

Comparative Analysis of Gut Microbiota among Broiler Chickens, Pigs, and Cattle through Next-generation Sequencing

Ho Jin Jeong, Gwangsu Ha, Su-Jin Shin, Su-Ji Jeong, Myeong Seon Ryu, Hee-Jong Yang and Do-Youn Jeong*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Korea

Received September 16, 2021 / Revised December 8, 2021 / Accepted December 10, 2021

To analyze gut microbiota of livestock in Korea and compare taxonomic differences, we conducted 16S rRNA metagenomic analysis through next-generation sequencing. Fecal samples from broiler chickens, pigs, and cattle were collected from domestic feedlots randomly. α -diversity results showed that significant differences in estimated species richness estimates (Chao1 and ACE, Abundance-based coverage estimators) and species richness index (OUTs, Operational taxonomic units) were identified among the three groups. However, NPSannon, Shannon, and Simpson indices revealed that abundance and evenness of the species were statistically significant only for poultry (broiler chickens) and mammals (pigs and cattle). *Firmicutes* was the most predominant phylum in the three groups of fecal samples. Linear discriminant (LDA) effect size (LEfSe) analysis was conducted to reveal the ranking order of abundant taxa in each of the fecal samples. A size-effect over 2.0 on the logarithmic LDA score was used as a discriminative functional biomarker. As shown by the fecal analysis at the genus level, broiler chickens were characterized by the presence of *Weissella* and *Lactobacillus*, as well as pigs were characterized by the presence of *provetella* and cattle were characterized by the presence of *Acinetobacter*. A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) showed that differences of microbial clusters among three groups were significant at the confidence level. ($p=0.001$). This study provides basic data that could be useful in future research on microorganisms associated with performance growth, as well as in studies on the livestock gut microbiome to increase productivity in the domestic livestock industry.

Key words : Broiler chicken, cattle, gut microbiota, next generation sequencing, pig

서 론

경제협력개발기구(OECD, Organization of Economic Cooperation and Development)의 조사에 따르면 2020년 우리나라 국민 1인당 육류소비량(돼지고기, 닭고기, 소고기, 양고기)이 62.52 kg로 2015년 54.95 kg보다 13.78% 증가하였으며, 아시아 육류소비량 1위를 기록하였다고 보고되었다[17]. 육류의 소비량이 급증하면서 축산가는 수요량을 충족시키기 위해 1950년대 초부터 페니실린계의 benzylpenicillin, 테트라사이클린계의 Chlortetracycline, 아미노글리코시드계의 Sterptomycin 등의 많은 양의 항생제를 성장촉진 및 사료 효율 개선을 목적으로 가축의 사료에 첨가되어 긍정적인 요소로 사용되어왔다[1].

그러나 축산업의 발전을 위해 필수적으로 사용된 항생제의

오남용으로 항생물질에 대한 체내 내성균이 발생하여 특정 질병 감염 시 항생제의 저항성을 나타내고 심각한 병적인 상태를 유발할 수 있다는 부정적인 우려가 대두되면서 문제점으로 지적 받기 시작하였다[7]. 이러한 문제점을 해소하기 위해 스웨덴의 경우 1986년부터 성장촉진용 항생제 사용을 금지하였고, 유럽연합(EU, European Union)은 2006년부터 1월 1일부터 모든 성장촉진용 항생제 사용을 금지하였다. 우리나라도 항생제 사용 규제 강화와 더불어 무항생제 축산물 인증 정책의 추진에 따라 대책 마련을 위해 2004년부터 기존의 53종의 가용 항생제 품목을 단계적으로 감축하여 2005년에는 25종, 2009년에는 18종, 2011년 7월 1일부터는 생산성 증대를 위한 성장촉진용 항생제의 사용이 모두 금지되었다[28]. 최근 이와 같은 시대적 요구에 따라 축산물을 위생적이고 안전하게 생산하고 소비하기 위한 친환경축산물 개발을 위한 항생제 대체 후보 물질의 개발 및 효능연구가 지속 가능한 축산업을 위해 절실히 요구되고 있다.

항생제 사용이 금지된 이후, 생산성 증대를 위해 친환경 소재인 생균제(DFM, direct-fed microbials)가 항생제 대체제로서 주목받고 있으며, 현재 국내 축산업에서 필수적인 소재로 사용되고 있다[8]. 일반적인 상업용 생균제는 살아있는 유용 미생물로 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*,

*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2000, Fax : +82-63-650-9590

E-mail : jdy2534@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Lactococcus, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* 등이 있으며[22], 가축에 급여 시 장내 균총 개선[10], 사료 효율성 증대[16], 대사 장애 예방[20], 면역력 증진[26] 등의 효과가 있다고 알려져 있어 가축 질병 예방과 생산성 향상을 목표로 축산용 생균제로의 활용가치가 높게 평가받고 있다.

하지만 최근 생균제의 인기가 급증함에 따라 국내에서 취급되고 있는 상업용 제품군의 수도 함께 증가하면서 생균제의 사용에 대한 정확한 과학적 근거에 따른 올바른 적용방법의 기준 없이 무분별하게 사용되고 있으며, 이러한 생균제의 사용으로 일관성 없는 효과에 대한 의문이 제기되어지고 있다[12]. 따라서 효율적인 생균제 개발을 위하여 가축의 장내 미생물 군집구조에 대한 과학적 근거제시와 축산용 생균제의 적용을 위해 명확한 과학적 기반연구가 필요한 시점이다.

본 연구는 축산용 생균제의 적합한 적용을 위한 과학적 기반을 마련하기 위해 차세대 염기서열 분석기술(Next-generation sequencing)을 활용하여 가축의 장내 미생물 군집구조를 분석하고 비교함으로써 국내 축산분야에 생균제를 활용하기 위한 미생물학적 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

닭, 돼지, 소의 분변 시료의 수집

가축의 장내 미생물 군총 분석을 위한 분변 시료는 전국의 축사에서 무작위 채취하여 이용하였다. 닭의 분변, 돼지의 분변, 소의 분변은 각각 15종을 채취하여 총 45종의 시료를 수집하였고 각 시료는 군집의 변화를 최소화 하기 위해 보냉박스를 통해 운반하여 실험에 사용하였다(Table 1).

가축 분변 시료의 total DNA 추출

수집한 가축 분변으로부터 total DNA를 추출하기 위해 (QIAamp Fast DNA Stool mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하였으며, 제조사의 추출 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 각 시료로부터 추출된 dsDNA의 농도를 정밀하게 측정하기 위해 Qubit 4 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) 장비를 이용하였으며, Nanodrop One 분광광도계(ThermoFisher scientific, waltham, Massachusetts, USA) 장비를 이용하여 흡광도를 측정(Abs260nm/Abs280nm ratio)한 후 1.5% agarose 전기영동을 통해 최종적으로 DNA 품질을

검증하였다.

16S metagenomic library 제작 및 Illumina Miseq 장비를 이용한 염기서열 분석

각 가축 분변 시료에서 추출한 total DNA에서 세균군집 분석을 목적으로 16S RNA 유전자를 증폭하기 위해 V3-V4 region target primer set (forward : 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3', reverse : GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CT A ATC C-3')와 KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche, Base, Switzerland)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 pre-denaturation 5분, 95°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 polymerization 30초 반응을 25회 반복하였으며, 72°C에서 5분간 최종 extension 반응을 수행하였다. 또한 증폭산물은 AMPure XP (BECKMAN COULTER, Brea, California, USA) bead를 사용하여 증폭산물 이외의 불순물을 제거하였다. 증폭산물에 index를 붙이는 2차 PCR은 Illumina에서 제공하는 16S metagenomic sequencing library preparation 방법[7]에 따라 Nextera XT Index kit v2 (Illumina, San Diego, California, USA)를 사용하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 pre-denaturation 5분, 95°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 polymerization 30초 반응을 8회 반복하였으며, 72°C에서 5분간 최종 extension 반응을 수행하였다. 각 시료로부터 제작된 library의 농도 및 순도 품질 검사를 수행한 후 동일한 농도(4 nM)로 희석하여 normalization하였으며, pooling을 통해 mixture를 제작한 뒤 MiSeq Reagent Kit v3 cartridge (Illumina, San Diego, California, USA)에 주입하여 Miseq (Illumina, San Diego, California, USA) 장비를 통해 분석을 수행하였다.

데이터 분석

Miseq 장비에서 생산된 FASTQ 파일은 EzBioCloud (Chunlab Inc., Seoul, Korea) 플랫폼의 16S-based microbiome taxonomic profiling (MTP) software [29]를 통해 분석하였다. 각 시료에서 얻어진 read 중 PCR 과정에서 생산된 low quality, non-target, chimeric read는 제거 한 후 valid read를 97.0% 이상의 염기서열 유사도 기준으로 OTU clustering하여 시료 내 미생물 군집의 미생물 분포(composition), 다양성(diversity)과 종 풍부도(richness), 균등성(evenness)을 조사하여 α -diversity를 분석하였으며, β -diversity 분석을 통해 시료간의 상관관계와 각 가축 장내미생물의 미생물학적 분류 수준에 따른 biomarker를 분석하였다. 또한 β set-significance 분석 방법으로 비모수 다변량 통계 검정인 PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) 분석[25]을 통해 각 가축 장내 미생물 군집의 중심(mid point)와 산포(dispersion)을 분

Table 1. Information of samples randomly collected in Korea livestock cage

Fecal origin	Abbreviation	Sample code	The number of samples
Broiler chicken	BC	F01 - F15	15
Pig	P	F16 - F30	15
Cattle	C	F31 - F45	15

석하였다.

결과 및 고찰

닭, 돼지, 소 분변시료의 α-diversity 분석

각 가축 별로 분변 내 세균 군집 분석을 바탕으로 산출된 α-diversity 통계분석 결과를 Table 2에 정리하였다. 닭, 돼지, 소 분변시료에서 Good's coverage of library 수치가 99.6% 이상 측정되어 전체 세균 군집을 파악하는데 충분한 read를 획득한 것으로 판단되었다. 각 분변 시료에서의 종 추정치 (OTUs) 수는 닭(216.27), 돼지(955.93), 소(1,599.47)로 나타났으며, 종 풍부도(richness)를 나타내는 지표인 Chao1은 닭(260.27), 돼지(1,045.88), 소(1,761.18)로 산출되었으며, ACE (Abundant-based coverage estimators)는 닭(281.76), 돼지(1,074.20), 소(1,798.11)로 분석되었다. 또한, Jackknife 분석 결과 p-value가 0.00001 미만으로 나타나 Chao1, ACE, Jackknife 지표를 활용한 비모수적(non-parametric) 통계분석 결과에서 가축 품종 간의 종 풍부도에 차이가 있는 것으로 나타났다. 종 다양성 (diversity)을 나타내는 지표인 Shannon diversity index는 닭(2.63), 돼지(4.52), 소(4.49)로 나타났으며, Simpson은 닭(0.14), 돼지(0.04), 소(0.05)로 산출되었다. 또한 NPS Shannon, Shannon, Simpson 지표의 경우, 닭과 돼지, 닭과 소 사이에서는 종 다양성이 유의성 있는 차이를 가진 것으로 분석되었으나, 돼지와 소 사이의 p-value 값은 각 지표별로 0.983, 0.885, 0.254로 산출되어 통계적으로 유의성이 없는 것으로 확인하였다. Song 등[23]은 포유류와 조류의 장내 미생물 군집은 숙주 특이성이 있다고 보고하였으며, 본 연구 결과에서도 조류에 속하

는 닭과 포유류에 속하는 돼지, 소에 대한 각 사이의 종 다양성은 유의성이 있었으며, 둘 다 포유류에 속하는 돼지와 소 사이의 종 다양성은 유의성이 없어 Song 등[23]의 보고와 유사한 결과를 얻었다고 판단된다.

닭, 돼지, 소 분변시료의 세균 분포 분석

각 가축 분변시료의 세균 분포를 분석하기 위해 닭 분변시료 15종, 돼지 분변시료 15종, 소 분변시료 15종을 그룹별로 분류한 후 평균값을 산출하여 그룹간 비교를 하였으며, 각 가축 분변시료의 미생물학적 분류 단계 수준별로 차지하는 미생물의 상대적 분포비율을 Fig. 1에 나타냈다. 문(phylum) 수준에서 비교 시, 세 종류의 가축 모두에게서 Firmicutes가 우점하고 있는 것으로 확인되었다. 닭 분변시료의 경우 Firmicutes (82.48%), Proteobacteria (9.63%), Actinobacteria (4.69%), Bacteroidates (2.92%) 순으로 분석되었으며, 돼지 분변시료는 Firmicutes (66.52%), Bacteroidates (27.78%), Proteobacteria (1.97%), Actinobacteria (1.59%) 순으로 분석되었고, 소 분변시료의 경우 Firmicutes (48.23%), Proteobacteria (30.89%), Bacteroidates (11.01%), Actinobacteria (8.78%) 순으로 분석되었다. 이번 결과는 닭의 분변시료가 다른 가축에 비해 Firmicutes 우점도가 더 높다는 Wei 등[24]의 보고와 동일하였으며, 돼지 분변시료의 경우 Gerzova 등[4]에 의한 연구에서 우점 문이 Firmicutes (69.5±16.4%), Bacteroidates (22.3±10.0%), Proteobacteria (5.75±14.13%), Actinobacteria (1.36±0.96%) 순으로 분석된 바 있어 이전의 연구와 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 그러나 닭과 소 분변시료의 경우, 이전 연구 결과들[2, 5, 15, 21]과 비교하였을 때, 가장 많은 비율을 차지하는 문이 Firmicutes인 것은 동일하나

Table 2. Sequence summary and α-diversity indices

Sample	ACE	Chao1	Jackknife	OTUs
BC ⁴⁾	281.76±54.03	260.67±60.71	275.27±62.01	216.27±71.03
P ⁵⁾	1,074.20±246.85	1,045.88±241.19	1,114.85±262.17	955.93±229.06
C ⁶⁾	1,798.11±281.60	1,761.18±283.55	1,886.60±299.72	1,599.47±270.10
Significance ¹⁾	p<0.00001	p<0.00001	p<0.00001	p<0.00001
Significance ²⁾	p<0.00001	p<0.00001	p<0.00001	p<0.00001
Significance ³⁾	p<0.00001	p<0.00001	p<0.00001	p<0.00001
Sample	NPS Shannon	Shannon	Simpson	Phylogenetic diversity
BC ⁴⁾	2.63±0.57	2.63±0.57	0.14±0.06	364.80±115.03
P ⁵⁾	4.53±0.34	4.52±0.34	0.04±0.02	1,231.47±276.45
C ⁶⁾	4.52±0.42	4.49±0.42	0.05±0.02	1,865.67±328.74
Significance ¹⁾	p<0.00001	p<0.00001	p<0.0001	p<0.00001
Significance ²⁾	p<0.00001	p<0.00001	p<0.0001	p<0.00001
Significance ³⁾	p=0.983	p=0.885	p=0.254	p<0.0001
Sample	The number of valid reads		Good's coverage of library (%)	
BC ⁴⁾	94,687.73±2677.93		99.95±0.02	
P ⁵⁾	93,740.20±906.77		99.83±0.04	
C ⁶⁾	93,082.20±3238.46		99.69±0.05	

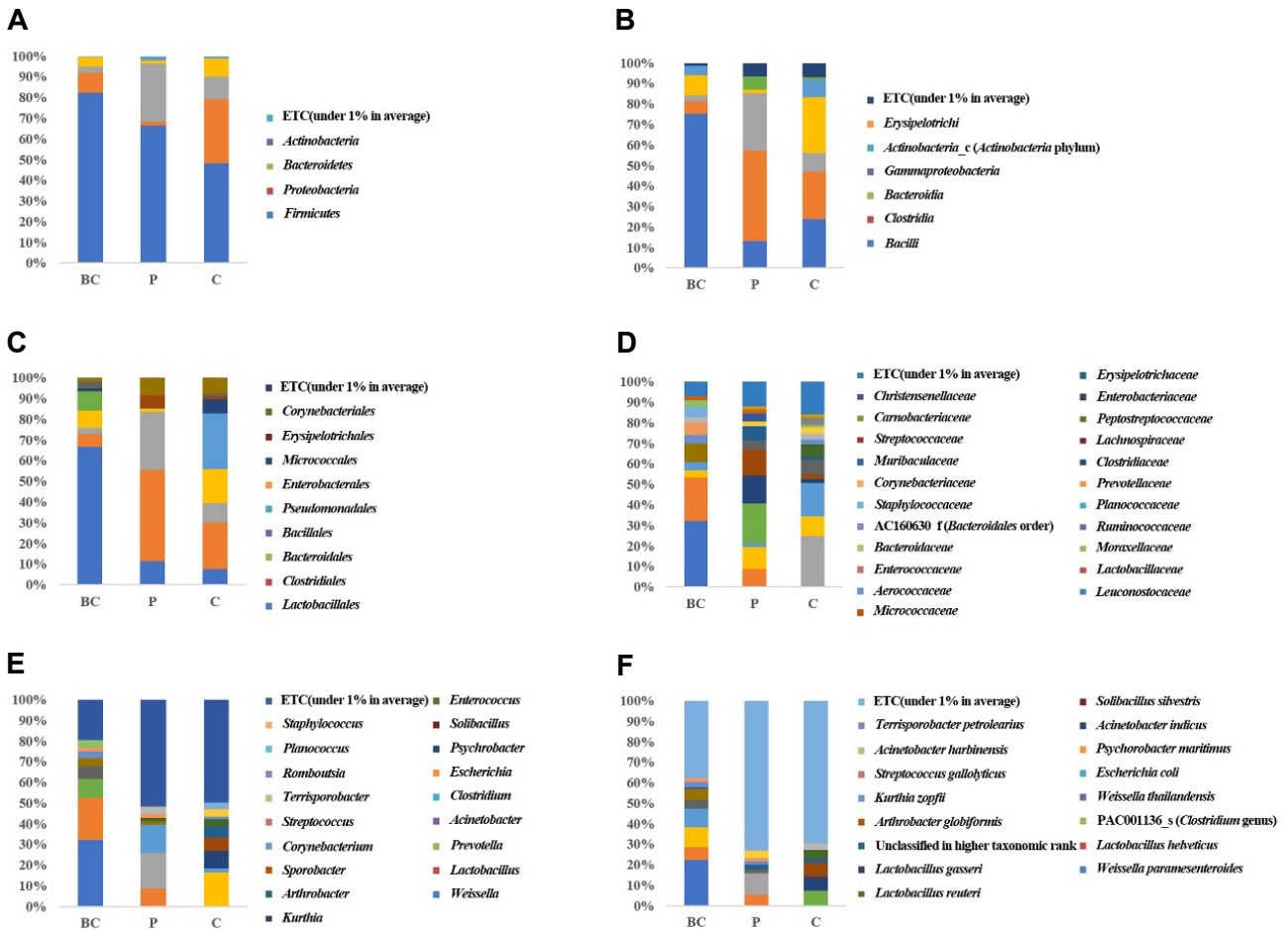


Fig. 1. Microbial composition and relative abundance in broiler chicken (BC), pig (P) and cattle (C) based on taxonomic levels of classification at phylum (A), class (B), order (C), family (D), genus (E) and species (F).

그 외 우점 문의 순서 및 상대적 분포비율은 다소 차이가 있었다.

속(genus) 수준에서 비교 시, 닭 분변시료의 경우, 우점 속이 *Weissella* (32.11%), *Lactobacillus* (20.45%), *Escherichia* (9.22%), *Enterococcus* (6.09%) 순으로 분석되었으며, 돼지 분변시료의 경우 *Prevotella* (17.30%), *Clostridium* (13.52%), *Lactobacillus* (8.67%), *Terrisporobacter* (3.52%) 순으로 분석되었고, 소 분변시료의 경우 *Acinetobacter* (16.56%), *Psychrobacter* (8.16%), *Solibacillus* (6.67%), *Arthrobacter* (5.33%) 순으로 분석되었다. 닭 분변시료에서 우점 속은 대부분 유산균이며 *Lactobacillus*가 가장 큰 상대적 분포비율을 나타내는 기존의 보고[6, 19]와는 다르게 *Weissella*가 가장 큰 상대적 분포비율을 나타내었으며, *Lactobacillus*는 그 다음으로 위치하였다. 돼지 분변 시료의 경우, *Lactobacillus* (21.19%), *Prevotella* (20.89%), *Subdoligranulum* (7.75%), *Selenomonas* (7.06%) 순으로 분석된 Lim 등[13]의 보고와 달리 이번 결과에서는 *Prevotella*가 우점 속이었으며 그 외 속들의 순서와 상대적분포비율 또한 다소 차이가 있었다. 소 분변 시료는 토양 세균들이 속하는 *Acinetobacter*, *Solibacillus*, *Arthrobacter*가 우점 속으로 분석되었는데 이는 잡식성인

닭과 돼지와 달리 소는 초식성으로 국내 축산농가에서 배합사료와 별개로 건초와 볏짚 같은 조사료를 급여하고 있어 이에 기원된 것으로 예상된다[9].

종(species) 수준에서, 닭 분변시료의 우점 종은 *Weissella paramesenteroides* (22.31%), *Weissella thailandensis* (9.78%), *Escherichia coli* (9.22%), *Lactobacillus helveticus* (6.16%), *Lactobacillus gasseri* (5.43%) 순으로 분석되었으며, 돼지 분변시료의 우점 종은 *Clostridium* 속에 속하는 *PAC001136_s* (10.27%), *Lactobacillus helveticus* (5.50%), *Terrisporobacter petrolearius* (3.44%) 순으로 분석되었고, 소의 분변시료의 우점 종은 *Psychrobacter maritimus* (7.36%), *Acinetobacter indicus* (7.02%), *Solibacillus silvestris* (6.67%), *Acinetobacter harbinensis* (4.23%) 순으로 분석되었다(Table 3). 장내 미생물 군집과 유전체는 지역, 축사 위생, 온도 등의 환경적 요인과 식성 차이, 항생제, 보조사료의 종류, 수평 유전자 전달 등 다양한 원인으로 인해 차이를 보일 수 있어[21], 통제된 조건에 따른 국내 가축 장내 미생물 군집 분포에 대하여 추가적인 연구를 수행하여 비교할 경우 학술적 가치는 더욱 증가할 것으로 사료된다.

Table 3. Taxonomic classification at the phylum, genus and species levels showing microbial communities of each broiler chicken (BC), pig (P) and cattle (C)

Taxonomic rank in phylum	Proportion (%)			Taxonomic rank in species	Proportion (%)		
	BC	P	C		BC	P	C
<i>Firmicutes</i>	82.48	66.52	48.23	<i>Weissella paramesenteroides</i>	22.31	0.00	0.00
<i>Proteobacteria</i>	9.63	1.97	30.89	<i>Lactobacillus helveticus</i>	6.16	5.50	0.00
<i>Bacteroidetes</i>	2.92	27.78	11.01	PAC001136_s (<i>Clostridium</i> genus)	0.00	10.27	0.00
<i>Actinobacteria</i>	4.69	1.59	8.78	<i>Weissella thailandensis</i>	9.78	0.00	0.00
ETC(under 1% in average)	0.27	2.14	1.09	<i>Escherichia coli</i>	9.22	0.00	0.00
Taxonomic rank in genus	Proportion (%)			Unclassified in higher taxonomic rank	Proportion (%)		
	BC	P	C		BC	P	C
<i>Weissella</i>	32.11	0.00	0.00	<i>Arthrobacter globiformis</i>	0.00	0.00	4.23
<i>Lactobacillus</i>	20.45	8.67	0.00	<i>Kurthia zopfii</i>	2.50	1.65	0.00
<i>Prevotella</i>	0.00	17.30	0.00	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2.09	1.91	0.00
<i>Acinetobacter</i>	0.00	0.00	16.56	<i>Acinetobacter harbinensis</i>	0.00	0.00	3.44
<i>Clostridium</i>	0.00	13.52	2.05	<i>Terrisporobacter petrolearius</i>	0.00	3.44	0.00
<i>Escherichia</i>	9.22	0.00	0.00	<i>Paeniclostridium ghonii</i>	0.00	0.00	2.95
<i>Psychrobacter</i>	0.00	0.00	8.16	<i>Enterococcus faecium</i>	2.71	0.00	0.00
<i>Solibacillus</i>	0.00	0.00	6.67	<i>Acinetobacter albensis</i>	0.00	0.00	2.60
<i>Enterococcus</i>	6.09	0.00	0.00	<i>Aerococcus viridans</i>	2.60	0.00	0.00
<i>Kurthia</i>	3.86	1.65	0.00	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	0.00	0.00	2.42
<i>Arthrobacter</i>	0.00	0.00	5.33	ETC(under 1% in average)	32.21	73.04	61.39
<i>Sporobacter</i>	0.00	1.86	3.43				
<i>Corynebacterium</i>	3.24	0.00	1.35				
<i>Streptococcus</i>	2.13	1.95	0.00				
ETC(under 1% in average)	22.9	55.04	56.44				

닭, 돼지, 소 분변시료의 β-diversity 분석

각 가축 분변시료 간의 세균 군집구조를 비교 및 분석하기 위해 Generalized UniFrac dissimilarity metrics [14]을 기반으로 한 Principal coordinate analysis (PCoA) 분석과 UPGMA-dendrogram 분석을 수행하였다. 그 결과, 속 수준과 종 수준에서 포유류인 돼지와 소의 분변시료는 조류인 닭에 비해 비교적 가깝게 분류되었으며, 각 가축 분변시료 내 대부분의 클러스터가 분리되어 나타남을 확인할 수 있었다. 이를 통해 닭, 돼지, 소 분변시료의 각 미생물 군집은 유사하지 않고 각기 다른 군집을 형성하고 있는 것을 확인하였다(Fig. 2).

β set-significance 분석

각 가축 분변시료간 미생물 분포에 차이가 있는지 분석하기 위해 Generalized UniFrac distance metric 기반의 PERMANOVA 분석을 수행한 결과, p-value가 0.001로 나타나 '각 분변시료의 세균 군집의 중심과 산포는 유사하다'는 귀무가설이 기각됨으로써, 각 분변시료의 미생물 군집 분포의 중심 또는 확산이 상호 간 다르다는 것을 확인할 수 있었으며, 닭, 돼지, 소 분변시료의 미생물 분포가 다르다는 것을 통계학적으로 검증하였다(Table 4).

Taxonomic biomarker 분석

문 수준의 단계부터 종 수준의 단계까지 닭, 돼지, 소 분변시료의 상대적 균총 비율에 차이가 있어, 각 미생물 군집을 대표하는 biomarker 분석을 위해 선형 판별 분석 효과 크기(Linear discriminant analysis effect, LEfSe) [18] 분석법을 사용하였다. 2.0 이상의 LDA (Linear discriminant analysis) score를 effect size로 하여 지표로 사용하였으며, LEfSe 분석 결과를 바탕으로 LDA score가 높은 상위 20종의 taxon, p-value와 각 가축 분변시료 내 비율을 확인하였다(Table 5). 그 결과, 강(class) 수준부터 세 종류의 가축 분변 군집에 상당한 미생물학적 차이가 나타났고, 특히 *Bacilli*가 5.48081의 LDA score로 가장 값이 컸으며, 돼지(13.13%)와 소(24.00%)에 비해 닭(75.23%)에서 더 많은 상대적 분포를 나타냈다. 속 수준에서 *Weissella*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Acinetobacter*가 biomarker로 작용하였으며, *Weissella*와 *Lactobacillus*가 닭을 다른 두 가축과 구분할 수 있는 미생물로, *Prevotella*가 돼지를 다른 두 가축과 구분할 수 있는 미생물로, *Acinetobacter*가 소를 다른 두 가축과 구분할 수 있는 미생물로 분석되었다.

국외에서는 장내 미생물 군집 내 항생유전자 탐색[4], 면역유전자 조절[11], 신규 생균계 소재 탐색[27], 생균계를 비롯한 여러 보조사료들의 체중효과[3]와 체중 관련 미생물 탐색[5, 6] 등 다양한 축산 분야에서 차세대염기서열분석기술을 활용

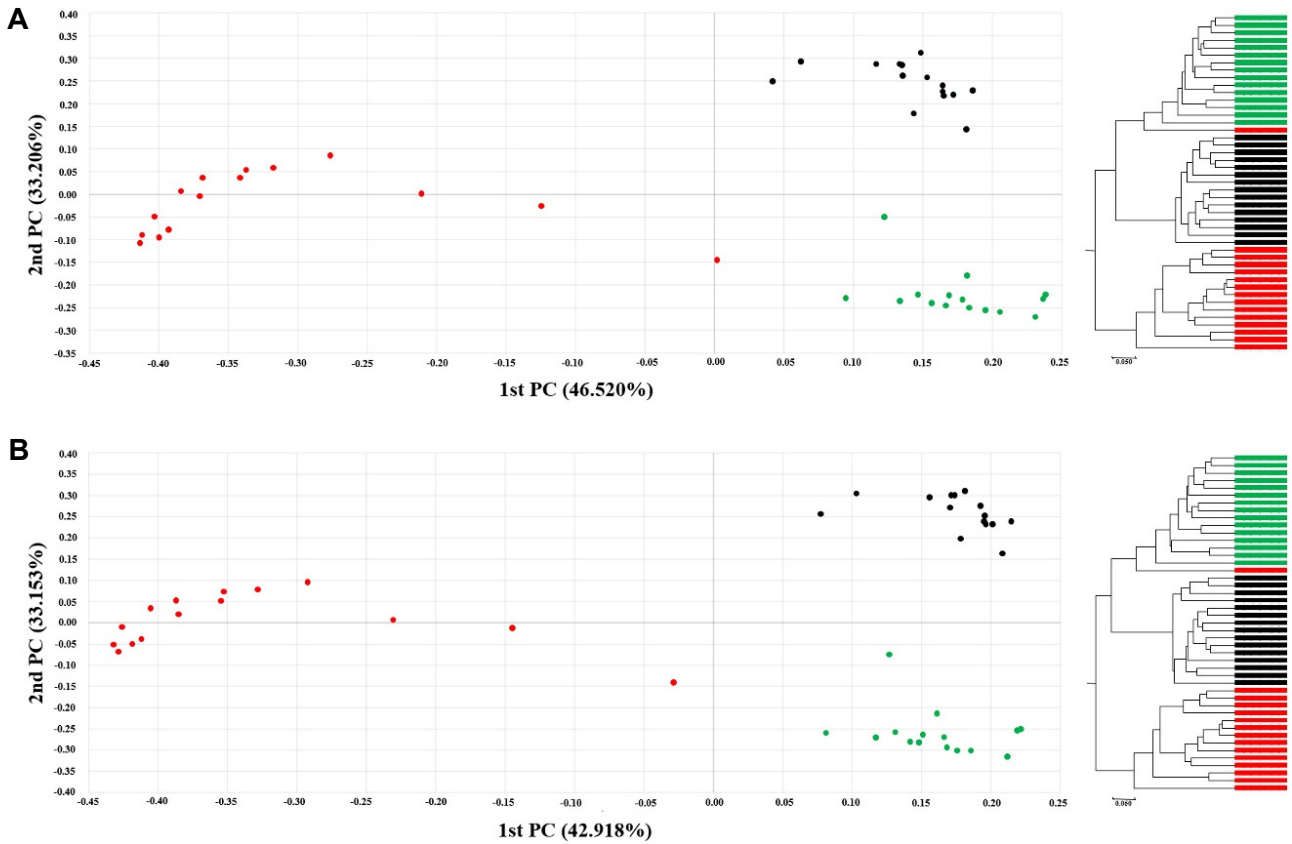


Fig. 2. Principal coordinate analysis and UPGMA clustering result based on Generalized UniFrac dissimilarity metric of bacterial communities on genus (A) and species (B) level (red, broiler chicken; green, pig; black, cattle).

Table 4. Permutational multivariate analysis of variance table for bacterial communities from broiler chicken (BC), pig (P) and cattle (C) using Generalized UniFrac distance metric analysis

Test	PERMANOVA		
Hypothesis	Distributions of bacteria population of each fecal sample is similar		
Groups	Group size	Sample size	Permutations
Broiler chicken-pig-cattle	3	45	999
Inter set-distances	BC	P	C
BC	—	$p=0.001$	$p=0.001$
P	$q=0.001$	—	$p=0.001$
C	$q=0.001$	$q=0.001$	—

하고 있으며, 관련 내용을 미생물과 연관시켜 분석하고 이해하여 미생물 유전체에 대한 학문과 축산 산업을 동시에 발전시켜 나가고 있다. 이러한 시대적 흐름에 맞추어 국내에서도 축산가의 경쟁력 확보와 소득 증가를 위해서는 가축의 생산성 증대는 필수적이다. 특히, 분석기술이 발전하면서 가축의 체중은 가축 내 장내 미생물 군집과 밀접한 관련성이 있다고 보고되고 있으며, Jiao 등[5]은 multivariable mixed linear model analysis을 통해 소의 체중에 *Desulfopila*가 긍정적인 상관관계가 있으며 *Paludibacter*가 부정적인 상관관계를 형성한다고 보고하였다. 또한 Johnson 등[6]은 닭의 체중에 많은 속

수준의 미생물이 관여하며 *Bilophila*, *Butyricimonas*, *Eggerthella* 등이 긍정적인 상관관계를 보여주었고, *Anaerotruncus*, *Blautia*, *Arthromitus* 등이 부정적인 상관관계를 형성한다고 보고하였다. 그러나 다양한 외부요인에 의해 가축의 장내 미생물 군집과 유전체는 변화할 수 있어 국내 가축에 특이적인 연구가 지속적으로 수행되어야 할 필요가 있다[21]. 따라서, 본 연구를 기초로 하여, 향후 축산가의 생산성 증대 및 산업 성장 도모를 위해 축사 여건에 적합한 증체 관련 미생물의 탐색, 생애주기별 장내 미생물 군집과 유전체 분석 및 각 가축에 특화된 생균제 개발 등 추가적인 연구가 지속된다면 국내 축산농가에 긍

Table 5. Biomarker analysis among broiler chicken (BC), pig (P) and cattle (C) using LefSe analysis

Taxon name	Taxon rank	LDA score (log 10)	p-value	Proportion (%)		
				BC	P	C
<i>Bacilli</i>	Class	5.48081	<0.00001	75.23	13.13	24.00
<i>Lactobacillales</i>	Order	5.46240	<0.00001	66.53	11.34	7.40
<i>Clostridiales</i>	Order	5.26398	<0.00001	6.25	44.34	22.96
<i>Clostridia</i>	Class	5.26398	<0.00001	6.25	44.34	22.96
<i>Firmicutes</i>	Phylum	5.21677	<0.00001	82.48	66.52	48.23
<i>Weissella</i>	Genus	5.18143	<0.00001	32.11	0.41	0.03
<i>Leuconostocaceae</i>	Family	5.18132	<0.00001	32.11	0.41	0.04
<i>Proteobacteria</i>	Phylum	5.13933	<0.00001	9.63	1.97	30.89
<i>Pseudomonadales</i>	Order	5.10650	<0.00001	0.33	0.37	26.85
<i>Gammaproteobacteria</i>	Class	5.08683	<0.00001	9.61	1.53	27.28
<i>Moraxellaceae</i>	Family	5.07077	<0.00001	0.32	0.36	24.73
<i>Bacteroidia</i>	Class	5.06848	<0.00001	2.89	27.77	9.03
<i>Bacteroidales</i>	Order	5.06837	<0.00001	2.89	27.77	9.02
<i>Bacteroidetes</i>	Phylum	5.06789	<0.00001	2.92	27.78	11.01
<i>Weissella paramesenteroides</i>	Species	5.02235	<0.00001	22.31	0.01	0.02
<i>Lactobacillaceae</i>	Family	5.00790	<0.00001	21.09	8.68	0.12
<i>Lactobacillus</i>	Genus	4.99419	<0.00001	20.45	8.67	0.12
<i>Prevotellaceae</i>	Family	4.95300	<0.00001	0.00	19.49	0.70
<i>Prevotella</i>	Genus	4.89676	<0.00001	0.00	17.30	0.10
<i>Acinetobacter</i>	Genus	4.89647	<0.00001	0.32	0.34	16.56

정적인 효과로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2021년 농림축산식품부 농축산식품 마이크로바이옴 통합 바이오뱅크구축사업의 지원에 의해 수행된 것입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Anderson, A. D., Nelson, J. M., Rossiter, S. and Angulo, F. J. 2003. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microb. Drug Resist.* **9**, 373-379.
- Azed, E., Derakhshani, H., Forster, R. J., Gruninger, R. J., Acharya, S. A., McAllister, T. A. and Khafipour, E. 2019. Characterization of the rumen and fecal microbiome in bloated and non-bloated cattle grazing alfalfa pastures and subjected to bloat prevention strategies. *Sci. Rep.* **9**, 4272.
- Cesare, A. D., Sirri, F., Manfreda, G., Moniaci, P., Giardini, A., Zampiga, M. and Meluzzi, A. 2017. Effect of dietary supplementation with *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL (CECT 4259) on caecum microbioma and productive performance in broiler chickens. *PLoS One* **12**, e0176309.
- Gerzova, L., Babak, V., Sedlar, K., Faldynova, M., Videnska, P., Cejkova, D., Jensen, A. N., Denis, M., Kerouanton, A., Ricci, A., Cibin, V., Osterberg, J. and Rychlik, I. 2015. Characterization of biotic resistance gene abundance and microbiota composition in faces of organic and conventional pigs from four EU countries. *PLoS One* **10**, e0132892.
- Jiao, S., Cao, H., Dai, Y., Wu, J., Lv, J., Du, R. and Han, B. 2017. Effect of high-fat diet and growth stage on the diversity and composition of intestinal microbiota in healthy bovine livestock. *J. Sci. Food Agric.* **97**, 5004-5013.
- Johnson, T. J., Youmans, B. P., Noll, S., Cardona, C., Evans, N. P., Karnezos, T. P., Ngunjiri, J. M., Abundo, M. C. and Lee, C. W. 2018. A consistent and predictable commercial broiler chicken bacterial microbiota in antibiotic-free production displays strong correlations with performance. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e00362-18.
- Kim, J. G., Lee, J. H. and Kwon, H. K. 2011. The distribution of indicator microorganisms and identification of antibiotic resistant strains in domestic animal feces. *J. Environ. Health Sci.* **37**, 289-297.
- Kim, M. J., Jeon, D. G., Ahn, H. S., Yoon, I. G., Moon, E. S., Lee, C. H., Jang, I. S. and Kim, M. J., et al. 2020. Effects of probiotic complex on performance, blood biochemical and immune parameters, digestive enzyme activity, fecal microbial population and noxious gas emission in broiler chicks. *KJPS* **47**, 169-180.
- Kim, S. H., Park, Y. S. and Kim, T. K. 2016. Effects of roughage choice on meat quality grade of hanwoo steers. *Kor. J. Agric. Sci.* **43**, 328-345.
- Ko, Y. D., Sin, J. H., Kim, C. S., Kim, Y. M., Park, K. D. and Kim, J. H. 2003. Effects of dietary probiotic on perform-

- ance, noxious gas emission and microflora population on the cecum in broiler. *J. Anim. Sci. Technol.* **45**, 559-568.
11. Kreuzer-Redmer, S., Bekurtz, J. C., Arends, D., Bortfeldt, R., Kutz-Lohroff, B., Sharbati, S., Einspanier, R. and Brockmann, G. A. 2016. Feeding of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 leads to intestinal miRNA-423-5p induced regulation of immune-relevant genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 2263-2269.
 12. Lee, W. J., Yun, B. H., Lee, H. K., Heo, J. Y., Kim, Y. H. and Oh, S. N. 2020. Application of multi-strain probiotics using self-cultivation system for livestock health and farming. *Curr. Top. Lact. Acid Bact. Probiotics* **6**, 39-48
 13. Lim, S. K., Kim, D. J., Moon, D. C., Cho, Y. N. and Rho, M. N. 2020. Antibiotic resistomes discovered in the gut microbiomes of Korean swine and cattle. *Gigascience* **9**, gaa043.
 14. Lozupone, C. and Knight, R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8228-8235.
 15. Mancabelli, L., Ferrario, C., Milani, C., Mangifesta, M., Turroni, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Viappiani, A., Ossiprandi, M. C., Sinderen, D. V. and Ventura, M. 2016. Insights into the biodiversity of the gut microbiota of broiler chickens. *Environ. Microbiol.* **18**, 4727-4738.
 16. Nargesi, E. A., Falahatkar, B. and Sajjadi, M. M. 2019. Dietary supplementation of probiotics and influence on feed efficiency, growth parameters and reproductive performance in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock. *Aquac. Nutr.* **26**, 98-108.
 17. OECD. <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm#indicator-chart>.
 18. Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S. and Huttenhower, C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**, R60.
 19. Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B. and Kim, W. K. 2018. Chicken gut microbiota: importance and detection technology. *Front. Vet. Sci.* **5**, 254.
 20. Sharma, N., Navik, U. and Tikoo, K. 2020. Unveiling the presence of epigenetic mark by *Lactobacillus* supplementation in high-fat diet-induced metabolic disorder in sprague-dawley rats. *J. Nutr. Biochem.* **84**, 108442.
 21. Shaufi, M. A. M., Sieo, C. C., Chong, C. W., Gan, H. M. and Ho, Y. W. 2015. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathog.* **7**, 4.
 22. Shin, S. J., Ha, G. S., Jeong, S. J., Ryu, M. S., Kim, J. W., Yang, H. J., Kwak, M. S., Sung, M. H. and Jeong, D. Y. 2020. Probiotic properties and immunomodulator evaluation of the potential feed additive *Pediococcus acidilactici* SRCM 102607. *J. Life Sci.* **30**, 896-904.
 23. Song, S. J., Sanders, J. G., Delsuc, F., Metcalf, J., Amato, K., Taylor, M. W., Mazel, F., Lutz, H. L., Winker, K., Graves, G. R., Humphrey, G., Gilbert, J. A., Hackett, S. J., White, K. P., Skeen, H. R., Kurtis, S. M., Withrow, J., Braile, T., Miller, M., McCracken, K. G., Maley, J. M., Ezenwa, V. O., Williams, A., Blanton, J. M., Mckenzie, V. J. and Knight, R. 2020. Comparative analyses of vertebrate gut microbiomes reveal convergence between birds and bats. *mBio.* **11**, e02901-19.
 24. Wei, S., Morrison, M. and Yu, Z. 2013. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poult. Sci. J.* **92**, 671-683.
 25. Xia, Y. and Sun, J. 2017. Hypothesis testing and statistical analysis of microbiome. *Genes Dis.* **4**, 138-148.
 26. Xu, H., Huang, W., Hou, Q., Kwok, L., Laga, W., Wang, Y., Ma, H., Sun, Z. and Zhang, H. 2019. Oral administration of compound probiotics improved canine feed intake, weight gain, immunity and intestinal microbiota. *Front. Immunol.* **10**, 666.
 27. Yeruva, T., Vankadara, S., Ramasamy, S. and Lingaiah, K. 2020. Identification of potential probiotics in the midgut of mulberry silkworm, *Bombyx mori* through metagenomic approach. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **12**, 635-640.
 28. Yoo, J. H., Park, G. H., Sung, J. S., Song, H. N., Shin, S. Y., Jung, W. H. and Heo, J. M. 2014. Feed additives in broiler diets to produce healthy chickens without in-feed antimicrobial compounds. *Kor. J. Agric. Sci.* **41**, 441-453.
 29. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S. J., Lim, J. M., Kim, Y. S., Seo, H. S. and Chun, J. C. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613-1617.

초록 : 차세대염기서열 분석을 이용한 소, 돼지, 닭의 장내 미생물 군집 분석 및 비교

정호진 · 하광수 · 신수진 · 정수지 · 류명선 · 양희종 · 정도연*

((재)발효미생물산업진흥원)

본 연구는 국내 가축의 장내 미생물 군집 분포와 시료간 미생물학적 차이에 대하여 차세대 염기서열 분석법 (NGS)을 이용하여 분석하였다. 전국의 축사에서 닭, 돼지, 소의 분변시료를 무작위로 채집하여 α -diversity를 분석한 결과, 종 추정치와 종 풍부도가 세 종류의 가축 모두에서 통계학적 유의성을 가지면서 소, 돼지, 닭 순으로 높게 분석되었다. 그러나 조류에 속하는 닭과 포유류에 속하는 돼지, 소에 대한 각 사이의 종 다양성은 통계학적 유의성이 있는 것으로 분석되었으나, 돼지와 소의 사이의 종 다양성은 통계학적 유의성이 없는 것으로 분석되었다. 각 가축 내 장내 미생물 군집의 분포를 분석한 결과, 문 수준에서 세 종류의 가축 모두 *Firmicutes*가 우점한 것으로 나타났으며, 속 수준에서는 닭의 분변시료는 *Weissella*, 돼지의 분변시료는 *Prevotella*, 소의 분변시료는 *Acinetobacter*가 우점 속으로 나타났다. 각 가축 분변시료의 미생물 군집 분포에 차이가 있는지 분석하기 위해 PERMANOVA 분석을 수행한 결과, 닭, 돼지, 소의 분변시료 내 미생물 군집의 중심과 산포는 통계학적으로 유의성을 가진 것으로 나타났다. 또한 각 가축 분변시료의 미생물 군집을 대표하는 biomarker를 분석하기 위해 LEfSe 분석을 수행한 결과, *Weissella*와 *Lactobacillus*는 닭의 분변을 다른 두 가축과 구분할 수 있는 미생물로, *Prevotella*는 돼지의 분변을 다른 두 가축과 구분할 수 있는 미생물로, *Acinetobacter*는 소의 분변을 다른 두 가축과 구분할 수 있는 미생물로 분석되었다. 본 연구를 기반으로 축사 여건에 적합한 체중 관련 미생물의 탐색, 생애주기별 장내 미생물 군집과 유전체 분석 및 각 가축에 특화된 생균제 개발 등 추가적인 연구 진행에 필요한 미생물학적 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.