

백두산호랑이 건강증진을 위한
생체지표 개발 기반 구축 사업[기술과제]

국립백두대간수목원 산림생물자원본부
백두산호랑이보전센터

2024

한국수목원정원관리원

요약문

수행기관	한국수목원정원관리원		수행부서	국립백두대간수목원 산림생물자원본부 백두산호랑이보전센터
사업명	백두산호랑이 건강증진을 위한 생체지표 개발 기반 구축 사업 보고서			
사업기간	총 사업기간	'24.03.~ '24.12.	사업비	50,000 천원
	당해연도	[1차년도] '24.03.~ '24.12.		
사업책임자	성명	김**	직위	센터장
	직장전화	054-679-0976	우편	thkim56@koagi.or.kr
참여자수	총 5명		내부 : 2명, 외부 : 3명	

내부 참여진

구분	성명	사업내용
1	김**	백두산호랑이 건강증진 생체지표 개발 기반구축
2	이**	백두산호랑이 건강증진 생체지표 개발 기반구축

외부 참여진

구분	성명	사업내용
1	서**	백두산호랑이 건강증진 생체지표 개발 기반구축
2	이**	백두산호랑이 건강증진 생체지표 개발 기반구축
3	김*	백두산호랑이 건강증진 생체지표 개발 기반구축

사업목적	백두산호랑이 고유 장내 미생물군집 유전정보 데이터베이스 확보를 통한 건강상태 정기 모니터링 시스템 구축		
사업목표	최종목표	백두산호랑이의 건강증진 방안 구축을 위한 생물학적 영향 평가 시스템 구축 및 민감 생체지표(Biomarker) 개발 등 새로운 건강관리 시스템 확립으로 야생동물의 건강과 호랑이 종보전 기술을 확보	
	당해연도 목표	백두산호랑이보전센터 보유 개체 6두 장내 미생물의 알파·베타 다양성과 생물분류학적 계통 수준 차이점 비교 분석을 통한 사육환경이 건강에 미치는 영향상태 평가	

사업범위	<p>[추진배경]</p> <ul style="list-style-type: none"> · (법률) 「생물다양성 보전 및 이용에 관한 법률」 제3조, 제7조, 제26조에 의거 생물다양성 보전과 생물자원의 지속 가능한 이용을 위한 건강 및 보전관리 구축 · (정책) ‘제5차 수목원진흥기본계획’ 산림생물다양성 보전 및 복원과 이용증진 기반 조성 · (기관 전략목표) 산림생물자원의 보전·복원·활용 체계 강화 <p>[필요성]</p> <ul style="list-style-type: none"> · 국제보전번식프로그램(GSMP)에 의하여 도입 및 번식에 제한을 받는 호랑이의 주권 확보 및 개체수 유지를 위한 기반구성 필요 · 생체지표(Biomarker) 산업은 현대 첨단의료 핵심 기술력으로 야생동물 건강증진 시스템 구축의 필요성 시사 · 영양흡수, 면역반응, 병원균 저항력, 에너지 대사 등 장내 미생물 군집의 균형은 건강유지와 생리적 항상성과 밀접한 관계를 갖음으로, 사육관리와 건강증진 효율 예측 지표 개발에 중추적 역할 수행 <p>[사업목적]</p> <ul style="list-style-type: none"> · 사육 개체군의 한정적 유전자원을 활용하여 건강증진과 종보전에 기여 · 장내 미생물 다양성과 건강의 연관성을 규명하여 맞춤형 관리방안 검토 및 장내 미생물 영향 예측 민감지표 개발 기반구축 · 백두산호랑이 고유 종특이적 장내 미생물 유전체 정보 확보로 맞춤형 보전관리 제언 및 사업 성과활용 가능성 제시
수행결과 및 시사점	<p>[수행결과]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 16S rRNA 시퀀싱을 사용한 미생물 군집을 계통분류 수준에서 분석진행 2. 장내 미생물군을 분석하여 개체의 건강상태와 장내 미생물 다양성의 상관관계를 규명 3. 건강한 개체는 Lachnospiraceae와 Ruminococcaceae와 같은 유익균이 우세한 반면, 건강 불균형이 의심되는 개체는 Enterobacteriaceae와 같은 병원성 균주가 증가하는 결과점 도출 <p>[시사점]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 소규모 샘플 수 <ul style="list-style-type: none"> · 백두산 호랑이 6마리를 대상으로 진행되었으나, 통계적 신뢰도를 높이기에는 제한적인 숫자로 판단됨 · 향후 후속 연구에서 국내 호랑이 사육개체로 샘플 수를 확대하여 통계 데이터 보완 필요함 2. 야생 개체군과의 비교 부재 <ul style="list-style-type: none"> · 본 사업은 사육 개체를 대상으로 진행되었으며, 야생에 서식하는 개체와의 장내 미생물군의 비교분석이 필요함 · 이는 사육환경이 미생물군에 미치는 영향을 평가할 수 있으며, 현 데이터의 한계점 돌파를 위해 다양한 샘플을 분석하는 후속 연구 진행이 요구됨

	<div>3. 기능적 분석의 부족</div> <div><div><div>· 장내 미생물의 계통적 구성과 다양성을 분석하였으나, 각 미생물이 건강에 미치는 구체적인 기능적 역할을 확인이 불가함</div><div>· 항후 메타게놈 또는 메타볼로믹스 분석과 같은 기능적 분석을 통하여 미생물군의 기능적 역할을 평가하고, 건강 증진에 기여할 수 있는 특정 미생물군을 파악하기 위한 후속연구 진행 예정(2025년)</div></div></div>																																	
사업성과	<table><tr><th colspan="2">1. 정책건의</th><th colspan="2">2. 논문실적</th><th colspan="5">3. 산업재산권</th><th colspan="2">4. 홍보</th></tr><tr><th>제정</th><th>개정</th><th>KCI</th><th>Scopus, SCIE이상</th><th>출원</th><th>등록</th><th>기술이전</th><th>기술보급</th><th>매뉴얼개발</th><th>보도자료</th><th>기고</th></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table> <div><div>· 장내 미생물 다양성과 건강의 연관성 규명</div><div>· 백두산호랑이 건강관리 지표 개발 기반구축</div><div>· 정기 모니터링 시스템을 통한 건강상태 변화 추적</div></div>	1. 정책건의		2. 논문실적		3. 산업재산권					4. 홍보		제정	개정	KCI	Scopus, SCIE이상	출원	등록	기술이전	기술보급	매뉴얼개발	보도자료	기고				1							
1. 정책건의		2. 논문실적		3. 산업재산권					4. 홍보																									
제정	개정	KCI	Scopus, SCIE이상	출원	등록	기술이전	기술보급	매뉴얼개발	보도자료	기고																								
			1																															
활용방안 및 기대효과	<div><div>· 백두산 호랑이의 맞춤형 건강 관리 및 종보전 전략 수립 활용</div><div>· 장내 미생물 다양성과 건강상태 간의 심층 분석기술 수행</div><div>· 지속 평가 가능한 개체별 건강 상태 모니터링 바이오마커 개발</div><div>· 멸종위기종 미생물 유전체의 객관적 자료 확보를 통한 응용연구 기반구축</div></div>																																	
성과활용 관련 건의	<div><div>1. 샘플 수 확장 및 야생 개체와의 비교 연구</div><div>· 국내 사육개체, 야생개체 등 샘플 수 확대</div><div>· 야생 개체군과의 비교 분석을 통한 사육 환경이 장내 미생물 군집에 미치는 영향 분석</div><div>2. 기능적 분석 도입</div><div>· 미생물군의 대사 기능과 면역 조절 역할을 평가하기 위해 메타게놈 분석 및 메타볼로믹스 분석 진행</div><div>· 특정 미생물이 건강 유지에 어떻게 기여하는지 분석할 수 있는 후속 사업 요구</div><div>3. 장기적 모니터링 시스템 구축</div><div>· 정기적인 미생물 데이터 수집과 분석을 통해 개체의 건강 변화 추이를 장기적으로 관찰할 수 있는 모니터링 시스템을 도입</div><div>· 수집된 정보를 통한 건강관리 체계 강화와 호랑이 미생물군집 데이터 보강</div></div>																																	

목 차

I. 서론	1
1. 배경 및 필요성	2
2. 사업목적	3
3. 사업목표	3
II. 수행방법 및 결과	5
1. 수행방법	6
2. 결과 및 고찰	12
3. 시사점	21
III. 주요성과 및 기대효과	22
1. 주요성과	23
2. 성과 활용방안	23
3. 기대효과	24
IV. 참고문헌	26

그림 목 차

그림 1. 내부 QC 결과	8
그림 2. 실험 프로토콜 모식도	9
그림 3. 알파 다양성 분석	11
그림 4. Wilcoxon Rank Sum Test	12
그림 5. 베타 다양성 분석	12
그림 6. Bray-Curtis 불일치 지수	13
그림 7. Jaccard 거리 지표	13
그림 8. UniFrac 지표	14
그림 9. 문 단계 분류	15
그림 10. 강 단계 분류	16
그림 11. 목 단계 분류	17
그림 12. 과 단계 분류	18
그림 13. 속 단계 분류	19

표 목 차

표 1. 개체별 시료 샘플 정보	5
표 2. 분류학적 수준 우세군	15

I. 서 론

1. 배경 및 필요성

가. 정책적 필요성

- 생물다양성협약(CBD)에 근거한 ‘제5차국가생물다양성전략('24~'28)’ 수립과 함께 지구식물보전전략2030 이행을 위한 수목원의 보전 기능 강화 요구
- 「쿤밍-몬트리올(GBF)에 담긴 2030 실천목표」에 ‘자연과 조화·공존을 통해 자연 혜택을 누리는 지속가능한 사회’ 이 신규 비전으로 선정되었으며, 종·유전다양성 관리 강화가 주요 성과목표로 대두

나. 사회/경제적 필요성

- 국제번식프로그램(GSMP) 관리제도에 의하여 도입·번식의 제한으로 국내 호랑이 개체수 유지 방안 대책 필요
- 멸종위기 야생생물의 지속가능한 보전 및 활용을 위한 유전적 특성 규명과 고유 유전정보 확보를 통한 국내 수의학적 야생동물 산업 전반에 기여

다. 기술적 필요성

- 장내 미생물(Microbiome)은 대사질환, 면역질환, 생체리듬 등 다양한 신체 활동에 큰 영향을 미치는 것으로 밝혀져 현대의학에 생체 건강지표로 전망
- 한정된 자원의 멸종위기종의 각종 질환에 따른 생체 건강증진 개발을 통한 전염병, 바이러스, 박테리아 등 확산을 미연에 방지하여 사육 및 건강관리 효율성 향상

2. 사업목적

가. 장내 미생물 다양성과 건강의 연관성 규명

- 알파·베타 다양성 및 생물분류학적 분석을 통하여 개체별 미생물 다양성과 건강상태 간의 상관관계 분석
- 장내 미생물 유전정보를 통한 건강상태 반영 지표 데이터베이스 구축

나. 백두산호랑이 맞춤형 관리 방안 검토

- 개체별 장내 미생물과 건강상태 관계 규명을 통한 정기 모니터링 시스템 진행
- 미생물 지표 데이터베이스를 활용한 민감성 바이오마커 개발
- 백두산호랑이 생체정보 확보로 수의학적 차원 예방을 통한 건강관리 및 관리체계 구축

다. 호랑이 장내 미생물 영향 예측 민감지표 개발 사업 확대

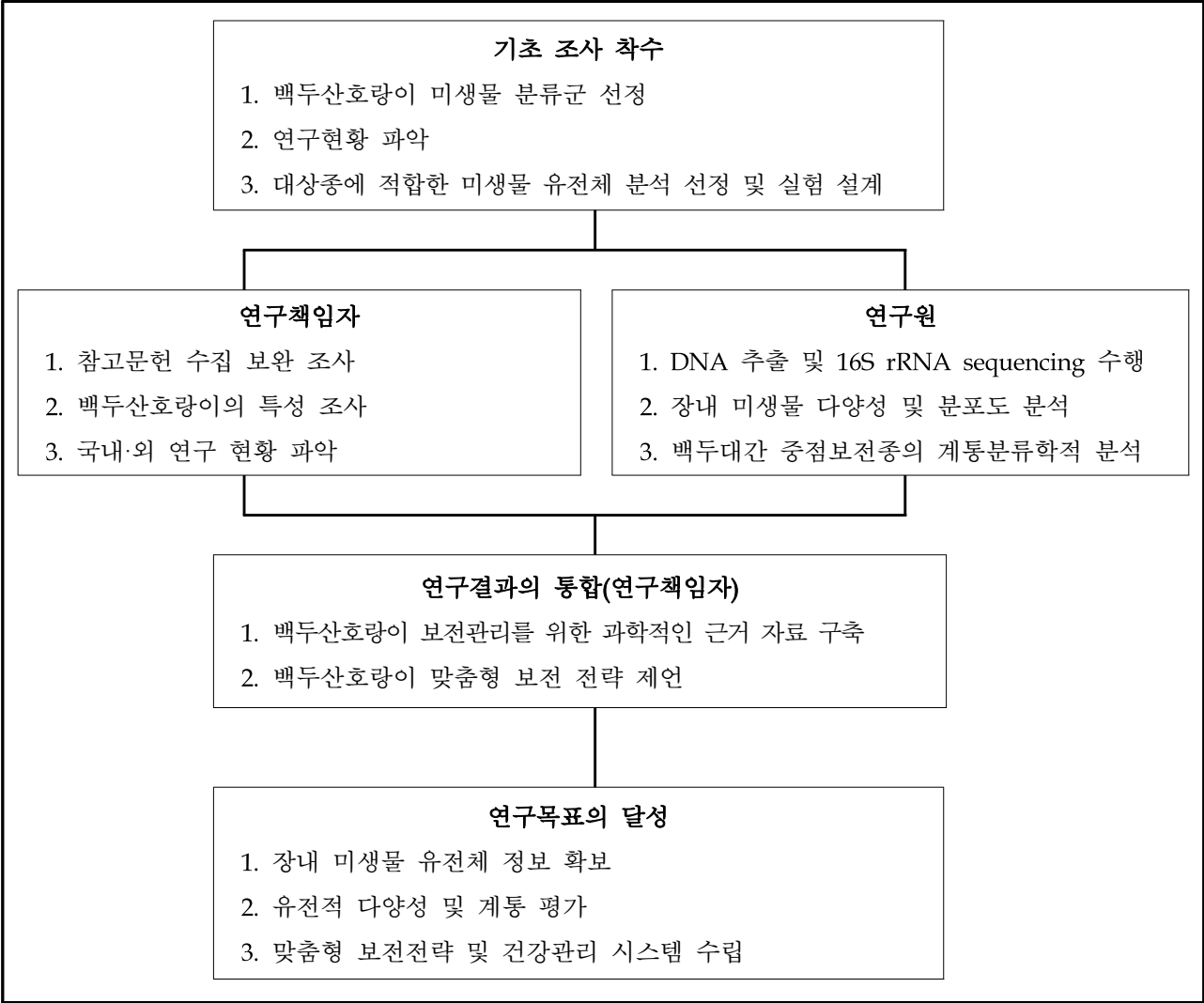
- 기존 백두산호랑이 6두에서 국내 사육개체 약 20두로 샘플 수 확장
※ 서울대공원, 에버랜드, 광주우치동물원, 전주동물원, 대전오월드 등 약 20두 시료 확보
- 미생물 유전정보를 통한 맞춤 바이오마커의 개발로 국내 야생동물 건강증진 산업 선도

3. 사업목표

가. 최종 목표

- 백두산호랑이 고유 종특이적 장내 미생물 유전체 정보를 확보하여 맞춤형 보전관리를 위한 기초자료 마련
- 장내 미생물 meta genome(박테리아, 바이러스, 진핵생물, 고균 등) 분포도 분석 및 생물학적 데이터베이스를 통한 건강검진 체계 구축
- 멸종위기 야생동물 맞춤형 보전관리 제언 및 연구결과 활용 가능성 제시

나. 사업의 추진체계



다. 연차별 목표

구분	사업의 목표	사업내용
2024년	장내 Microbiome 영향 예측 민감지표 개발 기반 구축	<div>○ 백두산호랑이보전센터 보유 전 개체 분변검사 시행을 통한 미생물 군집 기초 조사</div> <div>○ 종 특이성 미생물 군집 유전체 정보 확보</div> <div>○ meta genome 분포도 분석 및 생물학적 DB 구축</div> <div>○ 알파·베타, 생물분류학적 분석을 통한 계통 수준 비교 분석을 통한 각 개체별 미생물 다양성과 건강상태 간의 상관관계 분석</div>

Ⅱ. 수행방법 및 결과

1. 수행방법

가. 동물실험윤리(IACUC) 허가

- 검체로 사용되는 분변의 경우는 검체채취시 동물에 위해가 없으며 별다른 조치 없이 진행
- 경북대학교내 IACUC KNU 2024-0026번으로 2024.1.22.일 허가 시행

나. 사업 대상 및 샘플 수집

- 시료샘플 백두산호랑이 보존센터 보유개체 6두 장내 미생물 분석
- 연령, 성별, 식단, 건강 상태 등을 바탕으로 개체 간 비교를 통한 미생물군이 건강 상태에 미치는 영향 분석
- 분변 샘플은 각 개체의 배변 직후 비침습적으로 2022년 11월 채취 완료
- 수집 후 24시간 이내에 냉동 보관하여 DNA 분석을 위한 샘플의 신선도 유지

다. 시료 샘플 정보

표 1. 개체별 시료 샘플 정보

샘플번호	개체명	출생일	몸무게	성별	비고
호랑이 1	우리	2011. 09. 23.	178.5kg	수컷	고환적출(거세개체)
호랑이 5	한청	2005. 05. 08.	157.5kg	암컷	
호랑이 3	한	2013. 10. 26.	202.0kg	수컷	한(♂) 정관수술 동복으로 남매관계
호랑이 6	도	2013. 10. 26.	126.5kg	암컷	
호랑이 2	태범	2020. 02. 20.	178.0kg	수컷	동복으로 남매관계
호랑이 4	무궁	2020. 02. 20.	122.0kg	암컷	

1) 우리

표 2. ‘우리’ 급료 세부 정보

날짜	닭고기	소고기	합계	비고
22. 10. 31.	-	-	-	무급일
22. 11. 01.	5.5kg	1.5kg		
22. 11. 02.	5.5kg	1.5kg		
22. 11. 03.	5.0kg	1.5kg		
22. 11. 04.	5.0kg	1.5kg		
22. 11. 05.	5.0kg	1.5kg		
22. 11. 06.	5.5kg	1.5kg		
22. 11. 07.	-	-	-	무급일
22. 11. 08.	5.5kg	1.5kg		

2) 한청

표 3. ‘한청’ 급료 세부 정보

날짜	닭고기	소고기	합계	비고
22. 10. 31.	3.5kg	1.5kg	5.0kg	
22. 11. 01.	3.0kg	1.5kg	4.5kg	
22. 11. 02.	3.0kg	1.5kg	4.5kg	
22. 11. 03.	3.0kg	1.5kg	4.5kg	
22. 11. 04.	3.5kg	1.5kg	5.0kg	
22. 11. 05.	3.5kg	1.5kg	5.0kg	
22. 11. 06.	3.5kg	1.5kg	5.0kg	
22. 11. 07.	3.5kg	1.5kg	5.0kg	
22. 11. 08.	3.0kg	1.5kg	4.5kg	

※ 노령개체로 무급일 없이 사료급여

3) 한

표 4. ‘한’ 급료 세부 정보

날짜	닭고기	소고기	합계	비고
22. 10. 31.	-	-	-	무급일
22. 11. 01.	5.5kg	1.5kg	7.0kg	
22. 11. 02.	5.5kg	1.5kg	7.0kg	
22. 11. 03.	5.5kg	1.5kg	7.0kg	
22. 11. 04.	6.0kg	1.5kg	7.5kg	
22. 11. 05.	6.0kg	1.5kg	7.5kg	
22. 11. 06.	6.0kg	1.5kg	7.5kg	
22. 11. 07.	-	-	-	무급일
22. 11. 08.	5.5kg	1.5kg	7.0kg	

4) 도

표 5. ‘도’ 급료 세부 정보

날짜	닭고기	소고기	합계	비고
22. 10. 31.	-	-	-	무급일
22. 11. 01.	4.0kg	1.5kg	5.5kg	
22. 11. 02.	4.0kg	1.5kg	5.5kg	
22. 11. 03.	4.0kg	1.5kg	5.5kg	
22. 11. 04.	4.5kg	1.5kg	6.0kg	
22. 11. 05.	4.5kg	1.5kg	6.0kg	
22. 11. 06.	4.5kg	1.5kg	6.0kg	
22. 11. 07.	-	-	-	무급일
22. 11. 08.	4.0kg	1.5kg	5.5kg	

5) 태범

표 6. ‘태범’ 급료 세부 정보

날짜	닭고기	소고기	합계	비고
22. 10. 31.	-	-	-	무급일
22. 11. 01.	4.5kg	1.5kg	6.0kg	
22. 11. 02.	4.5kg	1.5kg	6.0kg	
22. 11. 03.	4.5kg	1.5kg	6.0kg	
22. 11. 04.	5.0kg	1.5kg	6.5kg	
22. 11. 05.	5.0kg	1.5kg	6.5kg	
22. 11. 06.	5.0kg	1.5kg	6.5kg	
22. 11. 07.	-	-	-	무급일
22. 11. 08.	4.5kg	1.5kg	6.0	

6) 무궁

표 7. ‘무궁’ 급료 세부 정보

날짜	닭고기	소고기	합계	비고
22. 10. 31.	-	-	-	무급일
22. 11. 01.	4.0kg	1.0kg	5.0kg	
22. 11. 02.	4.0kg	1.0kg	5.0kg	
22. 11. 03.	3.5kg	1.0kg	4.5kg	
22. 11. 04.	3.5kg	1.0kg	4.5kg	
22. 11. 05.	3.5kg	1.0kg	4.5kg	
22. 11. 06.	4.0kg	1.0kg	5.0kg	
22. 11. 07.	-	-	-	무급일
22. 11. 08.	4.0kg	1.0kg	5.0kg	

라. 개체별 특이사항

- 한청(♀) : 좌측 아래송곳니 탈락, 노령개체로 양쪽 전지 떨림 증상
- 우리(♂) : 2023년 6월 장염증세를 보임
- 도 (♀) : 분변 채취 시 발정상태

마. 사업 추진 내용

1) DNA 추출 및 16S rRNA 유전자 증폭

- 채취한 분변 샘플에서 장내 미생물의 DNA를 추출하기 위해 QIAGEN Power Soil DNA Kit(QIAGEN, Hilden, Germany) 사용
- 추출된 DNA의 농도와 순도는 Nanodrop 분광광도계 및 Qubit 형광계를 사용하여 측정되었으며, 약 900ng의 DNA가 샘플당 확보되어 Bioanalyzer를 통해 DNA의 품질을 추가로 검증 진행

2) 내부 QC 결과

- 장내 미생물 군집의 다양성과 구성을 분석하기 위해 장내 미생물 다양성 분석에서 주로 활용되는 16S rRNA 유전자 V3-V4 영역을 증폭
- 16S-F와 16S-R 프라이머를 사용하여 특정 DNA 조각을 증폭함으로써 장내 미생물의 다양성 향상

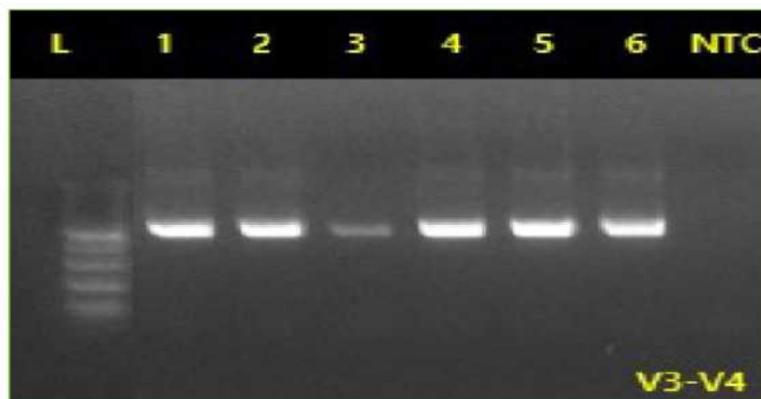


그림 1. 내부 QC 결과

3) 실험 프로토콜 도식화

A. 16S rRNA analysis

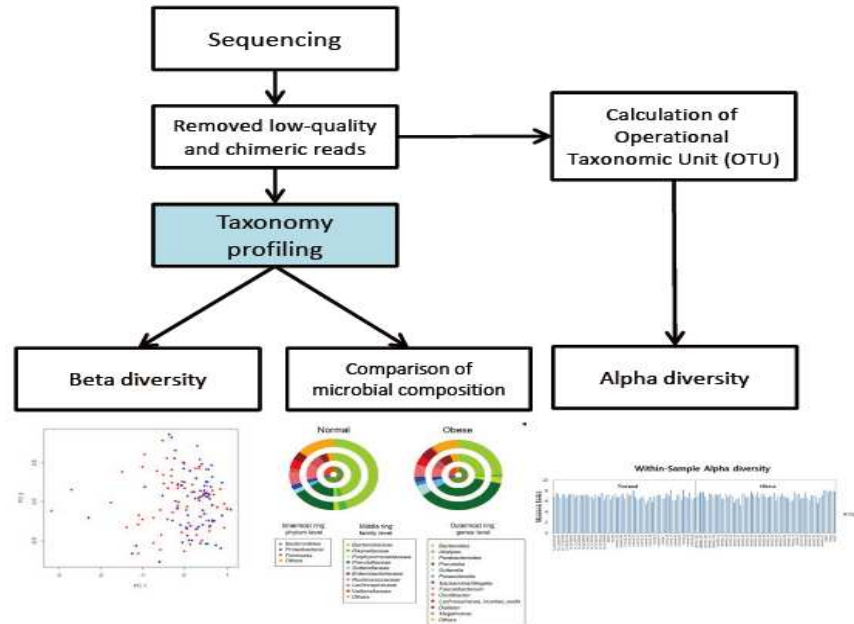


그림 2. 실험 프로토콜 모식도

4) 라이브러리 준비 및 시퀀싱

- 증폭된 PCR 산물은 AMPure XP 비드를 사용하여 정제하였고, Nextera XT DNA 라이브러리 준비 키트를 이용해 시퀀싱 라이브러리 제작
- Illumina MiSeq 플랫폼에서 $2 \times 300\text{bp}$ 쌍읽기 시퀀싱으로 시퀀싱을 수행하여 각 샘플에서 고품질 시퀀스 데이터를 확보
- 시퀀싱은 자동화된 품질 관리와 클러스터 생성을 통해 진행되었으며, 샘플 간 시퀀스 리드 균등하게 분배

5) 데이터 전처리 및 품질 관리

- 생성된 시퀀싱 리드는 FastQC를 사용하여 품질 점검을 거쳤으며, Cutadapt를 이용해 Phred 점수 20 미만의 저품질 리드 제거
- DADA2 파이프라인을 사용하여 샘플 내의 노이즈를 제거하고, 중복된 리드 및 불필요한 어댑터 시퀀스를 필터링하여 앰플리콘 시퀀스 변형체(ASV) 생성
- 위 과정을 통해 높은 정확도의 분석이 진행되었으며, 품질 필터링된 시퀀스는 QIIME2 파이프라인을 통한 분류 진행

6) 알파 다양성 분석

- 알파 다양성은 각 샘플 내 미생물군의 종 풍부도와 균등도를 평가하는 지표로써, 다음의 알파 다양성 지표를 사용하여 개체 간의 미생물군 차이 비교 분석
 - Chao1 지수 : 종의 풍부도(특정 샘플에서 발견된 종의 수)를 측정
 - Shannon 지수 : 종의 풍부도와 균등도를 동시에 고려한 지수
 - Simpson의 다양성 지수 : 균등도와 종의 분포를 고려하여 종 간의 균형 정도 평가
 - Pielou의 균등도 지수 : 샘플 내의 종 균등도를 계산하여 균형도 평가
 - Faith의 계통 다양성 : 종 사이의 계통적 관계를 고려한 지수로, 계통적으로 관련된 종이 풍부할수록 값이 증가
 - 이들 지표를 바탕으로 개체 간 미생물 다양성 차이를 평가하였으며, 통계적으로 유의한 차이는 Wilcoxon Rank-Sum Test를 통한 검증 진행

7) 베타 다양성 분석

- 베타 다양성은 서로 다른 개체 간 미생물군의 구성 차이를 평가하는 지표로, 다양한 지표를 통해 개체 간 미생물 다양성의 변화를 시각화 및 분석
 - Bray-Curtis 거리 지표 : 각 샘플 간 미생물군의 유사성과 차이를 측정하는 지표로, 미생물의 상대적 비율을 고려하여 차이를 평가
 - Jaccard 거리 지표 : 존재 여부만을 고려하여 미생물군의 유사성을 측정
 - Unifrac 지표 : 샘플 간 계통적 관계를 반영하는 지표로, 계통적 차이를 고려하여 미생물군의 분포 차이를 평가
 - 베타 다양성은 시각적으로 군집의 분포와 차이를 확인하기 위해 비메트릭 다차원 척도법(NMDS)과 주좌표 분석(PCoA)을 사용하여 분석 결과를 표현
 - PERMANOVA 검정을 통해 군집 간의 통계적 차이 확인과 개체 간 미생물군의 조성 차이의 유의미성 평가 분석

8) 분류학적 프로파일링

- SILVA 데이터베이스를 활용하여 샘플의 미생물군을 계통 수준(문, 강, 목, 과, 속)으로 분류
- 각 샘플에서 지배적인 미생물군 과목과 백두산 호랑이 개체군의 장내 미생물 생태 종합 평가
- 미생물군 간의 차이를 교정하기 위해 마이크로바이옴 구성 분석 및 편향 보정 분석(ANCOM)을 적용하여 미생물군의 차이 검출

2. 결과 및 고찰

가. 연구결과

1) 알파 다양성 분석 결과

- 알파 다양성 분석을 통한 개체별 장내 미생물군의 종 풍부도와 균등도 평가
- 특정 개체가 얼마나 다양한 미생물을 보유하고 있는지, 그 미생물들이 균등하게 분포되어 있는지를 확인하는 데 중요한 지표
 - 호랑이 2와 6 : 이들 개체는 높은 Chao1 지수와 Faith의 계통 다양성 지수를 나타내어 종 풍부도와 계통적 다양성이 상대적으로 높게 평가됨
 - 위 결과는 건강 상태가 양호하고 다양한 미생물군이 균형 있게 분포되어 있음을 시사함
 - 호랑이 3 : 호랑이 3의 경우 Shannon 지수와 Simpson의 다양성 지수에서 낮은 값을 보이며, 미생물 균등도가 떨어지는 것으로 나타남
 - 이는 해당 개체가 장내 미생물 불균형(dysbiosis)을 경험할 가능성이 있음을 시사하며, 수술 이력과 제한된 식단이 영향을 미쳤을 것으로 관찰됨

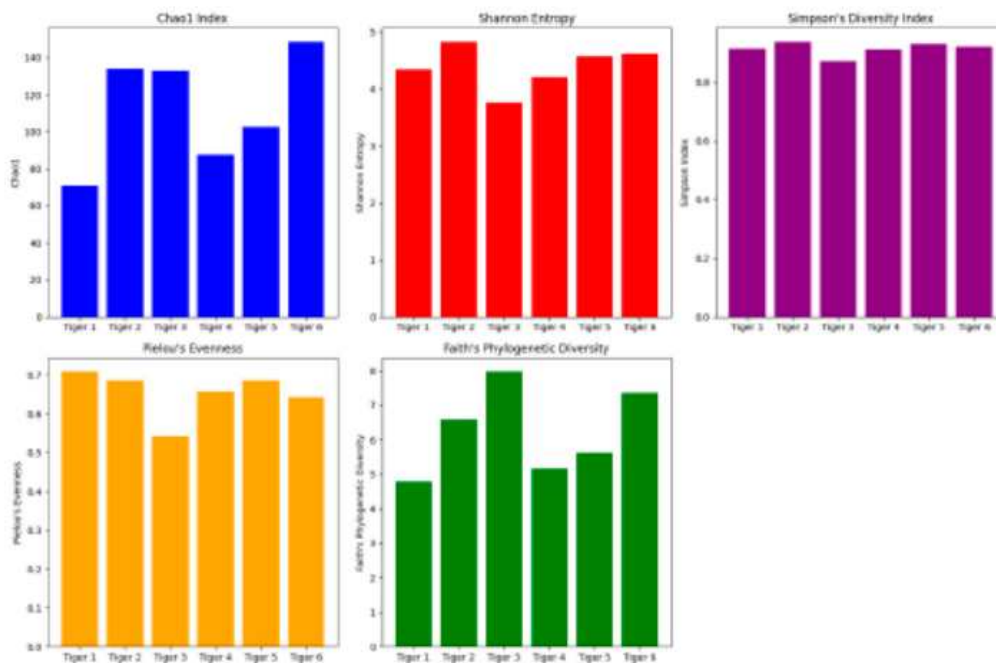
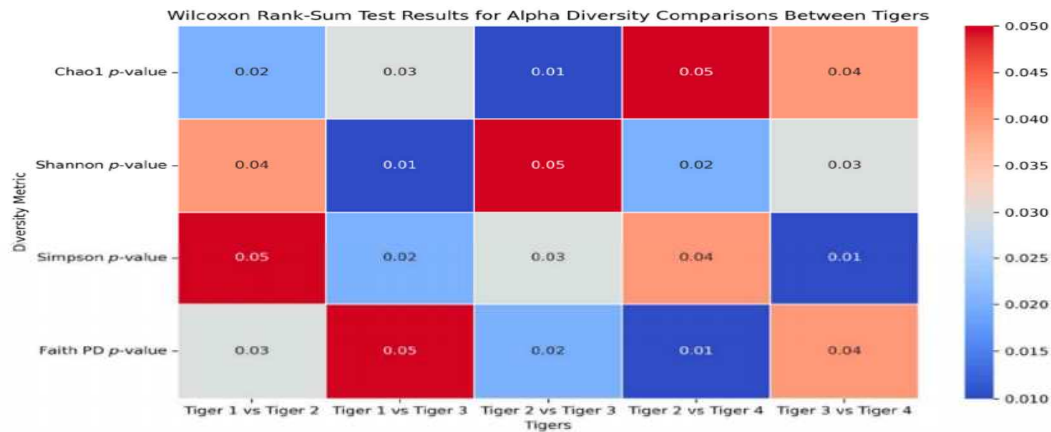


Figure 1. Bar plots illustrating the alpha diversity indices (Chao1, Shannon Entropy, Simpson's Diversity Index, Pielou's Evenness, and Faith's Phylogenetic Diversity) for the gut microbiome of six Siberian tigers.

그림 3. 알파 다양성 분석

- 통계적으로 유의미한 차이를 검증하기 위해 실시한 Wilcoxon Rank-Sum Test 결과, 보충 (그림 4)은 호랑이 6과 호랑이 3 간에 알파 다양성 지표에서 유의미한 차이가 관찰되었다($p < 0.05$). 이 차이는 개체의 건강 상태와 장내 미생물 다양성 사이의 연관성을 더욱 뒷받침함



Supplementary Figure S1. Detailed results of the Wilcoxon Rank-Sum Test comparing alpha diversity indices between individual tigers.

그림 4. Wilcoxon Rank-Sum Test 결과

2) 베타 다양성 분석 결과

- 베타 다양성 분석은 개체 간 장내 미생물 군집의 차이를 시각적으로 평가하고 통계적으로 검증하는데 사용
- Bray-Curtis, Jaccard, Unweighted 및 Weighted UniFrac 지표를 사용하여 개체 간 미생물 군집의 구성 비교

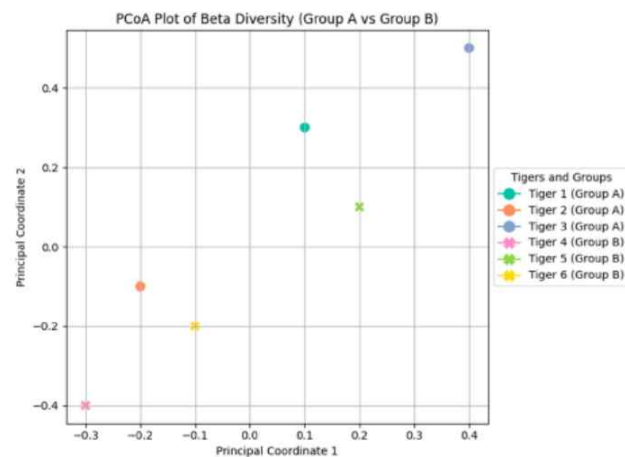
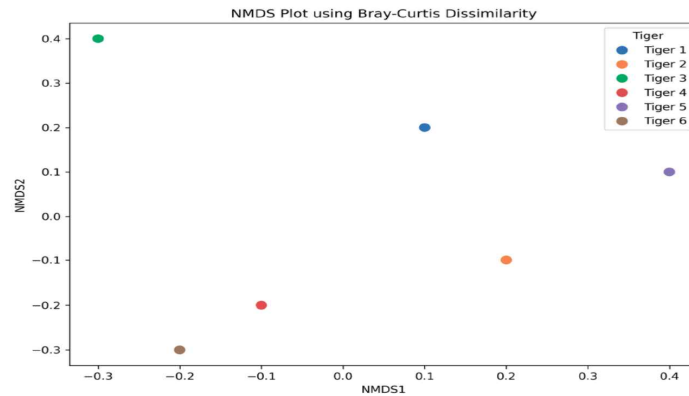


Figure 2. PCoA plot illustrating the beta diversity analysis comparing Group A (Tigers 1, 2, and 3) and Group B (Tigers 4, 5, and 6) based on Bray-Curtis dissimilarity.

그림 5. 베타 다양성 분석

- 그룹 간 차이 : 그림6는 Bray-Curtis 불일치 지수를 사용한 주좌표 분석(PCoA) 결과, Tiger 1, 2, 3으로 구성된 그룹 A와 Tiger 4, 5, 6으로 구성된 그룹 B 간에 미생물 군집의 구성이 명확하게 구분됨.

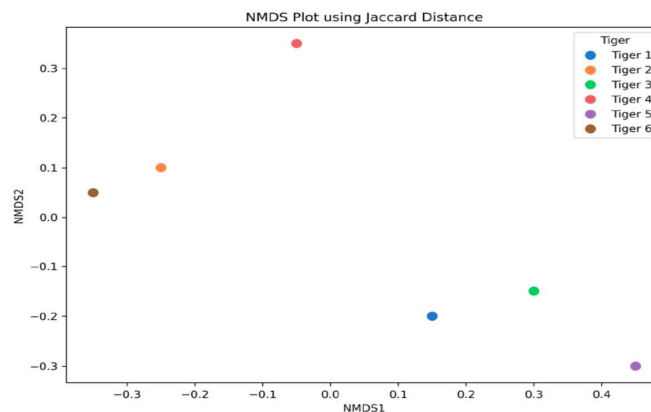


Supplementary Figure S2. NMDS plot using Bray-Curtis dissimilarity, depicting the microbial community composition of the six tigers.

그림 6. Bray-Curtis 불일치 지수

위 그림은 각 개체의 미생물 군집이 Bray-Curtis 거리 기반으로 NMDS(Non-metric Multidimensional Scaling)를 통해 분포되는 양상을 나타내며, 두 그룹 간의 미생물 군집 구성이 다를 수 있음을 확인할 수 있음

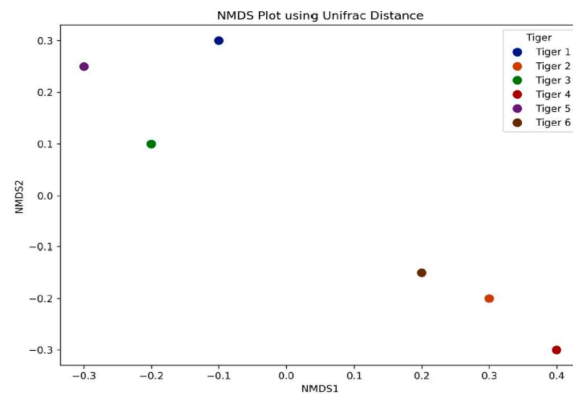
- Jaccard 거리 지표 분석 : 보충 그림 7에서는 Jaccard 거리 지표를 사용한 NMDS 분석 결과가 시각화되어 있다. 이 분석은 개체 간 미생물의 존재 여부를 바탕으로 유사성을 평가하였으며, 그룹 간에 뚜렷한 미생물 군집의 구분이 확인되었다. 특히, Jaccard 거리 기반 분석은 개체별 미생물 군집의 독특한 구성을 나타내며, 장내 미생물 다양성의 건강 관련 지표로 활용될 수 있다.



Supplementary Figure S3. NMDS plot using Jaccard distance, displaying the microbial community composition of the six tigers.

그림 7. Jaccard 거리 지표

- UniFrac 지표 분석 : 그림 8은 Unweighted 및 Weighted UniFrac 지표를 사용한 NMDS 분석 결과를 포함하고 있음. UniFrac 지표는 개체 간 미생물 군집의 계통적 관계를 반영하는 지표로, 개체 간의 미생물 군집 구성이 계통적 유사성에 따라 어떻게 구분되는지를 보여준다. Unweighted UniFrac 분석은 미생물군의 존재만을 고려하는 반면, Weighted UniFrac 분석은 미생물의 상대적 비율까지 반영하여 각 개체의 미생물 다양성을 세밀하게 평가함



Supplementary Figure S4. NMDS plots using unweighted UniFrac and weighted UniFrac metrics, representing the phylogenetic dissimilarity of microbial communities in the six tigers.

그림 8. UniFrac 지표

- PERMANOVA 검정 결과 : 베타 다양성 분석의 군집 간 차이가 통계적으로 유의미한지를 검증하기 위해 PERMANOVA 검정을 실시함. 분석 결과, 두 그룹 간 미생물 군집의 구성이 통계적으로 유의미한 차이를 보였으며($p < 0.05$), 이는 개체별 건강 상태와 식이 조건이 장내 미생물 군집의 구성에 영향을 미친다는 점을 시사된다. 이러한 결과는 개체별 맞춤형 건강 관리 방안 수립에 유용한 기초 자료가 될 수 있음
- 시각화된 베타 다양성 분석 결과는 백두산 호랑이 개체 간 장내 미생물 군집의 구성을 비교하고, 군집 간의 차이가 건강 상태 및 개체 특성과 어떻게 연관되는지를 보여준다. 특히, 미생물 군집의 계통적 유사성을 반영한 UniFrac 분석은 건강 상태와 미생물 다양성의 관계를 심층적으로 이해하는 데 기여할 수 있으며, 이는 향후 보존 전략 수립과 건강 관리에 중요한 자료로 활용될 수 있음

3) 분류학적 구성을 통한 장내 미생물 생태 분석

- 백두산 호랑이의 장내 미생물 생태를 평가하기 위해 미생물 군집을 문(phylum), 강(class), 목(order), 과(family), 속(genus) 수준에서 분류 진행
- 개체별 장내 미생물군 구성이 개체의 건강상태와 상관관계 분석

Table 3. Dominant taxa at each taxonomic level among the six Siberian Tigers.

Taxonomic Level	Dominant Taxon	Relative Abundance (%)
Phylum	<i>Firmicutes</i>	52.8
Class	<i>Clostridia</i>	38.4
Order	<i>Clostridiales</i>	34.2
Family	<i>Lachnospiraceae</i>	27.6
Genus	<i>Clostridium sensu stricto</i>	19.5

표 2. 분류학적 수준 우세군

- 문(Phylum) : 분석된 백두산 호랑이의 장내 미생물군에서 가장 우세한 문은 Firmicutes와 Bacteroidota로, 이들은 대부분의 개체에서 높은 비율로 발견됨
- Firmicutes(약 52.8%) : Firmicutes는 에너지 대사와 지방 흡수에 중요한 역할을 하는 미생물로 알려져 있으며, 특히 건강한 개체에서 높은 비율로 나타남. 이 문은 단쇄 지방산(SCFA) 생산에 기여하며, 장내 균형을 유지하는 데 필수적으로 요구됨
- Bacteroidota(약 8.3%) : Bacteroidota는 주로 섬유질을 분해하고, 장내 환경의 pH를 낮추어 건강한 미생물 군집 유지에 기여됨. Bacteroidota는 일반적으로 건강한 장내 미생물 생태계를 구성하는 중요한 요소로 작용됨

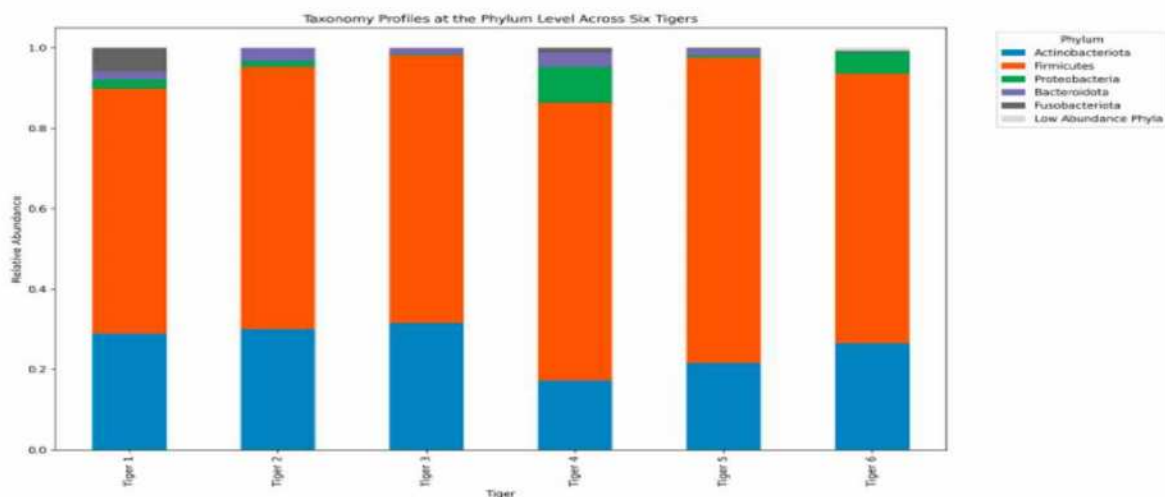
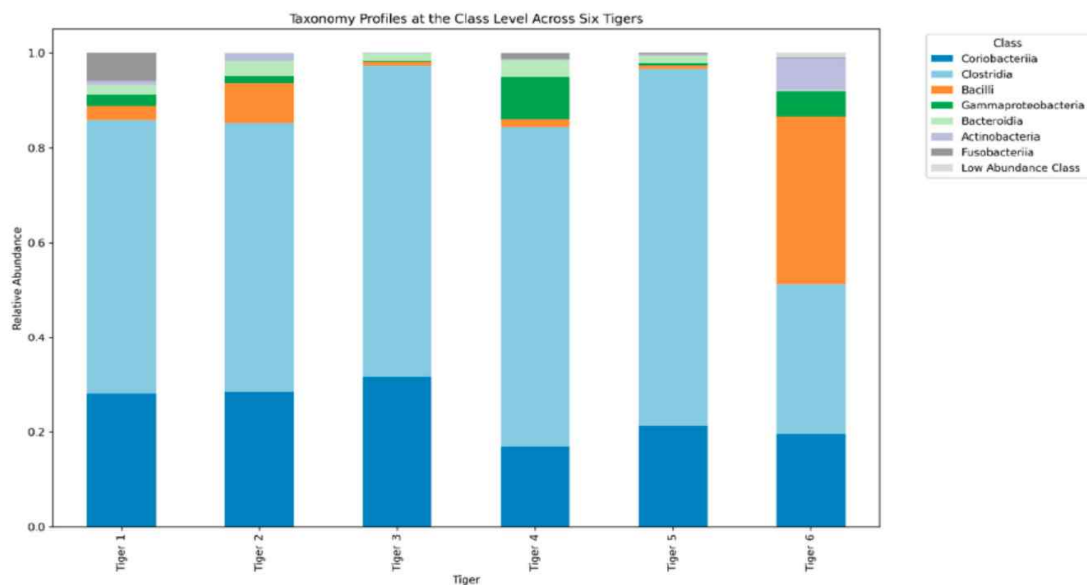


Figure 3. Stacked bar plot depicting the relative abundance of microbial communities at the phylum level across the six Siberian tigers.

그림 9. 문 단계 분류

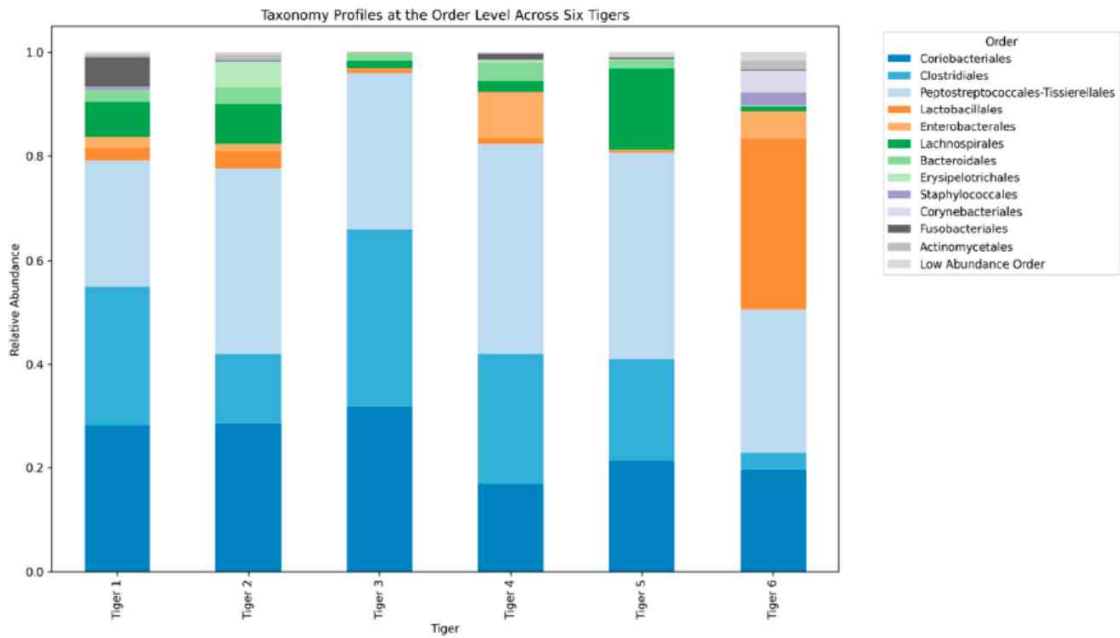
- 강(Class) : 강 단계에서 확인된 주요 미생물들을 강 수준에서 세분화하여 분석한 결과는 다음과 같음
 - Clostridia : Firmicutes 문에 속하는 Clostridia 강은 단쇄 지방산 생성에 중요한 역할을 하며, 대부분의 백두산 호랑이에서 높은 비율로 나타난다. 이 강은 장내 미생물 균형 유지에 중요한 요소로, 특히 건강한 개체에서 많이 관찰되었다.
 - Bacteroidia : Bacteroidia 강은 Bacteroidota 문에 속하며, 섬유질 분해와 영양 흡수에 기여한다. 이 미생물은 Tiger 2와 Tiger 6에서 상대적으로 풍부하게 발견되었으며, 이는 건강한 장내 환경과의 연관성을 시사한다.



Supplementary Figure S5. Stacked bar plot illustrating the relative abundance of microbial communities at the Class level among six Siberian tigers.

그림 10. 강 단계 분류

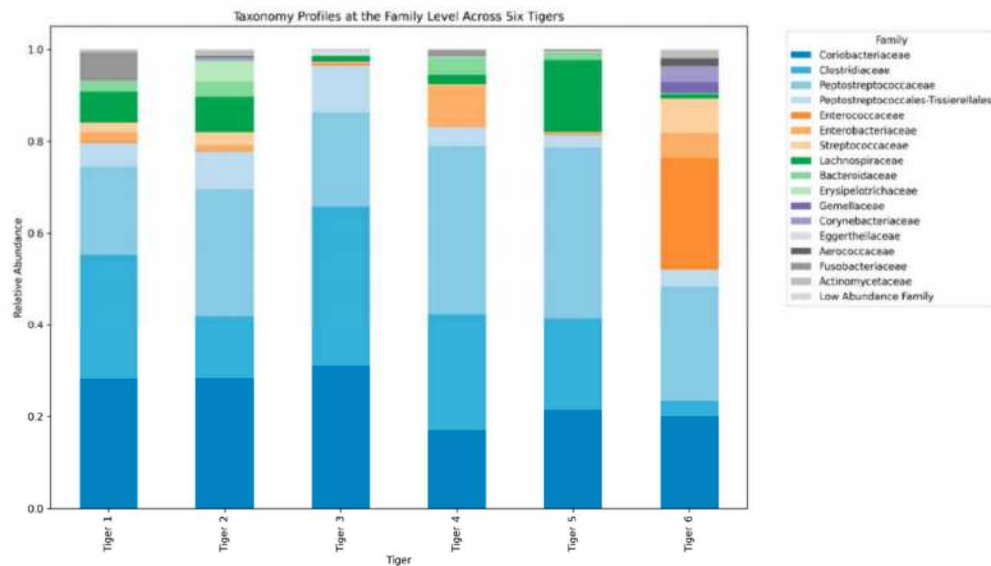
- 목(Order) : 각 목에서 확인된 미생물 군집을 목 수준으로 세분화하여 분석한 결과, 주요한 목은 Clostridiales와 Bacteroidales로 나타남
 - Clostridiales : Clostridiales 목은 장내 유익균을 포함한 다양한 미생물 군집으로 구성되어 있으며, 이들은 주로 건강한 개체에서 높은 비율로 관찰됨. Clostridiales는 면역 조절과 장내 환경 안정화에 기여하는 것으로 알려져 있음
 - Bacteroidales : Bacteroidales 목은 Tiger 2와 Tiger 6에서 특히 높게 나타났으며, 이들은 주로식이섬유를 분해하는 역할을 함. Bacteroidales는 장내 건강 유지에 기여하는 주요 미생물로, 건강한 개체에서 많이 관찰됨



Supplementary Figure S6. Stacked bar plot showing the relative abundance of microbial communities at the Order level among six Siberian tigers.

그림 11. 목 단계 분류

- 과(Family) : 과 수준에서 분석된 주요 미생물 군집을 과 수준에서 세분화하여 건강과의 연관성을 평가한 결과는 다음과 같음
 - Lachnospiraceae : Clostridiales 목에 속하는 Lachnospiraceae는 장내 단쇄 지방산을 생성하여 장내 산성도를 높임으로써 병원균의 성장을 억제하는 역할을 함. Lachnospiraceae는 Tiger 2와 Tiger 6에서 풍부하게 관찰되었으며, 이는 건강한 장내 환경과 연관이 있는 것으로 판단됨
 - Ruminococcaceae : Ruminococcaceae는 장내 섬유질을 분해하여 에너지로 전환하는데 기여하며, 건강한 개체에서 높은 비율로 나타남. 이 과는 장내 균형을 유지하는데 중요한 역할을 하며, 소화와 영양 흡수를 도움
 - Enterobacteriaceae : Enterobacteriaceae는 주로 병원성 균주로 구성되어 있으며, 건강 이상을 시사하는 주요 지표로 작용할 수 있음. 이 과는 Tiger 3에서 높은 비율로 관찰되었으며, 이는 건강 문제와 장내 불균형을 나타내는 징후로 해석될 수 있음



Supplementary Figure S7. Stacked bar plot depicting the relative abundance of microbial communities at the Family level among six Siberian tigers.

그림 12. 과 단계 분류

- 속(Genus) : 속 수준에서 분석된 주요 미생물 군집을 속 수준에서 세분화하여 건강과의 연관성을 평가한 결과는 다음과 같음
- Clostridium sensu stricto : 대부분의 백두산 호랑이에서 주요하게 발견된 속으로, 특히 Tiger 2와 Tiger 6에서 높은 비율을 차지함 이 속은 단쇄 지방산(SCFA)을 생성하여 장내 환경을 산성화하고 유익균의 성장을 촉진하는 역할을 함. 장내 건강을 유지하는데 필수적인 이 균은 건강한 호랑이 개체에서 상대적으로 풍부하게 나타남
- Lactobacillus : Lactobacillus 속은 장내 환경을 안정화하고 면역력을 강화하는 주요 유산균으로, Tiger 2와 Tiger 6에서 상대적으로 높은 비율로 관찰됨. 이 미생물 속은 장내 균형 유지에 기여하며, 감염성 병원균의 증식을 억제하는 역할을 함. Lactobacillus는 다양한 장내 기능을 지원하는 프로바이오틱스 역할을 하여 건강한 장내 미생물군 구성을 형성하는 데 기여함
- Escherichia-Shigella : Escherichia-Shigella 속은 Tiger 3에서 높은 비율로 나타났으며, 이 속은 일반적으로 장내 감염과 관련된 병원균으로 알려져 있음
- Escherichia-Shigella는 장내 염증을 유발하거나 건강 불균형(dysbiosis)의 징후로 나타날 수 있으며, 이는 Tiger 3의 건강 상태가 다른 개체에 비해 좋지 않음을 나타내는 지표로 해석될 수 있음. 특히, 장내 불균형이 있는 개체에서 이 속이 우세하게 나타나는 경향이 관찰됨
- Bacteroides : Bacteroides 속은 대부분의 개체에서 발견되었으며, 이 속은 장내에서

섬유질 분해 및 단쇄 지방산 생성에 중요한 역할을 함. 이는 장내 에너지 대사와 영양 흡수에 기여하며, 특히 건강한 장내 미생물 군집의 균형을 유지하는 데 중요한 역할을 함. Bacteroides는 개체의 식이와 장내 환경의 변화에 민감하게 반응하여 건강 모니터링의 지표로 활용될 수 있음

· Prevotella : 일부 개체에서는 Prevotella 속이 관찰되었으며, 이는 주로 식이섬유가 풍부한 식단과 연관이 있는 미생물로 알려져 있음. Prevotella는 장내 점액층 형성을 촉진하고, 다양한 대사 과정에서 중요한 역할을 함. 이 속은 주로 장내 환경에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 개체가 섭취하는 식단에 따라 그 비율이 달라질 수 있음

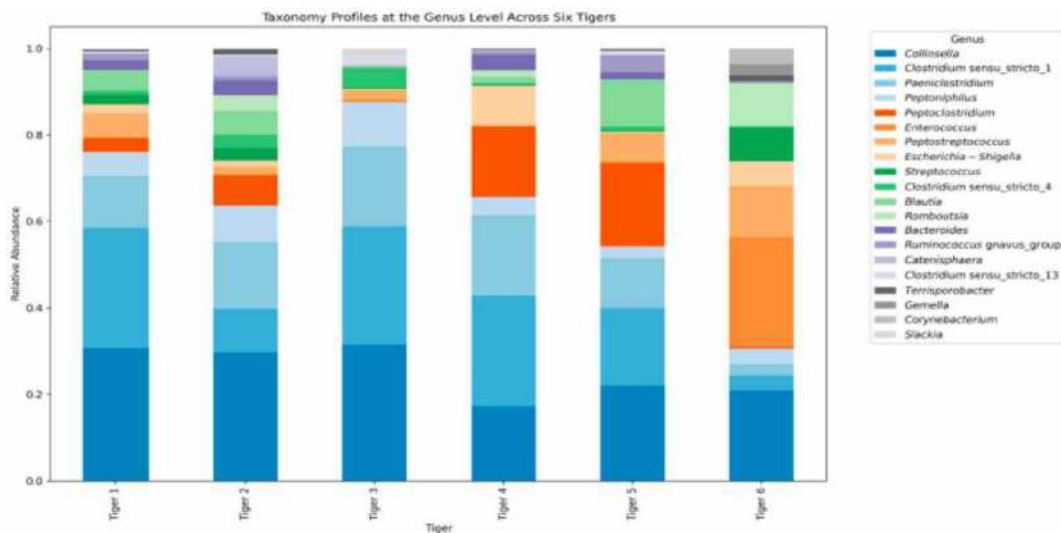


Figure 4. Stacked bar plot illustrating the relative abundance of microbial communities at the genus level among the six Siberian tigers.

그림 13. 속 단계 분류

- 이와 같이, 백두산 호랑이의 장내 미생물군을 문, 강, 목, 과 수준으로 분석함으로써 개체별 건강 상태와 밀접하게 연관된 미생물 군집을 파악할 수 있음. 특히, Lachnospiraceae와 Ruminococcaceae와 같은 유익균이 건강한 개체에서 우세하게 나타난 반면, Enterobacteriaceae와 같은 병원성 균주는 건강 불균형이 의심되는 개체에서 높게 나타남. 또한, Clostridium sensu stricto, Lactobacillus와 같은 유익한 미생물 속은 건강한 개체에서 높은 비율로 나타났으며, Escherichia-Shigella와 같은 병원성 속은 건강 불균형이 있는 개체에서 증가하는 경향을 보임. 이러한 미생물군의 세부 분석 결과는 개체별 장내 환경을 이해하고, 맞춤형 건강 관리 및 보존 전략을 마련하는 데 중요한 기초 자료로 활용될 수 있음

3. 시사점

가. 향후 사업 제안

- 본 사업은 백두산 호랑이의 장내 미생물 군집의 다양성과 구성을 체계적으로 분석하여 개체의 건강상태와 장내 미생물군의 관계를 규명하고, 이를 바탕으로 민감성 바이오마커 개발 가능성을 탐색함. 위 결과를 통하여 장내 미생물 다양성은 호랑이의 건강상태를 반영하는 중요한 지표로 작용할 수 있는 중요성을 확인하였으나, 보다 구체적인 결론 도출을 위한 후속 사업 진행이 필요하다고 판단됨

1) 샘플 수 확장

- 국내 유관기관의 협업을 통하여 시료 샘플 수 확대
- 비교군의 증가로 통계적 신뢰도를 상승시켜 장내 미생물 군집에 미치는 영향을 보다 명확히 파악하는 것이 필요

* '23~'24년도에 채취한 광주동물원, 서울대공원 등 유관기관의 백두산호랑이 분변시료 추가 분석 중으로 '24년 결과와 비교해서 장내 microbiome 사업 확대 예정('25 예정)

2) 기능적 분석 도입

- 미생물군의 대사 기능과 면역 조절 역할 평가 사업으로 확대
- 메타게놈 및 메타볼로믹스 기술 도입으로 특정 미생물이 건강 유지 기여도 분석

3) 장기적 모니터링 시스템 구축

- 정기적인 미생물 데이터 수집과 분석을 통해 개체의 건강 변화 추이 관찰 모니터링 시스템을 도입
- 데이터 축적을 통한 보완으로 맞춤형 건강관리 및 보전전략 프로그램 개발

Ⅲ. 주요성과 및 기대효과

1. 주요성과

가. 계량성과

구분	1. 정책건의		2. 논문게재		3. 산업재산권			4. 홍보	
	제정	개정	국내논문	Scopus, SCIE 이상	출원	등록	기술 이전	보도자료	기고
2024년				1					

나. 비계량성과

1) 장내 미생물군의 건강상태 모니터링

- Lachnospiraceae와 Clostridium sensu stricto : 호랑이 2와 호랑이 6에서 높은 비율로 나타난 Lachnospiraceae와 Clostridium sensu stricto는 장내 건강에 중요한 역할을 하는 것으로 알려짐. 이러한 미생물군은 단쇄 지방산(SCFA) 생성에 관여하여 장내 환경을 산성화하고 유익균의 성장을 촉진함으로써 면역력을 강화함
- Enterobacteriaceae와 병원성 미생물 : 건강 이상이 관찰된 호랑이 3에서 높은 비율로 발견된 Enterobacteriaceae는 장내 불균형의 지표로, 감염 가능성과 건강 악화를 시사함

2) 백두산호랑이 건강관리 지표 개발 기반구축

- 백두산호랑이의 장내 미생물 군집의 다양성과 구성의 유전정보 확보와 개체의 건강상태와 장내 미생물군의 관계 수립
- 위 데이터는 개체별 맞춤형 건강관리 프로그램 개발의 기초자료 활용 및 건강상태를 반영하는 중요 생체지표 개발 가능성 확인

2. 성과 활용방안

가. 맞춤형 건강 관리 프로그램 구축

- 백두산 호랑이 개체별 건강 상태와 장내 미생물군 구성의 차이를 고려하여, 맞춤형 건강 관리 프로그램 수립

- 장내 미생물군의 불균형이 발견된 개체에게는 특정 유익균을 포함한 프로바이오틱스 보충제를 제공하거나, 미생물군 구성을 개선할 수 있는 맞춤형 식단 제공

나. 장기 모니터링 시스템 구축

- 장내 미생물 데이터를 수집 및 분석하여 개체별 건강상태 변화 추적 모니터링 시스템 구축
- 개체의 건강 이상을 조기에 발견하여 예방하며, 사육 개체의 건강관리에 활용

다. 기능적 분석을 통한 심층 분석기술 수행

- 미생물군의 기능적 역할 기술분석 확대를 위해 메타게놈 분석하여 대사기능과 면역 반응의 관계성 분석을 통한 건강에 필수적인 미생물 추적
- 장내 미생물의 대사적 기능을 파악하여 특정 미생물군이 개체의 건강유지와 질병 예방의 관계성 규명

라. 서식지와 보존을 위한 장내 미생물 생태 분석

- 특정 미생물은 특정 환경적 조건이나 먹이 종류와 연관되어 발견됨으로, 환경 변화와 개체군의 관계성 분석에 데이터 활용
- 특정 서식지 환경에 적응한 미생물 생태계가 조성되는 것을 바탕으로 서식지 보존의 필요성 강조
- 본 사업의 고려 사항과 추천 방안은 백두산 호랑이의 장기적인 건강 관리와 보전에 기여할 수 있는 실질적인 방법을 제시하며, 이는 멸종위기종의 지속 가능한 보전 전략 수립에 중요한 기초 자료로 활용될 수 있다.

3. 기대효과

가. 환경적 측면

- 국제적 멸종위기종의 맞춤형 보전관리를 위한 기초자료 수립에 기여
- 한정적 자원의 유전정보를 기반으로 지속 평가 가능한 생물다양성 보전·관리 시스템 기틀을 마련하여 백두대간 생태계 복원의 다양한 가능성 제시

나. 기술적 측면

- 백두산호랑이의 생물학적 유전정보를 통한 야생동물 비상진료 방안 및 진료체계 구축
- 야생동물의 질병 치료와 예방, Biomarker 개발 등 수의학적 관리체계 수립에 활용

다. 사회적 측면

- 한반도 생물다양성에 대한 관심을 이끌어 내고 자연에 대한 이해도 상승과 보전 측면의 경각심 상승
- 국제적 멸종위기종 유전정보에 대한 객관적인 자료 확보로 국내 백두산호랑이의 주권을 확보함으로써 생물다양성 부국으로 도약

라. 교육적 측면

- 산학 공동산업을 통한 야생동물 관련분야 저변 확대와 국내 전문가의 기술력 상승
- 야생동물 Biotech 산업의 발전으로 관련분야 전공자의 기술개발 의욕 고취

IV. 참 고 문 헌

1. IUCN. *Red List of Threatened Species: Panthera tigris altaica*. Available online: <https://www.iucnredlist.org> (accessed on 2024.7.).
2. Hooper, L.V.; Littman, D.R.; Macpherson, A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012, 336, 1268–1273, doi:10.1126/science.1223490.
3. He, F.; Liu, D.; Zhang, L.; Zhai, J.; Ma, Y.; Xu, Y.; Jiang, G.; Rong, K.; Ma, J. Metagenomic analysis of captive Amur tiger faecal microbiome. *BMC Vet Res* 2018, 14, 379, doi:10.1186/s12917-018-1696-5.
4. Ley, R.E.; Hamady, M.; Lozupone, C.; Turnbaugh, P.J.; Ramey, R.R.; Bircher, J.S.; Schlegel, M.L.; Tucker, T.A.; Schrenzel, M.D.; Knight, R.; et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008, 320, 1647–1651, doi:10.1126/science.1155725.
5. Muegge, B.D.; Kuczynski, J.; Knights, D.; Clemente, J.C.; González, A.; Fontana, L.; Henrissat, B.; Knight, R.; Gordon, J.I. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* 2011, 332, 970–974, doi:10.1126/science.1198719.
6. Clayton, J.B.; Vangay, P.; Huang, H.; Ward, T.; Hillmann, B.M.; Al-Ghalith, G.A.; Travis, D.A.; Long, H.T.; Tuan, B.V.; Minh, V.V.; et al. Captivity humanizes the primate microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016, 113, 10376–10381, doi:doi:10.1073/pnas.1521835113.
7. Gani, M.; Mohd-Ridwan, A.R.; Sitam, F.T.; Kamarudin, Z.; Selamat, S.S.; Awang, N.M.Z.; Karuppannan, K.V.; Md-Zain, B.M. Habitat shapes the gut microbiome diversity of Malayan tigers (*Panthera tigris jacksoni*) as revealed through metabarcoding 16S rRNA profiling. *World J Microbiol Biotechnol* 2024, 40, 111, doi:10.1007/s11274-023-03868-x.
8. Khairulmunir, M.; Gani, M.; Karuppannan, K.V.; Mohd-Ridwan, A.R.; Md-Zain, B.M. High-throughput DNA metabar-coding for determining the gut microbiome of captive critically endangered Malayan tiger (*Pantheratigrisjacksoni*) during fasting. *Biodivers Data J* 2023, 11, e104757, doi:10.3897/BDJ.11.e104757.

9. Zhang, X.; Liao, Y.; Qin, T.; Ma, J.; Liu, J.; Zou, J.; Huang, H.; Zhong, X.; Yang, M. Developmental stage variation in the gut microbiome of South China tigers. *Front Microbiol* 2022, 13, 962614, doi:10.3389/fmicb.2022.962614.
10. Amato, K.R.; Yeoman, C.J.; Kent, A.; Righini, N.; Carbonero, F.; Estrada, A.; Gaskins, H.R.; Stumpf, R.M.; Yildirim, S.; Torralba, M.; et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *Isme j* 2013, 7, 1344–1353, doi:10.1038/ismej.2013.16.
11. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016, 13, 581–583, doi:10.1038/nmeth.3869.
12. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumu-gam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 2019, 37, 852–857, doi:10.1038/s41587-019-0209-9.
13. DeSantis, T.Z.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, E.L.; Keller, K.; Huber, T.; Dalevi, D.; Hu, P.; Andersen, G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72, 5069–5072, doi:10.1128/aem.03006-05.
14. Anderson, M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 2001, 26, 32–46, doi:https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.
15. Lin, H.; Peddada, S.D. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun* 2020, 11, 3514, doi:10.1038/s41467-020-17041-7.
16. Louis, P.; Hold, G.L.; Flint, H.J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol* 2014, 12, 661–672, doi:10.1038/nrmicro3344.
17. Lozupone, C.A.; Stombaugh, J.I.; Gordon, J.I.; Jansson, J.K.; Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012, 489, 220–230, doi:10.1038/nature11550.