 국립축산과학원 동물 실험윤리위원회에서 검토 승인한 동물실험 방법에 따라 진행되었다. 홀스타인종 젖소 10두(60±17.7개월령, 체중717±64.4kg)를 선발하여 시험에 이용하였다. 급여사료는 한국가축사양표준(2017)의 영양소 요구량에 따라 국립축산과학원 낙농과에서 조사료와 농후사료를 40:60의 비율로 섬유질배합사료(TMR, Total mixed ration)를 제조하였으며, 공시동물이 자유채식 하도록 하였다. 반추위 미생물 분석을 위한 반추위액 시료 채취는 오후 사료 급여 전에 채취하였으며, 온습도지수(THI, temperature Humidity Index)를 고려하여 적온기(대조구: 5월 초)와 고온기(처리구: 7월 말)의 두 시점에 진행하였다. 시료 샘플링 당시 온도와 상대습도는 적온기는 19.6°C와 47.8%rH (relative humidity) 였으며, 고온기는 35.4°C와 58.8%rH였다.

2. 고온 스트레스 영향 수준 측정

고온 스트레스 영향 수준 측정을 위해 젖소 사육환경 온도 및 상대습도 그리고 젖소의 직장온도 및 호흡수를 수집하였다. THI 측정을 위해 우사에 설치한 온습도계(testo 174H, Testo Korea Ltd., Republic of Korea)를 이용하였으며, 젖소의 직장온도 및 호흡수는 13시-14시에 측정하였다. 젖소가 열 스트레스 영향을 받는 수준은 다음과 같은 THI 산출식(Bohmanova et al., 2007; NRC, 1971)을 이용하였다.

$$THI=(1.8\times\text{온도}+32)-[(0.55-0.0055\times\text{상대습도})\times(1.8\times\text{온도}-26)]$$

직장온도는 표준 디지털 온도계(KD-133, Polygreen Co., Ltd., Germany)를 사용하여 측정하였으며, 호흡수는 10초동안 뒷 갈비와 요각 사이의 움직임을 측정하고, 6을 곱하여 분당 호흡수를 측정하였다.

3. 반추위내 미생물 균총 분석

고온 스트레스에 따른 반추위내 미생물 군집 구성 분석을 위해 반추위액을 수집하였다. 반추위액은 젖소의 경구에 stomach tube를 주입하여 채취하였으며, 반추위액 내 미생물 균총 분석을 위해 분석 시까지 -80°C 초저온냉장고에 보관하였다. 반추위 미생물 균총 분석을 위한 DNA 추출은 PowerSoil® DNA Isolation Kit (Cat. No. 12888, MO BIO)를 이용하였으며, 추출된 DNA는 TruSeq nano DNA library prep guide (Illumina)에 따라 정량화 후 LE220 Focused-ultrasonicator (Covaris, Inc.)를 사용하여 DNA 라이브러리를 구축하였다. 그 후, DNA 라이브러리를 농축 및 정제시키고 HiSeq™ 4000 platform (Illumina, San Diego, USA)을 이용해 염기서열을 분석 하였다(Macrogen Inc., Seoul, Korea).

4. 반추위 미생물의 분류학적 구성 및 LEfSe 분석

염기서열 분석이 완료된 후 품질 평가를 위해 FastQC (FastQC; ver. 0.11.8)를 통해 Q score가 20이상인 부분을 사용하였으며, 분석의 정확성 향상을 위하여 KneadData (KneadData; The Huttenhower Lab)를 이용하여 host 서열 및 adapter 서열을 제거한 후 데이터 분석을 수행하였다. 이렇게 얻어진 DNA 판독 값을 Centrifuge 방법(Kim et al., 2016)과 NCBI 데이터 베이스를 이용하여 각 샘플의 DNA 판독 값들을 분류하였다. Phylum level에서부터 genus level까지 고온 스트레스 영향에 따른 미생물 균총 변화를 탐색하기 위해 Kruskal-Wallis (KW) sum-rank test에 기초하여, 선형 판별 분석 효과 크기(Linear discriminant analysis Effect Size, LEfSe) 방법(Segata et al., 2011)을 사용하여 차별적으로 특정 시점에 증감한 미생물 군의 특성을 분석하였다. 이 분석을 위해 KW 테스트의 중요도 임계 값은 0.05로 설정되었고 대수 선형 판별 분석 점수(LDA, Linear discriminant analysis) 2.0이상으로 설정되었다.

III. 결과 및 고찰

1. 고온 스트레스에 따른 직장온도와 호흡수 변화

젖소의 직장온도 및 호흡수 비교를 위한 측정된 당일의 THI는 Table 1과 같다. 고온스트레스 영향을 나타내는 THI는 기온이 상승하는 고온기인 7월이 적온기인 5월 보다 높게 나타났다(87.2 vs. 64.6). 일반적으로 THI가 72미만이면 고온 스트레스 영향이 없는 쾌적한 상태라고 하고 72이상이면 소들이 고온 스트레스를 느끼기 시작한다. THI가 72-77 구간은 스트레스가 약한 정도이고 78-88은 강한 정도, 89-96은 심각한 경우이며, 97이상은 폐사를 일으킬 수 있다(Akyuz et al., 2010). 시료 채취 당일로부터 앞뒤로 10일간의 THI 지수는 적온기에는 64-69의 범위에 있었으며, 고온기에는 75-88 범위 내에 있었으므로(data not shown) 7월 중 시료 채취 시기에는 젖소들이 고온 스트레스 환경에 노출되었다. 홀스타인종의 직장온도 정상 범위는 $38.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Radostits et al., 2006) 또는 $38.7 \pm 0.8^\circ\text{C}$ (Wenz et al., 2011)로 알려져 있다. THI 증가는 젖소의 직장온도 상승으로 이어지는데 THI가 60-76 사이일 때, 직장온도가 $38.6\text{-}38.8^\circ\text{C}$ 도 수준이며, 열 스트레스 상황인 THI가 71.8-89.4 사이일 때는 $39.0\text{-}39.1^\circ\text{C}$ 의 수준을 나타낸다(Igono et al., 1985; Kabuga, 1992). 이전 연구결과와 마찬가지로, 본 연구결과도 고온기 THI 상승으로 인해 호흡수(44.4 vs. 98.4 회/분, $p<0.05$)와 직장온도(38.3 vs. 39.8°C , $p<0.05$)가 유의적으로 상승하였다(Table 1). 호흡수는 열 스트레스에 대한 생리적 반응의 가장 좋은 지표로 알려져 있으며(Habeeb et al., 2018) 지속적으로 증가된 호흡수는 신체 근육활동으로 인한 신체 열 생성을 증가시킬 수 있다(McDowell, 1972).

2. 염기서열 분석 결과 및 환경온도에 따른 미생물 균종의 변화

반추위 미생물은 반추 동물의 대사에서 중요한 역할을 한다(Guarner, 2006). 따라서 반추위 미생물의 균종 조성과 함량은 반추위 발효대사와 숙주의 건강상태를 예측하고 이해하는데 필수적이다(Guarner, 2006; Malmuthuge and Guan, 2017). 본 연

구를 통해 다른 사육환경에서 반추위 미생물의 차이를 비교 분석하고자 하였다. 시험에 이용된 샷건 시퀀싱은 2세대 차세대염기서열분석 방법 중 하나로 긴 DNA를 제한 효소 처리하여 임의로 짧은 절편으로 잘라서 개별적으로 시퀀싱을 하는 방법이다. 방대한 양의 DNA 절편을 읽어낼 수 있으며, 동일한 염기서열이 길게 반복되는 동일 단위체가 생성될 경우에도 서열의 판독하는 정확성이 높다는 장점이 있다(Kou et al., 2016). 총 10마리의 홀스타인종 젖소 반추위액 샘플을 시퀀싱 한 결과, 평균 샘플 당 84.7 백만의 DNA가 판독되었으며, 분석의 편향을 줄이기 위해 순차 정렬 후 데이터 처리 기준에 따라 67.3 백만의 판독된 DNA 정보가 분석에 이용되었다. 적온과 고온의 사육환경에서 수집된 홀스타인종 젖소 반추위액의 모든 샘플에서 환경 변화에 관계없이 총 50 가지 미생물이 phylum level에서 확인되었다(Fig. 1). *Bacteroidetes*,

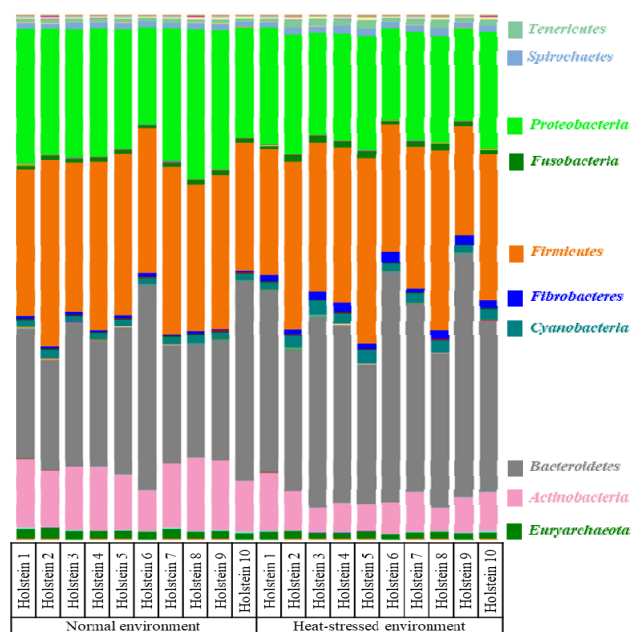


Fig. 1. Phylum level classification of the bacterial community composition from rumen fluid of Holstein cows collected in normal and heat-stressed environment.

Table 1. Effect of heat-stressed environment on temperature humidity index, respiration rate and rectal temperature in Holstein cow

Item ¹	Normal environment	Heat-stressed environment	SEM
THI	64.6	87.2	
Respiration rate, breaths/minute	44.4 ^b	98.4 ^a	13.33
Rectal temperature, °C	38.3 ^b	39.8 ^a	0.351

¹The stated Temperature-Humidity Index (THI) were measured on May and July, respectively.

^{a,b}Means within a row with different superscripts differ ($p<0.05$).

Firmicutes, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Euryarchaeota*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Fusobacteria* 및 *Fibrobacteres*로 구성되어 있었으며(Fig. 2), 상대적 함량을 가장 높게 차지하는 미생물은 *Firmicutes* (적온환경평균=29.6±3.12%; 고온환경평균=28.4± 3.98%), *Bacteroidetes* (적온환경평균=26.7±6.61%; 고온환경평균=34.5± 6.54%) 및 *Proteobacteria* (적온환경평균=24.2± 2.83%; 고온환경평균=20.6± 1.83%)의 순으로 나타났다. 다른 연구결과에서도 phylum level 미생물의 군집 구성은 본 연구결과와 유사하게 *Bacteroidetes*, *Firmicutes* 및 *Proteobacteria* 순으로 상대적 함량을 높게 차지하였다(Tajima et al., 2007; Nesengani et al., 2017). 많은 선행연구결과를 통해 반추위내 존재하는 대표적인 미생물들인 *Bacteroidetes* (51-66.9%), *Firmicutes*(25.7-41.6%), *Proteobacteria* (0.68-17.9%)의 상대적 함량을 차지하는 비율에는 차이가 있었으며(de Menezes et al., 2011; Jami and Mizrahi, 2012; Petri et al., 2013; Zhang et al., 2014), 이는 급여 사료의 구성에 따라 크게 영향을 받는다고 알려져 있다(Fernando et al., 2010; Thomas et al., 2017). 특히, de Menezes et al. (2011)의 연구에서는 TMR사료 급여 시, 반추위액 내에서는 *Firmicutes*의 상대적 함량이 증가하였고, 사료부착부분에서는 감소했다고 보고하였다. 또한 급여사료의 농후사료 비율이 증가하거나 과산증 증상이 있을 때에는 반추위내 미생물 조성에서 *Firmicutes*의 비율이 증가한다고 보고하였다(Mao et al., 2013). 이는 사료의 조성(농후사료 vs. 조사료)에 따른 반추위 발효 환경이 영향을 받을 수 있을 것이라 판단된다. 사육환경온도에 따른 phylum level 미생물 군집 조성 결과에서 *Bacteroidetes* (적온환경 평균=26.7± 6.61% vs. 고온환경 평균=34.5±6.54%)와 *Proteobacteria* (적온환경 평균=24.2±2.83% vs. 고온환경 평균=20.6± 1.83%)가 고온 스트레스 상황에서 각각 수치적으로 증가와 감소

를 하였다. 이는 Tajima et al. (2007) 연구에서 온도와 상대습도에 따라서 반추위 내 미생물 군집 구성이 변화한다는 보고와 일치한다. Tajima et al. (2007)은 real-time PCR을 사용하여, 상대습도 수준 80%와 환경 온도 조건 변화(20, 28 또는 33°C)에 따라 반추위 박테리아의 상대 정량을 비교 분석하였으며, 환경 온도가 증가함에 따라(20 vs. 28 또는 33°C) 반추위내 미생물 조성이 유의적으로 변화하며, *Bacteroidetes*과 *Firmicutes*의 상대적 함량이 각각 수치적으로 증가하고 감소한다고 보고했다. 또한 미생물 군집의 다양성 지수를 나타내는 Shannon index가 안정적으로 나타남에 따라서 환경변화가 특정 미생물 군집 조성에는 영향을 주지 않지만, 변화한 환경으로 인해 상대적 함량 비율에는 영향을 미친다고 주장하였다. *Firmicutes*의 함량 변화에 있어서는 본 연구결과와는 상이하나, 이는 급여 사료의 구성 및 조사료와 농후사료 비율(50:50 vs. 60:40)의 차이가 영향일 것으로 사료된다. Genus level 미생물에서도 앞서 주장한 내용과 일치함을 확인하였다. 총 3,500가지의 다양한 미생물 군집 조성이 확인되었으며 (Fig. 3), 미생물 군집 조성에는 변화가 없었으나, 각 미생물의 상대적 함량 비율에는 차이를 나타내었다. 또한 genus level 미생물의 상대적 함량을 높게 차지하는 미생물(상대적 함량 2% 이상) phylum level 미생물에서도 상대적으로 높은 함량을 가진 *Bacteroidetes* (*Prevotella*와 *Bacteroides*), *Firmicutes* (*Ruminococcus*, *Clostridium* 및 *Bacillus*) *Proteobacteria* (*Pseudomonas*)의 하위에 미생물들에 속해 있었다(*Actinobacteria*의 *Streptomyces* 제외). Phylum level 미생물에서부터 species level 미생물까지 고온 스트레스 영향을 받을 시 상대적함량이 차이 나는 미생물들을 분석하기 위해 LEfSe 방법을 이용하였다. 두 개 이상의 생물학적 조건 사이의 차이를 특징 짓는 유전자, 경로 또는 분류와 같은 계층 특징을 확인하기 위

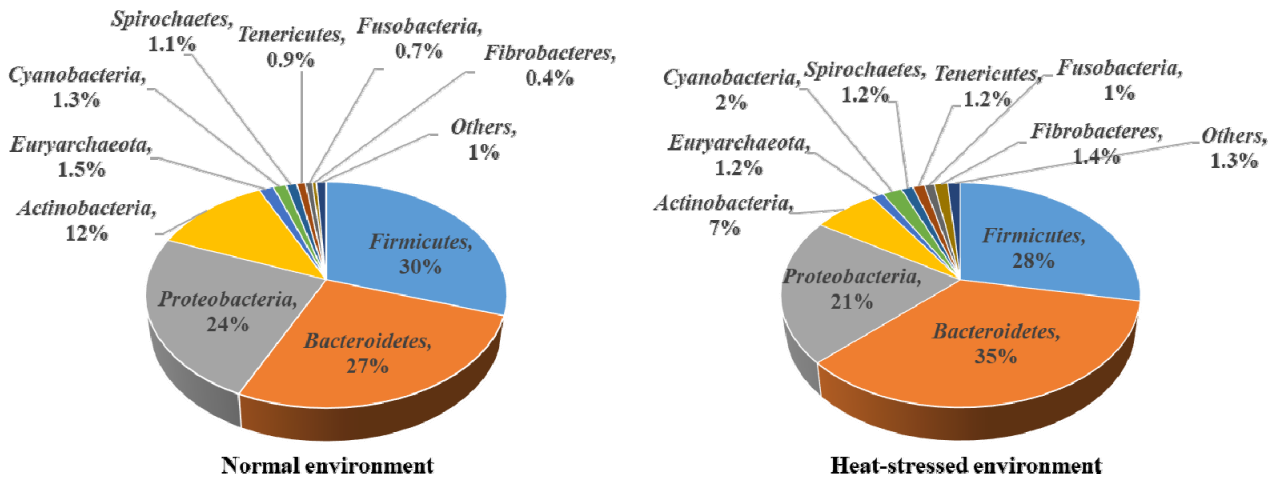


Fig. 2. Average relative abundance of the 10 predominant phyla from rumen fluid of Holstein cows collected in normal and heat-stressed environment.

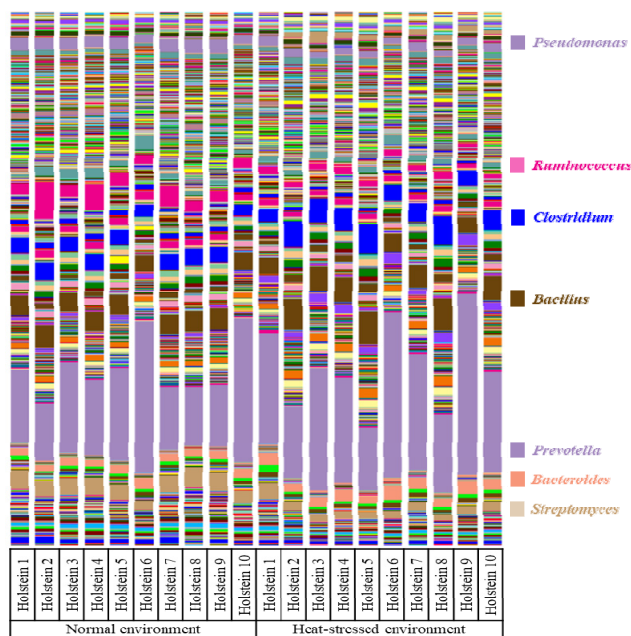


Fig. 3. Genus level classification of the bacterial community composition from rumen fluid of Holstein cows collected in normal and heat-stressed environment.

해 통계적 유의성, 생물학적 관련성 및 효과 크기를 결합하여 분석하였다(Segate et al., 2011). 적온과 고온 환경 사이의 반추위 내 차이를 나타내는 미생물로 27가지가 발견되었다(Fig. 5). 반추위 미생물 중 phylum level에서는 *Fibrobacteres*만 고온 스트레스 환경에서 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$), species level에서는 고온 환경에서 *Choristoneura murinana nucleopolyhedrovirus*, *parasitica*, *Nostoc* sp. KVJ20, *Anabaena* sp. ATCC33047, *Fibrobacter* sp. UWB13 and sp. UWB5, *Lachnospiraceae* bacterium G41, and *arboricola*

가 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 이와 반대로 고온 스트레스 환경에서 *Ruminococcaceae* bacterium P7 and YAD3003, *Butyrivibrio* sp. AE2032, *Erysipelotrichaceae* bacterium NK3D112, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Lachnospiraceae* bacterium FE2018, XBB2008, and AC2029, *Eubacterium celulosolvens*, *Clostridium hathewayi*, and *Butyrivibrio hungatei*가 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). LefSe 분석의 결과를 phylum level로 정리하면, 적온기에는 *Firmicutes*와 *Actinobacteria*와 같은 문 단계의 미생물이 상대적으로 많이 존재하였으며 고온 스트레스 환경하에서는 *Fibrobacteres*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, 및 *Caudovirales*와 같은 반추위 미생물들이 증가하는 것으로 나타났다. 일반적으로 *Firmicutes*와 *Actinobacteria*는 주로 그람 양성균으로 비구조탄수화물인 곡류사료를 대사적으로 처리할 때 증가하며, *Fibrobacteres*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* 및 *Caudovirales*는 주로 그람 음성균으로 발효성 구조탄수화물을 대사적으로 처리할 수 있는 박테리아 숫자의 증가시킨다(Bryant, 1959; Stewart et al., 1997). 특히, 고온에서는 발효성 구조탄수화물의 대사가 유리할 것으로 판단된다. 반추동물에서 탄수화물 대사는 반추위내 미생물을 통해 휘발성 지방산으로 전환되어, 미생물의 유지와 성장 및 반추동물이 필요로 하는 대사 에너지를 공급하여 숙주에게 영향을 미치지(맹, 1998), 어떠한 대사과정 또는 대사물질을 통해 환경변화에 따른 반추위내 미생물의 차이가 나타나는지는 추가적인 분석이 필요하다. 본 연구에서 결과에서 보여준 고온 스트레스에 반응한 반추위내 미생물 균총 변화는 젖소의 고온 스트레스 반응성과 밀접한 연관성이 있을 것으로 판단된다. 이러한 특정 반추위 미생물의 균총과 고온 스트레스간은 연관성 규명을 위해서는 고온 스트레스에 대응하여 변화된 특정 미생물들이 담당하는 대사작용과 관련된 미생물 기능성 기반의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

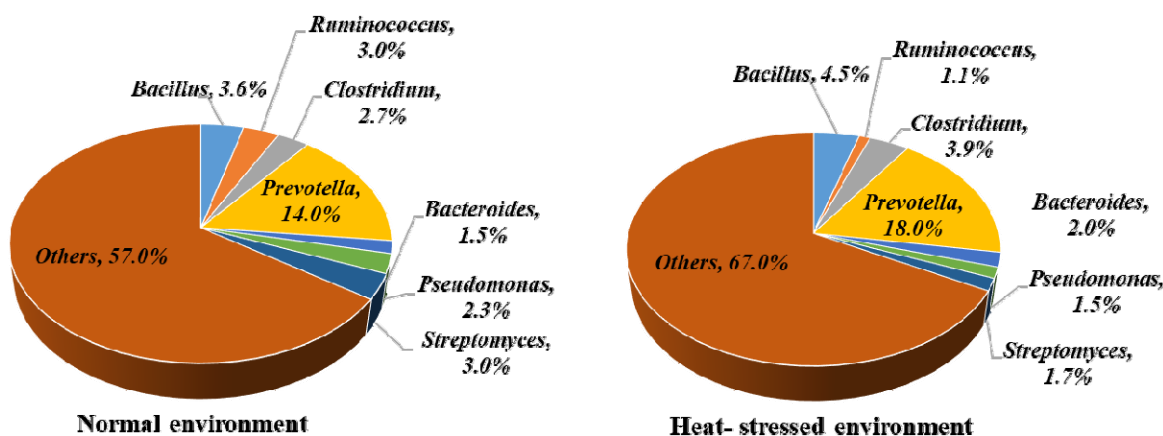


Fig. 4. Average relative abundance of the 7 predominant genera (abundance >2%) from rumen fluid of Holstein cows collected in normal and heat-stressed environment.

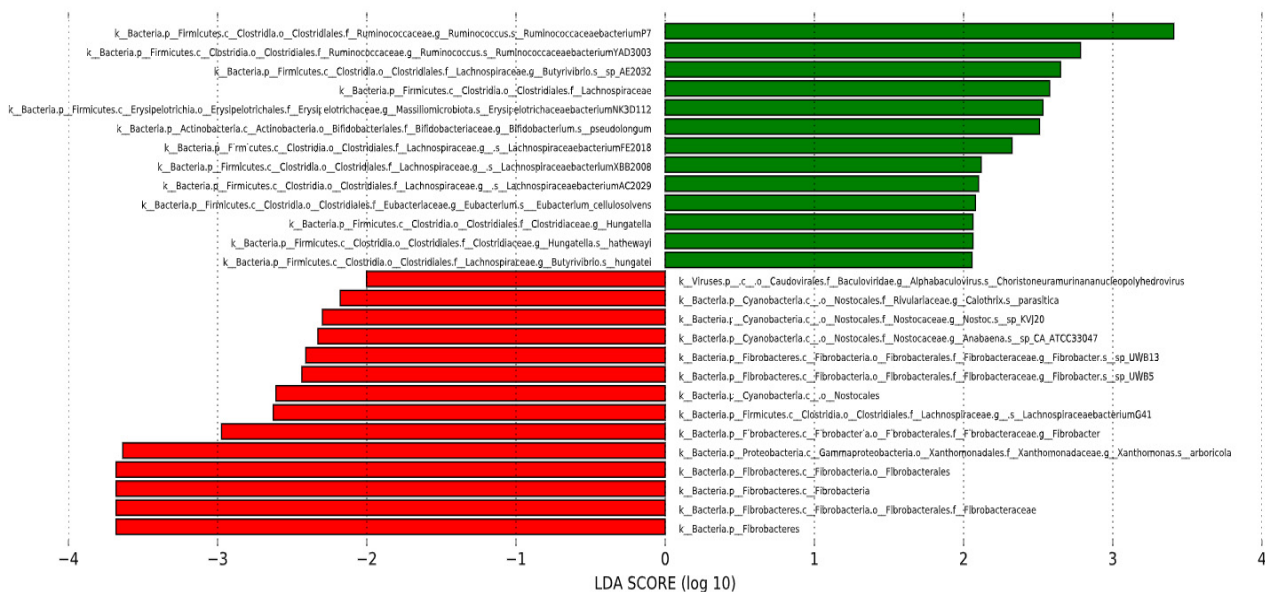


Fig. 5. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) of rumen bacteria community of Holstein cow. The linear discriminant analysis plot indicates the most differentially abundant taxa found by ranking according to their effect size (≥ 2.0). The taxa enriched from rumen fluid collected in normal environment are indicated with a positive score (green), and the taxa enriched from rumen fluid collected in heat-stressed environment with indicated with a negative score (red).

IV. 요약

본 연구는 고온기 여름철 사육환경에서의 홀스타인종 젖소의 반추위내 미생물 균총 변화를 분석하고, 반추위내 미생물과 고온 스트레스간의 연관성을 규명하고자 수행하였다. 국립축산과학원 낙농과에서 사육 중인 홀스타인 젖소 10두의 반추위액을 채취하였으며, 채취한 시료 샘플은 PowerSoil® DNA Isolation Kit (Cat. No. 12888, MO BIO)를 이용하여 DNA를 추출한 후 Illumina HiSeq™ platform (Illumina, CA, USA)을 이용하여 미생물 균총 분석을 실시하였다. 반추위액 내 미생물 균총을 분석한 결과, 사육환경 온습도에 따른 미생물 군집 구성에는 큰 차이는 없었으나, 미생물의 상대적 함량에는 차이가 있었다. LEfSe 분석을 통해 적온과 고온 환경에서 특정 미생물들의 상대적 조성이 유의적으로 증가함을 확인하였다. 이들 결과를 볼 때, 반추위내 미생물 균총은 고온과 같은 외부 환경변화에 영향을 받는 것으로 판단되어 젖소의 고온스트레스 반응에 있어 반추위 미생물 변화가 중요한 역할을 담당할 것으로 사료된다. 추후 연구는 이러한 차이를 나타내는 미생물들의 대사 경로나 대사 물질에 분석을 통해 환경변화와 미생물간의 연관성 및 이러한 미생물 균총 조절을 통한 고온기 젖소의 적응성 향상을 위한 미생물학적 전략 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 사사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ01344802, 저지종 장내 미생물 균총 특성 및 온실가스 저감 효과 구명)의 지원에 의해 이루어진 것임. 본 연구는 2019년도 농촌진흥청 축산과 학원 전문연구원 과정(김동현) 지원사업에 의해 이루어진 것임.

VI. REFERENCES

Akyuz, A., Boyaci, S. and Cayli, A. 2010. Determination of critical period for dairy cows using temperature humidity index. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9:1824-1827.

Armstrong, D.V. 1994. Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science*. 77:2044-2050.

Bohmanova, J., Misztal, I. and Cole, J.B. 2007. Temperature-Humidity Indices as Indicators of Milk Production Losses due to Heat Stress. *Journal of Dairy Science*. 90:1947-1956.

Bryant, M.P. 1959. Bacterial species of the rumen. *Bacteriological reviews*. 23:125.

de Menezes, A.B., Lewis, E., O'Donovan, M., O'Neill, B.F., Clipson, N. and Doyle, E.M. 2011. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiology Ecology*. 78:256-265.

FastQC, <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

- Fernando, S.C., Purvis, H.T., Najar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Krehbiel, C.R., Nagaraja, T.G., Roe, B.A. and DeSilva, U. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:7482-7490.
- Golder, H.M., Denman, S.E., McSweeney, C., Wales, W.J., Auld, M.J., Wright, M.M., Marett, L.C., Greenwood, J.S., Hannah, M.C., Celi, P., Bramley, E. and Lean, I.J. 2014. Effects of partial mixed rations and supplement amounts on milk production and composition, ruminal fermentation, bacterial communities, and ruminal acidosis. *Journal of Dairy Science*. 97:5763-5785.
- Guarner, F. 2006. Enteric flora in health and disease. *Digestion*. 73:5-12.
- Habeeb, A.A., Gad, A.E. and Atta, M.A. 2018. Temperature-humidity indices as indicators to heat stress of climatic conditions with relation to production and reproduction of farm animals. *International Journal of Biotechnology and Recent Advances*. 1:35-50.
- Hammami, H., Bormann, J., M'hamdi, N., Montaldo, H.H. and Gengler, N. 2013. Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment. *Journal of Dairy Science*. 96:1844-1855.
- Hansen, P.J. 2007. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*. 68:S242-S249.
- Hernandez-Sanabria, E., Goonewardene, L.A., Wang, Z., Durunna, O.N. and Moore, S.S. 2012. Impact of feed efficiency and diet on adaptive variations in the bacterial community in the rumen fluid of cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 78:1203-1214.
- Igono, M.O., Steevens, B.J., Shanklin, M.D., and Johnson, H.D. 1985. Spray cooling effects on milk production, milk, and rectal temperatures of cows during a moderate temperate summer season. *Journal of Dairy Science*. 68:979-985.
- Jami, E., and Mizrahi, I. 2012. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *Public Library of Science one*. 7:e33306.
- Jami, E., Israel, A., Kotser, A. and Mizrahi, I. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The International Society for Microbial Ecology Journal*. 7:1069.
- Jami, E., White, B.A. and Mizrahi, I. 2014. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *Public Library of Science One*. 9:e85423.
- Joo, Y.S., Jung, H.J. and Kim, B.J. 2009. Cluster analysis with Korean weather data: Application of model-based Bayesian clustering method. *Journal of the Korean Data and Information Science Society*. 20:57-64.
- Kabuga, J.D. 1992. The influence of thermal conditions on rectal temperature, respiration rate and pulse rate of lactating Holstein-Friesian cows in the humid tropics. *International Journal of Biometeorology*. 36:146-150.
- Kim, D., Song, L., Breitwieser, F.P. and Salzberg, S.L. 2016. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome research*. 26:1721-1729.
- KneadDATA, <http://huttenhower.sph.harvard.edu/kneaddata>
- Kou, R., Lam, H., Duan, H., Ye, L., Jongkam, N., Chen, W., Zhang S., and Li, S. 2016. Benefits and challenges with applying unique molecular identifiers in next generation sequencing to detect low frequency mutations. *Public Library of Science One*. 11:e0146638.
- Lima, F.S., Oikonomou, G., Lima, S.F., Bicalho, M.L., Ganda, E.K., de Oliveira Filho, J.C., Lorenzo, G., Trojancanec, P. and Bicalho, R.C. 2015. Parturition and postpartum rumen fluid microbiomes: Characterization and correlation with production traits in dairy cows. *Applied and Environmental Microbiology*. 81:1327-1337.
- Malmuthuge, N. and Guan, L.L. 2017. Understanding host-microbial interactions in rumen: Searching the best opportunity for microbiota manipulation. *Microbiome*. 8:8.
- Mao, S.Y., Zhang, R.Y., Wang, D.S. and Zhu, W.Y. 2013. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe*. 24:12-19.
- McCann, J.C., Wickersham, T.A., and Loor, J.J. 2014. High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*. 8:BBI-S15389.
- McDowell, R.E. 1972. Improvement of livestock production in warm climates. W. H. Freeman & Co., San Francisco.
- National Research Council. 1971. A guide to environmental research on animals. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Nesengani, L.T., Wang, J., Yang, Y., Yang, L. and Lu, W. 2017. Unravelling vaginal microbial genetic diversity and abundance between Holstein and Fleckvieh cattle. *Royal Society of Chemistry Advances*. 7:56137-56143.
- Nguyen, T.T., Bowman, P.J., Haile-Mariam, M., Pryce, J.E. and Hayes, B.J. 2016. Genomic selection for tolerance to heat stress in Australian dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 99:2849-2862.
- Nocek, J.E. and Russell, J.B. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science*. 71:2070-2107.
- Petri, R.M., Schwaiger, T., Penner, G.B., Beauchemin, K.A., Forster, R.J., McKinnon, J.J. and McAllister, T.A. 2013. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 79:3744-3755.
- Prendiville, R., Lewis, E., Pierce, K.M. and Buckley, F. 2010. Comparative grazing behavior of lactating Holstein-Friesian, Jersey, and Jersey x Holstein-Friesian dairy cows and its association with intake capacity and production efficiency. *Journal of Dairy Science*. 93:764-774.
- Radostits, O., Arundel, J. and Gay, C. 2006. *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9th Edition. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Health Sciences.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S.

- and Huttenhower, C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*. 12:R60.
- Stewart, C.S., Flint, H.J. and Bryant, M.P. 1997. The rumen bacteria. In the rumen microbial ecosystem. pp. 10-72. Springer. Dordrecht.
- Tajima, K., Nonaka, I., Higuchi, K., Takusari, N., Kurihara, M., Takenaka, A., Mitsumori, M., Kajikawa, H. and Aminov, R.I. 2007. Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers. *Anaerobe*. 13:57-64.
- Thomas, M., Webb, M., Ghimire, S., Blair, A., Olson, K., Fenske, G.J., Fonder, A.T., Christopher-Hennings, J., Brake, D. and Scaria, J. 2017. Metagenomic characterization of the effect of feed additives on the gut microbiome and antibiotic resistome of feedlot cattle. *Scientific Reports*. 7:12257.
- Weimer, P.J., Stevenson, D.M., Mantovani, H.C. and Man, S.L.C. 2010. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *Journal of Dairy Science*. 93:5902-5912.
- Wenz, J.R., Moore, D.A. and Kasimanickam, R. 2011. Factors associated with the rectal temperature of Holstein dairy cows during the first 10 days in milk. *Journal of Dairy Science*. 94:1864-1872.
- Zhang, R., Zhu, W., Zhu, W., Liu, J., and Mao, S. 2014. Effect of dietary forage sources on rumen microbiota, rumen fermentation and biogenic amines in dairy cows. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94:1886-1895.
- 맹원재. 1998. 신제 반추동물영양학. 반추위 미생물과 소화작용. 향문사. pp. 75.
- (Received : June 12, 2019 | Revised : November 4, 2019 | Accepted : November 21, 2019)