

Comparison of Fecal Microbiota between Birth and Weaning of Halla Horses Using 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing

Jongan Lee^{†*}, Young-Jun Kang[†], Jae-Young Choi, Sang-Min Shin and Moon-Cheol Shin

Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 63242, Korea

Received October 18, 2022 / Revised November 29, 2022 / Accepted November 29, 2022

This study was conducted to investigate the taxonomic composition and diversity of fecal microbiota between birth and weaning stages of Halla horses using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis. *Proteobacteria* (35.7%) and *Firmicutes* (45.6%) were identified as the most common phylum in birth and weaning, respectively. *Escherichia* (19.7%) and *Clostridium* (14.0%) were observed as the most dominant genus in birth, and *Fibrobacter* (6.6%) was the highest in weaning. The results of α -diversity showed that the richness and evenness in microbial communities were statistically significant ($p < 0.001$) in birth and weaning. The results of β -diversity indicated that the birth and weaning stages were clearly divided into two groups at the genus and species levels. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) showed that the microbiota composition differences between birth and weaning were statistically significant ($q < 0.001$). A linear discriminant analysis effect (LEfSe) was performed to select taxonomic makers between the birth and weaning stages. On the genus level, *Escherichia*, *Bacteroides*, *Clostridium*, and *Methylobacterium* were relatively abundant at birth, whereas *Fibrobacter* was more abundant at weaning. We expect that this research can be utilized as basic data in the identification of microbial communities involved in disease prevention and nutrient absorption in Halla horses.

Key words : Diversity, fecal microbiota, Halla horses, taxonomic composition

서 론

말산업실태조사 보고서(2022)에 따르면 국내 말 산업 규모는 2020년 기준 약 1조 4천억원으로 추산되고 있으며 향후 COVID-19 팬데믹 상황이 개선됨에 따라 평년 수준인 약 3조원대로 회복될 전망이다[15]. 국내 말 산업의 용도별 비율은 승용마가 42%로 가장 높게 나타났다. 해외의 경우 유럽을 중심으로 다양한 승용마 품종이 개량되었으며 핫블러드와 콜드블러드 교잡종인 워블러드가 스포츠 승마 종목에 주로 이용되고 있다. 국내의 경우 농촌진흥청 국립축산과학원에서 2009년부터 더러브렛과 제주마의 교잡종인 한라마가 한국인 체형에 적합한 국내산 승용마로 개량 및 보급 중이다. 한라마는 지구력 승마와 유소년 승마대회에 활용되었으며 성품이 온순해 재활 승마에 적합한 품종으로 경제적, 산업적 가치가 높다. 건강상태

가 양호하고 발육 상태가 우수한 한라마를 육성하기 위해 성장기 효과적인 영양소 섭취와 흡수가 중요하다.

비반추 초식가축인 말은 타 축종에 비해 소장의 길이가 짧아 소장을 통과할 때 영양소 흡수력이 떨어진다. 소장 내 흡수되지 못한 영양분은 대장의 일부분인 맹장, 대결장에서 미생물에 의해 섬유소 분해, 단백질 및 수용성비타민 합성에 활용된다. 영양소 흡수 개선 및 면역력 강화를 통한 질환 예방을 위해 말 장내 미생물에 대한 체계적인 연구가 선행되어야 한다[4, 8]. 망아지는 생후 3-4개월에 성장이 매우 빠르게 진행되기 때문에 출생시부터 이유기까지 충분한 영양소 공급이 필요하며 영양분 흡수를 돕기 위해 장내 유익균 증진 및 미생물 균형 유지가 필요하다. 이를 위해 장내 미생물에 대한 분포 및 특성에 대한 기본적인 정보 수집이 요구된다. 국외 사례를 살펴보면 더러브렛과 아메리칸 쿼터 호스 자마 37두의 분변을 활용하여 출생시부터 이유기까지 미생물 조성에 대한 분석을 진행했다[5]. 차세대염기서열분석(NGS) 결과 2개월령 자마의 이유기 장내 미생물 조성은 출생시 대비 문(phylum) 수준에서 후벽균(*Firmicutes*), 의간균(*Bacteroidetes*), 우미균(*Verrucomicrobia*) 순으로 우점하는 종들이 보고되었다.

영양소 흡수 외에 장내 미생물은 말 건강관리 및 유지에도 중요한 역할을 한다. 장내 질환이 있는 개체는 건강한 개체의 비해 맹장, 대결장 및 소장의 미생물 불균형이

[†]Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-5712, Fax : +82-64-754-5712

E-mail : amasss@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.

나타난다고 보고되었다[1, 16]. 대장염이 있는 개체는 속(genus) 수준에서 *Escherichia*, *Fusobacterium*가 질환 연관성이 높은 것으로 보고되었다. 성장기 장내 미생물 불균형은 유익균 감소로 이어지고 설사와 같은 장내 질환을 일으키게 된다. 장내 유익균 증진을 위해 다양한 생균제의 급여 효과에 대한 연구가 진행되었다. 생후 2주령 자마 38두를 대상으로 생균제(probiotics) 급여 효과에 대한 분변 미생물 변화가 관찰되었다[17]. 생균제에는 *Lactobacillus* spp. 4종과 *Bifidobacterium animalis* spp.가 포함되어 있으며 급여 후 생후 6주령 자마에서 유산균(*Lactobacillus*)이 대조구에 비해 유의적으로 증가하였음을 보고하였다. 또한, *Lactobacillus rhamnosus*와 *Enterococcus faecium* 유익균 2종이 포함된 생균제를 출생시부터 2주간 경구 투여 후 자마 미생물 조성 변화에 유의미한 효과가 있는지 검증하는 연구가 수행되었다[21]. *Lactobacillus rhamnosus*와 *Enterococcus faecium*이 포함된 생균제를 2주간 급여한 직후 대조구 대비 미생물 군총의 변화는 미비하였지만 이후 2개월령까지 미생물 유사성 감소를 방지하는 효과를 보여 미생물 다양성 및 균형 유지에 도움이 되는 것으로 나타났다. 이와 같이 외국 말 품종의 영양개선 및 질환 예방을 위해 장내 미생물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만 국내산 승용마로 가치가 높은 한라마의 경우 장내 미생물에 대한 연구가 미비한 실정이다. 특히, 출생시 및 이유기 장내 미생물 특성에 대한 기초자료가 부족하고 체계적인 연구가 진행된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 2021년 생산된 한라마의 출생시 및 이유기 분변 샘플을 이용하여 16S 앰플리콘 시퀀싱(16S rRNA gene amplicon sequencing) 데이터를 생산하고 생물정보 분석 기법을 활용해 문 수준에서 종 수준까지 장내 미생물 조성 및 특성을 구명했다. 또한, 미생물 마커 탐색 및 다양성 분석을 통해 출생시 및 이유기 한라마 특이적인 미생물 정보에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

공시동물 및 분변 시료채취

본 연구에 사용된 공시축은 농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산연구소에서 2021년 5월부터 7월에 생산된 자마 27두(수10, 암17)로 평균 체중은 40.6 kg이며 건강상태가 양호한 개체들이다. 분변은 말 직장을 통해 출생시와 이유기(3-4개월령)에 채취하였으며 -70°C 냉동고에 보관하였다. 본 연구의 동물실험은 국립축산과학원 동물실험윤리위원회의 승인(NIAS20212145)을 받았으며 위원회 규정을 준수하며 수행하였다.

gDNA 추출 및 염기서열 분석

gDNA 추출을 위해 QiAamp PowerFecal Pro DNA Kit

(QIAGEN, Hilden, Germany)을 사용했으며 추출된 dsDNA의 농도는 Quant-IT PicoGreen (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)를 통해 정량화 되었다. 추출한 gDNA (2 ng)는 reaction buffer (5x), dNTP (1 mM) 혼합물, F/R PCR primer (500nM) 및 Herculase II fusion DNA polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 사용하여 PCR로 증폭되었다. 16S rRNA 유전자의 V3-V4 영역 증폭을 위해 primer pair (V3-F: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTA TAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3', V4-R: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGA CTACHVGGGTATCTAATCC-3')를 사용했다. 1차 PCR 생성물은 NexteraXT Indexed Primer를 이용하여 인덱스를 포함하는 최종 라이브러리 구축을 위해 사용되었다. 최종 정제된 생성물은 qPCR protocol guide (KAPA Library Quantification kits for Illumina Sequencing platforms)에 따라 정량화 되었고 TapeStation D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)를 사용해 품질을 검증했다. 최종적으로 MiSeq platform (Illumina, San Diego, USA)을 사용해 paired-end (2x300 bp) 시퀀싱 데이터를 생산했다.

생물정보 및 통계 분석

16S rRNA 시퀀싱 데이터(FASTQ format)는 EzbioCloud 플랫폼의 16S-based MTP 프로그램을 활용해 분석했다 [24]. 원시 데이터는 전처리 과정을 거친 후 UCHIME 프로그램[7]을 사용해 자마와 미생물 시퀀스를 동시에 포함하는 chimera reads가 제거되었으며, 유사도 97% cutoff 기준으로 OTUs (Operational Taxonomic Units)가 클러스터링 되었다. PKSSU 4.0 데이터베이스를 활용해 미생물 조성 및 특성을 확인하였으며, 다양성 분석을 위해 풍부도와 균등도(α -diversity), 군집 특성(β -diversity) 지표들을 활용했다. 출생시와 이유기 미생물 군집 차이의 유의성 검증을 위해 비모수 다변량 통계 방법인 PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) 분석법[23]을 사용했으며, 수준별 미생물 마커 발굴을 위해 LEfSe (Linear discriminant analysis effect) 분석법[18]을 활용했다.

결과 및 고찰

출생시와 이유기 분변 미생물 조성 분석

한라마의 출생시와 이유기의 분변 미생물 조성을 비교 분석하기 위해 27두의 발현 평균값을 사용했으며, 미생물학적 분류 단계의 수준별(문-종) 비율을 Fig. 1에 도식화했다. 문(phylum) 수준에서 출생시에는 *Proteobacteria* (35.7%)가, 이유기에는 *Firmicutes* (45.6%)가 가장 우점하는 것으로 확인되었다. *Proteobacteria*는 외막이 주로 지질다당류로 구성된 그람음성균으로 생리학적, 생태학적 특징 및

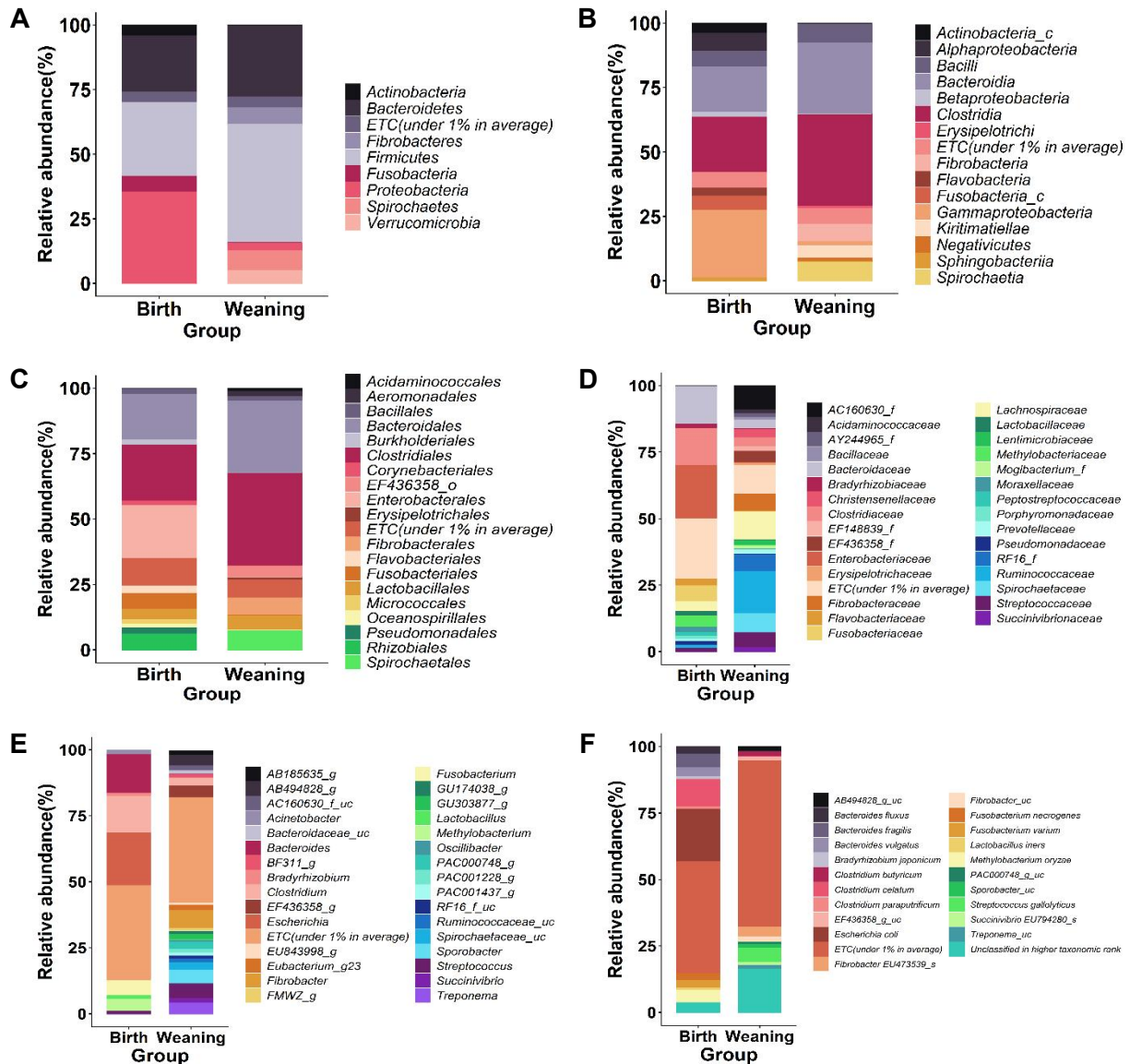


Fig. 1. The relative abundance of fecal microbiota in birth and weaning stages (A) phylum, (B) class, (C) order, (D) family, (E) genus, (F) species level.

병원성으로 다양한 역할을 한다고 알려져 있다[19]. 출생 시 *Proteobacteria*의 우점은 자마 면역체계에 영향을 주어 질병에 취약할 수 있다. 일반적으로 모유 분비량은 분만 후 8~12주 사이에 가장 많고, 3개월 이후부터는 점차 감소하는데 이유기 자마의 모유 섭취량에 영향을 준다. 또한, 건초와 농후사료를 조금씩 입질하기 시작해 식이에 변화가 생긴다. 모유 섭취량과 식이 변화에 따라 망아지는 생리적, 영양적 스트레스를 받게 되는데 이에 따라 미생물 조성에도 영향을 준다. *Firmicutes* 비율은 28.9%에서 45.6%로 *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Verrucomicrobia*는 0%에서 각각 7.56%, 6.73%, 5.2%로 이유기에 증가했다. 이와 유사한 결과가 외국 품종 60일령 망아지에서 확인되었다[6]. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes*,

Fibrobacteres 비율이 60일령 망아지에서 출생시 대비 증가했는데 식이 변화가 미생물 조성에 영향을 준 것으로 생각된다. *Firmicutes*는 그람양성균으로 지방산 흡수와 지질대사에 영향을 미친다고 보고되었다[14]. 또한, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*는 후장 발효[4]에 관여한다고 알려져 있는데 건초와 농후사료에 포함된 영양소 소화와 관여하는 미생물 군집에 변화가 나타난 것으로 생각된다. 이러한 경향은 속(genus) 수준에서도 확인되고 있다. 건초 내 섬유소 소화[20]에 관여하는 *Fibrobacter*가 출생시에는 발현되지 않지만 이유기에 6.6%로 높은 비중을 차지하고 있었다. 유당 분해에 관여하는 미생물인 *Lactobacillus*와 *Streptococci*의 비율은 다른 양상을 보였다. 이유기 모유 섭취량 증가함에 따라 *Streptococci*는 출생시

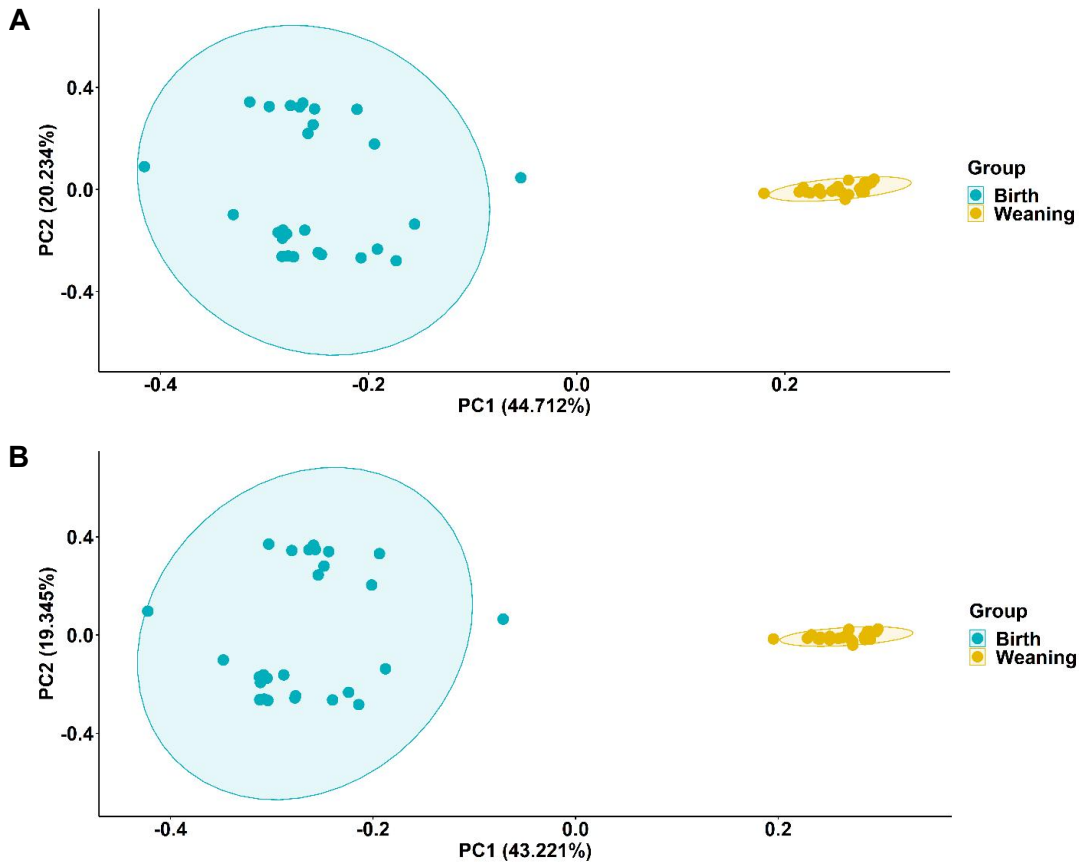


Fig. 2. Principal coordinate analysis (PCoA) based on Unifrac distance metric of fecal microbiota on (A) genus level (B) species level.

1.2%에서 이유기에 5.4%로 증가했지만 *Lactobacillus*는 0.9%에서 0.1%로 감소했다. 출생시에 1% 이하로 발견되는 미생물을 제외하면 질환을 유발할 수 있는 세균인 *Escherichia* (19.7%), *Clostridium* (14.0%) 순으로 우점했다. 이와 유사한 결과가 외국 품종에서 보고되었는데 생후 24 시 분변에서 *Escherichia/Shigella*가 35.1%로 가장 높은 비율을 차지했다[12]. 출생시에는 설사와 같은 증상이 망아지에서 흔히 발견되는데, *Clostridium*은 장에서 독소를 발생시켜 장에 병변을 일으킨다고 알려져 있다. 또한, 이런 독소는 말 전신 순환계로 흡수되어 뇌나 폐와 같은 기관에 영향을 미칠 수 있는 병원균으로 알려져 있다[22]. 또한, 종(species) 수준에서 출생시에 *Escherichia coli* (19.6%)가 우점종으로 확인되었는데, 설사와 같은 염증성 장질환의 원인균으로 지목된다[9]. 성별 차이에 의한 이유기 장내 미생물 조성 변화는 없었다(Table 1). 문 수준에서 *Firmicutes*는 수(34.4%), 암(32.5%) 차이가 거의 없었고 *Bacteroidetes*는 수(21.2%), 암(21.3%) 망아지의 미생물 조성이 동일했다.

출생시와 이유기 분변 미생물 다양성(α-diversity) 분석
장내 미생물 풍부도(richness)와 균등도(evenness)를 설

Table 1. Comparison of fecal microbiota between male and female in weaning stages

Phylum level	Male (%)	Female (%)
<i>Proteobacteria</i>	2.92	3.03
<i>Verrucomicrobia</i>	7.69	7.72
<i>Cyanobacteria</i>	1.35	1.44
<i>Fibrobacteres</i>	18.89	19.49
<i>Spirochaetes</i>	8.48	9.43
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	1.08	1.11
<i>Bacteroidetes</i>	21.23	21.32
<i>Tenericutes</i>	1.19	1.27
<i>Firmicutes</i>	34.40	32.52
ETC (under 1% in average)	2.75	2.66

명할 수 있는 다양성(α-diversity) 지표들을 Table 2에 제시하였다. 출생시와 이유기에 생산된 유효한 reads의 Good's coverage of library 비율은 각각 99.95%, 99.28%로 통계적 유의성 검증을 위해 충분함을 알 수 있었다. 조작분류단위(OTUs) 수는 각각 평균 266.11, 2557.55로 계산되었으며 출생시에 개체별 편차가 큰 것으로 보인다. 종의 수가 얼마나 많은지 알 수 있는 풍부도 지표인 Chao1, ACE, Jackknife [11] 값은 출생시 대비 이유기에 약 9배 높은 것으로

Table 2. α -diversity analysis of fecal microbiota between birth and weaning stages

Stage	The number of OTUs	ACE	Chao1	Jackknife
Birth	266.11±416.28	293.48±431.19	284.61±424.70	303.40±448.73
Weaning	2557.55±279.59	2718.69±283.45	2631.09±278.47	2858.11±294.17
<i>p</i> -value	5.6e-10	5.0e-10	5.6e-10	4.0e-10
Stage	Phylogenetic diversity	Shannon	NPS Shannon	Simpson
Birth	429.96±506.51	2.92±1.39	2.93±1.39	0.16±0.16
Weaning	1952.03±208.72	6.20±0.44	6.27±0.44	0.01±0.02
<i>p</i> -value	5.3e-9	2.3e-9	1.5e-9	4.2e-7

Data represented by mean \pm standard deviation (sd).

보아 이유기 다양한 영양소 섭취에 따라 미생물 종의 수가 증가한 것으로 보여진다. 또한, 균등도 측면에서도 Shannon, NPS Shannon, Simpson 지표들의 값이 이유기에 각각 6.2, 6.27, 0.01로 출생시 대비 다양한 종들이 균등하게 분포함을 알 수 있었다. 이러한 변화는 콕터호스 망아지에서 유사하게 확인되었다[3]. 출생시부터 9개월령까지 분변 미생물의 다양성을 분석한 결과 월령에 따라 OTUs가 증가했으며, 균등도 지표인 Simpson 값이 감소함을 미루어 보아 미생물 다양성 변화는 품종별 차이보다는 성장단계 특이적인 현상이라고 보여진다.

출생시와 이유기의 분변 미생물 군집 특성(β -diversity) 분석

한라마의 출생시와 이유기의 분변 미생물의 군집 특성 비교를 위해 Unifrac distance metric[13] 기반 Principal coordinate analysis (PCoA) 분석을 수행했다. 미생물 속 수준과 종 수준에서 분류되지 않은 OTUs를 포함하고 복제수 (copy number)의 정규화 과정을 거쳤다. 속 수준에서 첫 번째 주성분인 PC1이 44.712%, PC2가 20.234%로 미생물의 조성 차이에 대한 설명력이 높게 나타났다(Fig. 2). 종 수준에서 PC1이 43.221%, PC2가 19.345%로 속 수준과 유사하게 미생물 군집 특성이 명확히 구분되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 다양성 분석 결과와 유사한 패턴으로 자마가 성장함에 따라 장내 미생물의 조성과 특성이 변화됨을 알 수 있었다. 한 가지 흥미로운 점은 이유기에는 개체간 미생물 분포 차이가 거의 없는 반면 출생시에는 개체간 차이로 인해 크게 두개의 그룹으로 나뉘는 특성을 보인다. 이는 동일한 사육환경을 가정할 때 부모에게 물려받은 유전적 특성이 자마의 미생물 조성에 영향을 줄 수 있고 이에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

또한, 출생시와 이유기 미생물 분포의 Beta set-significance 분석을 수행해 두 그룹간 통계적 유의성을 검증했다. 이를 위해 Jensen-Shannon, Bray-Curtis, Unifrac의 distance metric를 기반으로 분석을 수행했다. PERMANOVA 분석 결과 FDR corrected *p*-value (*q*-value<0.001)가 통계적 유의성을 보였으며, 귀무가설이 기각되어 출생시와 이유기 미생물 조성의 중심과 산포 차이가 발생함을 검증하였다 (Table 3).

성장단계 특이적인 분변 미생물 마커 분석

미생물 수준별 마커 선별을 위해 상대적 발현 정보를 기반으로 LEfSe 분석을 수행했다. LDA (Linear discriminant analysis) 스코어 임계값은 3.0으로 설정하고 FDR corrected *p*-value (*q*-value<0.05) 기준으로 필터링 했다. LDA score가 높은 순서로 문(phylum), 강(class), 목(order), 과(family) 수준에서 각각 5종과 속(genus), 종(species) 수준에서 각각 10종을 선별했다(Table 4). 그 결과 문 수준에서는 출생시에 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*가 이유기에 *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*가 상대적으로 많이 분포하였다. 속 수준에서는 질환을 유발할 수 있는 *Escherichia*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Methylobacterium*의 발현이 출생시에 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 미루어 보아 출생시는 질병에 취약한 시기로 세심한 건강관리 및 체계적인 사양관리 프로그램을 운용해 질병을 예방하는 노력이 필요하다고 판단된다. 이유기에 *Fibrobacter*는 가장 높은 비율로 분포하고 있었는데, *Fibrobacter succinogenes*는 출생시 1주 후부터 점진적으로 증가해 2개월령에 이르면 성마 수준까지 도달한다는 결과가 제시되었다 [8]. 망아지는 생후 10-20일 사이에 건초를 입질하기 시작하는데 이에 따른 섬유소 분해 능력을 갖는 *Fibrobacter*의

Table 3. PERMANOVA results of fecal microbiota between birth and weaning stages

Distance metric	Sample	Group	The number of permutations	Pseudo-F	<i>q</i> -value
Jensen-Shannon	54	2	999	55.171	<0.001
Bray-Curtis	54	2	999	36.523	<0.001
Unifrac	54	2	999	38.211	<0.001

Table 4. Selected taxonomic markers between birth and weaning stages

Level	Taxon name	LDA score	q-value	Relative abundance(%)	
				Birth	Weaning
Phylum (5)	<i>Proteobacteria</i>	5.20	5.3e-09	35.76	3.21
	<i>Firmicutes</i>	4.89	0.0004	28.93	45.66
	<i>Spirochaetes</i>	4.58	1.4e-9	0.05	7.56
	<i>Fibrobacteres</i>	4.53	1.1e-9	0.03	6.73
	<i>Fusobacteria</i>	4.44	0.015	5.68	0.04
Class (5)	<i>Gammaproteobacteria</i>	5.09	1.4e-8	26.24	1.86
	<i>Clostridia</i>	4.78	0.001	21.76	35.38
	<i>Bacteroidia</i>	4.70	0.035	17.70	27.74
	<i>Spirochaetia</i>	4.59	1.4e-9	0.05	7.56
	<i>Fibrobacteria</i>	4.53	1.1e-9	0.03	6.73
Order (5)	<i>Enterobacteriales</i>	5.02	8.0e-8	20.18	0.17
	<i>Clostridiales</i>	4.78	0.001	21.76	35.36
	<i>Bacteroidales</i>	4.70	0.037	17.69	27.71
	<i>Spirochaetales</i>	4.58	1.4e-9	0.05	7.55
	<i>Fibrobacteriales</i>	4.53	1.1e-9	0.03	6.73
Family (5)	<i>Enterobacteriaceae</i>	5.01	8.8e-7	19.83	0.16
	<i>Ruminococcaceae</i>	4.86	3.5e-9	1.36	15.89
	<i>Clostridiaceae</i>	4.79	0.021	14.09	3.05
	<i>AC160630_f</i>	4.63	1.8e-9	0.35	9.03
	<i>Spirochaetaceae</i>	4.58	1.4e-9	0.05	7.53
Genus (10)	<i>Escherichia</i>	5.01	8.8e-7	19.71	0.16
	<i>Bacteroides</i>	4.85	0.049	14.41	0.16
	<i>Clostridium</i>	4.79	0.025	14.08	3.05
	<i>Fibrobacter</i>	4.52	8.6e-10	0.01	6.62
	<i>Fusobacterium</i>	4.44	0.017	5.68	0.04
	<i>Sporobacter</i>	4.38	2.4e-9	0.38	5.15
	<i>Treponema</i>	4.34	8.6e-10	0.03	4.34
	<i>EF436358_g</i>	4.32	2.1e-9	0.15	4.33
	<i>AB494828_g</i>	4.30	1.6e-9	0.14	4.23
	<i>Methylobacterium</i>	4.26	0.00001	4.34	0.00
Species (10)	<i>Escherichia coli</i>	5.01	8.8e-7	19.68	0.16
	<i>Bacteroides fragilis</i>	4.44	0.0001	5.28	0.00
	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	4.30	0.05	0.98	5.11
	<i>EU473539_s</i>	4.27	7.1e-10	0.00	3.63
	<i>Methylobacterium oryzae</i>	4.26	1.3e-6	4.32	0.00
	<i>Bacteroides vulgatus</i>	4.18	0.016	3.08	0.04
	<i>Fusobacterium varium</i>	4.18	0.003	2.98	0.00
	<i>Bacteroides fluxus</i>	4.12	0.005	2.64	0.03
	<i>Fibrobacter_uc</i>	4.00	7.1e-10	0.00	2.06
	<i>Clostridium butyricum</i>	3.94	1.4e-6	0.31	1.96

비중이 같이 증가한 것으로 판단된다. 또한, 이유기 발현이 높은 2종(*EF436358_g*, *AB494828_g*) 미생물에 대한 문헌 정보가 부족하지만 이에 대한 기능 및 역할 구명을 위해 추가 연구가 필요하다. 종 수준에서는 출생시에 장내 질환을 일으킬 수 있는 *Escherichia coli*, *Clostridium celatum*, *Bacteroides fragilis*, *Methylobacterium oryzae*, *Bacteroides vulgatus*, *Fusobacterium varium*, *Bacteroides fluxus* 가 높은 비율로 분포하고 있었다. 이유기에는 반추동물

소화기관에서 흔히 발견된다고 알려진 *Streptococcus gallolyticus*가 출생시 대비 발현이 증가했다. 반추위 동물에 고전분 사료를 급여 시 *Streptococcus gallolyticus*가 반추위에서 증가하며 이는 산증 유발과 연관되어 있다는 결과가 보고되었다[2]. 이유기에 농후사료 급여에 따라 *Streptococcus gallolyticus* 증가가 나타났다고 보이며, 소화장애를 줄이기 위해 적정 급여수준 설정이 필요할 것으로 보인다. 본 연구에서는 출생시와 이유기에 초점을 맞춰 미생

물의 조성 및 다양성에 대한 분석을 수행했지만 육성기와 성마에 이르는 성장단계별로 미생물 스크리닝을 통해 생리학적 및 기능적 역할 구명을 위한 추가 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(연구개발과제명: 말 성장단계별 장내세균 특성 구명 및 마사 내 환경개선 연구, 연구개발과제 번호 : PJ015660, 주관과제 번호 : PJ01566001)의 지원에 의해 이루어진 것임.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Arroyo, L. G., Rossi, L., Santos, B. P., Gomez, D. E., Surette, M. G. and Costa, M. C. 2020. Luminal and mucosal microbiota of the cecum and large colon of healthy and diarrheic horses. *Animals* **10**, 1403.
- Asanuma, N. and Hino, T. 2002. Regulation of fermentation in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*, with special reference to rumen acidosis. *Anim. Sci. J.* **73**, 313-325.
- Costa, M., Stämpfli, H., Allen-Vercoe, E. and Weese, J. S. 2016. Development of the faecal microbiota in foals. *Equine Vet. J.* **48**, 681-688.
- Costa, M. C., Arroyo, L. G., Allen-Vercoe, E., Stämpfli, H. R., Kim, P. T., Sturgeon, A. and Weese, J. S. 2012. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS One* **7**, e41484
- Costa, M. C. and Weese, J. S. 2012. The equine intestinal microbiome. *Anim. Health Res. Rev.* **13**, 121-128.
- De La Torre, U., Henderson, J. D., Furtado, K. L., Pedroja, M., Elenamarie, O. M., Mora, A., Pechanec, M. Y., Maga, E. A. and Mienaltowski, M. J. 2019. Utilizing the fecal microbiota to understand foal gut transitions from birth to weaning. *PLoS One* **14**, e0216211.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. and Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194-2200.
- Faubladier, C., Julliard, V., Beuneiche, L. and Philippeau, C. 2017. Comparative fibre-degrading capacity in foals at immediate and late post-weaning periods. *Animal* **11**, 1497-1504.
- Garber, A., Hastie, P. and Murray, J. A. 2020. Factors influencing equine gut microbiota: Current knowledge. *J. Equine Vet. Sci.* **88**, 102943.
- Haq, I., Durrani, A. Z., Khan, M. S., Mushtaq, M. H. and Ahmad, I. 2017. A study on causes of pathogenic diarrhea in foals in Punjab, Pakistan. *J. Equine Vet. Sci.* **56**, 88-92.
- Hortal, J., Borges, P. A. and Gaspar, C. 2006. Evaluating the performance of species richness estimators: sensitivity to sample grain size. *J. Anim. Ecol.* **75**, 274-287.
- Husso, A., Jalanka, J., Alipour, M., Huhti, P., Kareskoski, M., Pessa-Morikawa, T., Iivanainen, A. and Niku, M. 2020. The composition of the perinatal intestinal microbiota in horse. *Sci. Rep.* **10**, 1-12.
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J. and Knight, R. 2011. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J.* **5**, 169-172.
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pesoa, S., Navarrete, P. and Balamurugan, R. 2020. The firmicutes/bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients* **12**, 1474.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2022. Horse industry survey 2021, pp. 27, Sejong, Republic of Korea
- Park, T., Cheong, H., Yoon, J., Kim, A., Yun, Y. and Unno, T. 2021. Comparison of the fecal microbiota of horses with intestinal disease and their healthy counterparts. *Vet. Sci.* **8**, 113.
- Schoster, A., Guardabassi, L., Staempfli, H., Abrahams, M., Jalali, M. and Weese, J. 2016. The longitudinal effect of a multi-strain probiotic on the intestinal bacterial microbiota of neonatal foals. *Equine Vet. J.* **48**, 689-696.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S. and Huttenhower, C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Bio.* **12**, 1-18.
- Seong, C. N., Kim, M. S., Kang, J. W. and Park, H. M. 2019. Taxonomic hierarchy of the phylum Proteobacteria and Korean indigenous novel Proteobacteria species. *J. Species Res.* **8**, 197-214.
- Sorensen, R. J., Drouillard, J. S., Douthit, T. L., Ran, Q., Marthaler, D. G., Kang, Q., Vahl, C. I. and Lattimer, J. M. 2021. Effect of hay type on cecal and fecal microbiome and fermentation parameters in horses. *J. Anim. Sci.* **99**, skaa407.
- Urubschurov, V., Stroebel, C., Günther, E., Romanowski, K., Büsing, K. and Zeyner, A. 2019. Effect of oral supplementation of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Enterococcus faecium* on the composition of the faecal microbiota of foals. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **103**, 915-924.
- Uzal, F. A., Navarro, M. A., Asin, J. and Henderson, E. E. 2022. Clostridial diseases of Horses: A Review. *Vaccines* **10**, 318.
- Xia, Y. and Sun, J. 2017. Hypothesis testing and statistical analysis of microbiome. *Genes Dis.* **4**, 138-148.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613.

초록 : 16S 앰플리콘 시퀀싱 기반 한라마 출생시와 이유기의 분변 미생물 비교 분석

이종안^{†*} · 강용준[†] · 최재영 · 신상민 · 신문철
(농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산연구소)

본 연구는 한라마 출생시와 이유기의 분변 미생물 조성과 다양성 차이에 대해 16S 앰플리콘시퀀싱 데이터 분석을 통해 수행하였다. 출생시에 *Proteobacteria* (35.7%)가, 이유기에는 *Firmicutes* (45.6%)가 문 수준에서 가장 우점하는 미생물로 확인되었다. 속 수준에서는 출생시에 *Escherichia* (19.7%), *Clostridium* (14.0%)가 우점종으로 관측되었으며, 이유기에는 *Fibrobacter* (6.6%)가 가장 높게 분포하고 있었다. 다양성(α -diversity) 분석 결과 이유기에 풍부도와 균등도 지표들이 통계적으로 유의한 수준에서 높게 나타났다. PCoA 분석을 수행한 결과 출생시와 이유기 미생물 군집 특성(β -diversity)은 속 수준과 종 수준에서 두개의 그룹으로 명확히 구분되었다. 미생물 분포에 대한 통계적 유의성 검증을 위해 세 가지 Jensen-Shannon, Bray-Curtis, Unifrac의 distance metric를 이용해 PERMANOVA 분석을 수행한 결과 통계적 유의성($q < 0.001$)을 보이며 조성 차이가 있었다. 출생시와 이유기 특성을 대표하는 미생물 마커 선별을 위해 LEfSe 분석을 수행하였다. 속 수준에서 출생시에 장내 질환을 유발할 가능성이 있는 *Escherichia*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Methylobacterium* 등이 우점하였으며, 이유기에는 섬유소 분해에 관여하는 *Fibrobacter*가 상대적으로 많이 분포하였다. 본 연구를 통해 승용마로 가치가 높은 한라마의 출생시와 이유기의 미생물 조성 및 다양성 차이에 대한 결과를 제시하였으며 성장단계별 질병예방 및 영양소 흡수에 관여하는 미생물 구명을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.