

Original Article

# 말 분변 내 마이크로바이옴 다양성 조사

이 슬<sup>1</sup>, 김민석<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>국립축산과학원 영양생리팀, <sup>2</sup>전남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부

## Diversity Census of Fecal Microbiome in Horses

Seul Lee<sup>1</sup> and Minseok Kim<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Nutrition & Physiology Team, National Institute of Animal Science, Wanju 55365, Korea

<sup>2</sup>Department of Animal Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

Received May 5, 2019

Revised May 31, 2019

Accepted June 10, 2019

**\*Correspondence**

Minseok Kim

E-mail: mkim2276@jnu.ac.kr

**ORCID**

https://orcid.org/0000-0002-8802-5661

**ABSTRACT** This study was conducted to analyze the diversity census of fecal microbiome in horses using meta-analysis of equine 16S rRNA gene sequences that are available in the Ribosomal Database Project (RDP; Release 11, Update 5). The search terms used were “horse feces (or faeces)” and “equine feces (or faeces)”. A total of 842 sequences of equine feces origin were retrieved from the RDP database, where 744 sequences were assigned to 10 phyla placed within Domain Bacteria. Firmicutes (n = 391) and Bacteroidetes (n = 203) were the first and the second dominant phyla, respectively, followed by Verrucomicrobia (n = 58), Proteobacteria (n = 30) and Fibrobacteres (n = 24). Clostridia (n = 319) was the first dominant class placed within Bacteroidetes while Bacteroidia (n = 174) was the second dominant class placed within Bacteroidetes. The remaining 98 sequences were assigned to phylum Euryarchaeota placed within Domain Archaea, where 74 sequences were assigned to class Methanomicrobia. The current results will improve understanding of the diversity of fecal microbiome in horses and may be used to further analyze equine fecal microbiome in future studies.

**Keywords:** fecal microbiome, horse, meta-analysis, 16S rRNA gene

### 서 론

말은 대장과 맹장에서 미생물 발효가 일어나는 후장발효동물(hindgut fermenters)이며, 비반추초식동물(non-ruminant herbivorous animals)로 분류된다. 말의 후장(hindgut)에서는 미생물에 의해 섬유소가 분해되고, 휘발성지방산(volatile fatty acid)이 생성된다. 이러한 휘발성지방산은 주로 acetate, propionate, butyrate를 포함하고, host에 의해 흡수되어 에너지원

으로 사용된다. 소화관 내의 미생물 군집은 bacteria, archaea, fungi, protozoa를 포함하며 이들은 분과 함께 배출된다(Golomidova 등, 2007). 말을 도축하여 후장에서 샘플을 채취하는 것은 어렵기 때문에 말 분변 샘플의 미생물 분석을 통한 간접적인 미생물 분석 관련 연구가 수행되었다(Julliand와 Grimm, 2016). 말 분변의 샘플은 후장 내의 모든 환경을 대표하기는 어렵지만, 후장의 등쪽 결장 부분의 미생물 군집을 대표할 수 있는 것으로 판단된다(Dougal 등, 2012).

16S rRNA gene은 bacteria, archaea에 있어 생물체의 계통 발생학적 관계를 밝히는 phylogenetic marker로서 이용될 수 있다(Kim 등, 2017). 본 연구에서는 말 분변 내 미생물의 다양성을 분석하기 위해 RDP 데이터베이스에 등록된 말 분변 유래 16S rRNA gene sequence를 이용하였다. 기존에 16S rRNA gene을 이용하여 마이크로바이옴 다양성을 조사한 연구가 선행된 바 있으며, 이를 위한 분석 체제가 설정된 바 있다(Kim 등, 2011; Kim과 Wells, 2016).

지금까지 여러 개개의 연구에서 말 분변으로부터 얻어지는 미생물 taxonomy 분석을 통해 특정 환경에서 특정 말 품종의 분변 미생물 군총이 부분적으로 분석되었지만, 개개의 연구가 전체의 말 분변 내 미생물을 대표할 수는 없다. 이러한 여러 개개의 연구를 통합한 메타분석(meta-analysis)은 말의 이상적인 후장발효를 통한 소화율 향상 및 미생물 배양을 위한 중요한 기초자료를 제공할 수 있지만 아직까지 수행된 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 RDP 데이터베이스에서 얻어지는 모든 말 분변 내 미생물에 대한 시퀀스를 메타분석하여 마이크로바이옴 다양성을 통합적으로 조사하였다.

## 재료 및 방법

이전 논문에서 제시한 방법을 사용하여(Kim 등, 2011; Kim과 Wells, 2016), 지구상의 모든 미생물의 16S rRNA gene sequence을 포함하는 RDP 데이터베이스에서 말 분변에서만 유래된 Bacteria와 Archaea의 16S rRNA gene sequence를 검색 후 다운로드하였다(release 11, Update 5). 말 분변 유래 16S rRNA gene sequence 정보를 얻기 위하여 'horse feces (or faeces)'와 'equine feces (or faeces)'가 검색어로 이용되었다.

위의 검색어를 사용하여 RDP 데이터베이스에서 말 분변 유래 16S rRNA gene sequence와 함께 taxonomy 정보가 포함된 ARB-compatible tree를 다운로드하였다. 이렇게 획득된 sequence와 tree 파일을 input data로 하여 ARB 프로그램(Ludwig과 Strunk, Munich, Germany)에서 불러오기를 한 후 taxonomy tree를 생성하였다. 이렇게 생성된 taxonomy tree를 기반으로 하여 말 분변 유래 마이크로바이옴의 다양성을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### Data summary

말 분변 미생물의 다양성 분석을 위하여 말 분변 유래 842개의 16S rRNA gene sequence를 22개의 연구 결과(6개의 unpublished studies 포함)로부터 획득하였다. 말 분변 미생물은 크게 Bacteria과 Archaea로 나뉘어졌으며 이를 바탕으로 한 taxonomic tree가 Fig. 1에 제시되었다. 이 중 domain Bacteria는 744개 sequences로 대표되었고, 총 10개 phyla Firmicutes,

Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Chloroflexi, Fibrobacteres, Lentisphaerae, Proteobacteria, Spirochaetes, Candidatus Saccharibacteria로 분류되었다. 전체 Bacteria 744개의 시퀀스 중 5% 이상을 차지하는 주요 phyla는 Firmicutes (391 sequences, 52.6%), Bacteroidetes (203 sequences, 27.3%), Verrucomicrobia (58 sequences, 7.8%)를 포함하였다. 반면에 domain Archaea는 98 sequences가 모두 1개의 phylum Euryarchaeota으로 분류되었다. 본 연구에서는 메타분석을 사용해 배양이 불가능한 수많은 말 분변 유래 미생물의 계통학적 분류를 처음으로 체계적으로 정리하였다.

### Domain Bacteria

#### Phylum Firmicutes

Phylum Firmicutes에 속하는 391 sequences는 class Bacilli (n = 48), Clostridia (n = 319), Erysipelotrichia (n = 12), Negativicutes (n = 6), unclassified Bacilli (n = 6)로 분류되었다(Fig. 1).

Class Bacilli: Class Bacilli에 속하는 48 sequences는 order Bacillales (n = 4)와 order Lactobacillales (n = 44)로 분류되었다(Fig. 1). Order Bacillales의 4 sequences는 family Bacillaceae1 (n = 2), Planococcaceae (n = 1), family Staphylococcaceae (n = 1)로 분류되었고, order Lactobacillales의 44 sequences는 family Enterococcaceae (n = 2), Lactobacillaceae (n = 36), Streptococcaceae (n = 6)로 분류되었다.

Order Bacillales의 4개 sequences 중 2개 sequences는 family Bacillaceae1에 속하는 genus *Bacillus*로 분류되었다. 분변 내 *Bacillus*는 일반적으로 병원성 미생물로서 알려져 있다(Wong 등, 2016). Order Bacillales의 4개 sequence 중 2개는 family Planococcaceae의 genus *Sporosarcina* (n = 1)와 family Staphylococcaceae의 genus *Staphylococcus* (n = 1)로 분류되었다. *Sporosarcina*는 urea 분해 효소인 urease를 가지고 있기 때문에(Yan 등, 2016), 말 분변 내 *Sporosarcina*의 존재는 뇨(urine)로부터 오염되어서 검출된 것으로 추정된다. *Staphylococcus*는 horse skin에서 분리되었기 때문에(Schleifer 등, 1984), 말 분변 내에서 *Staphylococcus*의 존재는 horse skin에서 오염되어서 검출된 것으로 여겨진다.

Order Lactobacillales의 44개 시퀀스 중 2 sequences는 family Enterococcaceae에 속하는 genus *Enterococcus*로 분류되었다. *Enterococcus*는 생균제로 활용될 수 있는 미생물로서(Simonová 등, 2005), 말 분변에서 발견되었기 때문에 말에서도 생균제로서 활용될 수 있는 가능성을 보여주었다(Lauková 등, 2008).

Lactobacillales의 44 sequences 중 36 sequences는 family Lactobacillaceae에 속하는 genus *Lactobacillus*로 분류되었다. *Lactobacillus*는 건강한 말 분변 내에서 일반적으로 발견되는 lactate 생성 미생물로서 주요 species는 *L. equi*, *L. hayaki*

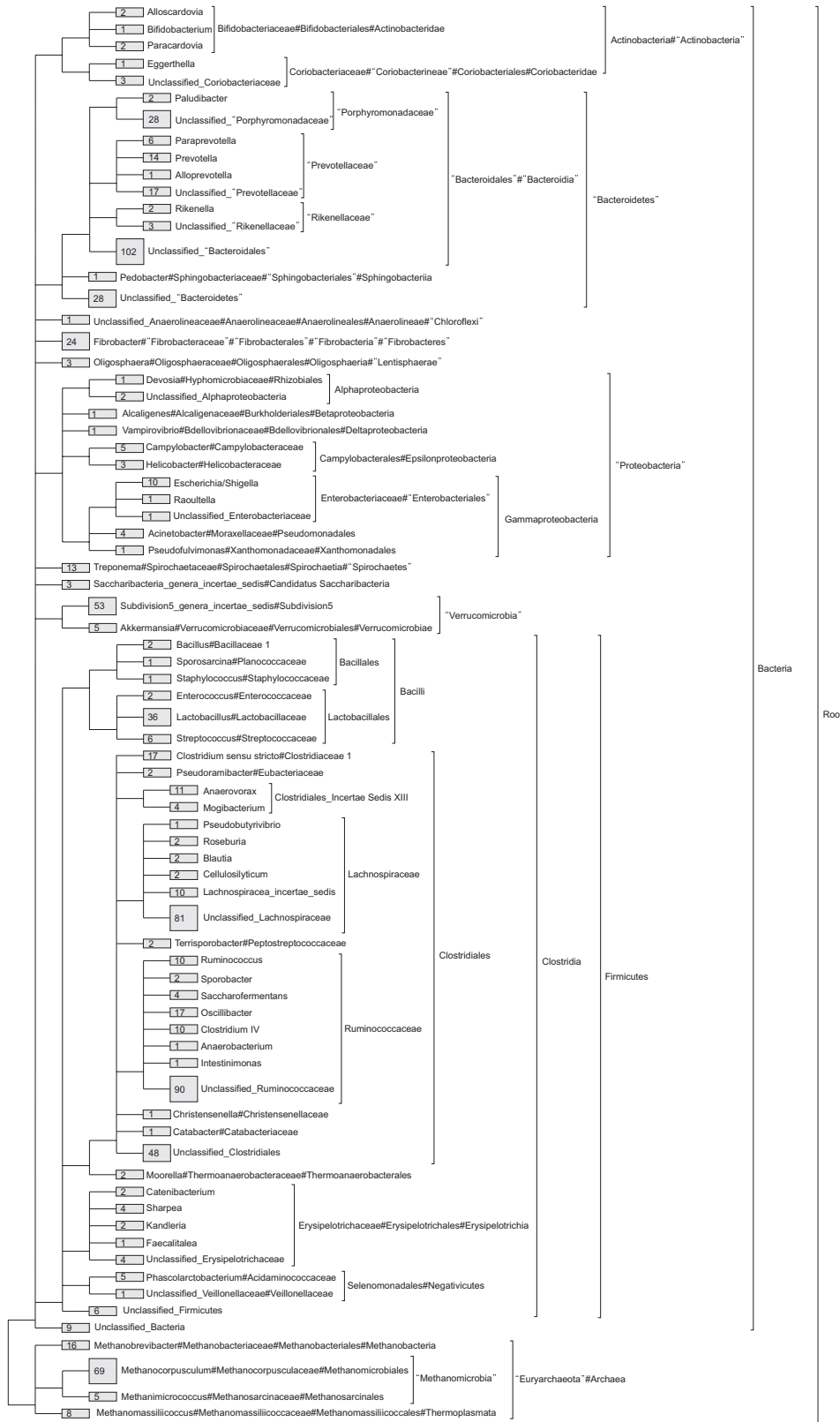


Fig. 1. A taxonomic tree showing the genera of bacteria and archaea in the feces of horses. The numbers in rectangular bars indicate the number of bacterial or archaeal 16S rRNA gene sequences of equine fecal origin.

*tensis* 및 *L. equigenerosi*가 있다(Morita 등, 2009).

Lactobacillales의 44개 시퀀스 중 나머지 6 sequences는 family Streptococcaceae에 속하는 genus *Streptococcus*로 분류되었다. *Streptococcus*는 주로 말에서 질병을 일으키는 것으로 알려져 있으며 대표적인 species는 *S. equi*가 있다(Harris 등, 2015).

**Class Clostridia:** Class Clostridia에 속하는 319 sequences는 order Clostridiales (n = 318)와 order Thermoanaerobacteriales (n = 1)로 분류되었다(Fig. 1).

Order Clostridiales의 318 sequences 중 17 sequences는 family Clostridiaceae에 속하는 추정상의 genus *Clostridium* sensu stricto로 분류되었다. 말 분변 내 *Clostridium* sensu stricto의 기능은 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다. Family Eubacteriaceae의 1개 sequence는 genus *Pseudoramibacter*로 분류되었다. *Pseudoramibacter*는 신경 감염과 관련이 있다고 보고되고 있지만(Finegold 등, 2004), 말 분변에서의 역할이 분명하지 않다. 1개의 sequence만 존재하였기 때문에 우연에 의해 분류될 가능성도 있을 것이다. Family Clostridiales\_Incertae Sedis VIII (n = 15)는 genus *Anaerovorax* (n = 11)와 genus *Mogibacterium* (n = 4)가 속한다. genus *Anaerovorax*는 절대혐기성의 박테리아로서 Thoroughbred, Mongolian의 말 분변에서 존재하는 것으로 보고되었고(Zhao 등, 2016), 악취를 분해하는 기능을 가질 것으로 추정된다(Matthies 등, 2000). *Mogibacterium*은 말 후장 내 혐기성분해미생물 *Ruminococcus*의 성장에 필요한 phenylacetic acid를 생산할 것으로 여겨진다(Larue 등, 2005).

Clostridiales의 318 sequences 중 98 sequences는 family Lachnospiraceae에 속하는 genus *Pseudobutyrvibrio* (n = 1), *Roseburia* (n = 2), *Blautia* (n = 2), *Cellulosilyticum* (n = 2), Lachnospiraceae\_incertae\_sedis (n = 10), unclassified Lachnospiraceae (n = 81)로 분류되었다. *Pseudobutyrvibrio*는 Thoroughbred, Mongolian의 말 분변에 존재하는 것으로 보고되었고(Zhao 등, 2016), 발효산물로 butyrate를 생산하는 미생물로 예상된다(Kopečný 등, 2003). *Blautia*는 Irish Thoroughbred racehorses의 분변에 존재하는 것으로 보고되었고(O'Donnell 등, 2013), lactate와 acetate 생성에 관여할 것으로 추정된다(Kim 등, 2014). *Cellulosilyticum*은 말의 후장에서 cellulose를 분해하여 acetate를 생성하는 미생물로 추정된다(Cai와 Dong, 2010). Unclassified Lachnospiraceae에는 81개의 많은 sequence가 분류되었는데, 여기에 속하는 새로운 genus의 분류 및 특성은 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

Family Peptostreptococcaceae에 속하는 2개의 sequence는 genus *Terrisporobacter*로 분류되었다. *Terrisporobacter*는 말 후장 내 발효산물로 acetate를 생성할 것으로 추정된다(Geritsen 등, 2014).

Family Ruminococcaceae에 속하는 135 sequences는 ge-

nus *Ruminococcus* (n = 10), *Sporobacter* (n = 2), *Saccharofermentans* (n = 4), *Oscillibacter* (n = 17), *Clostridium IV* (n = 10), *Anaerobacterium* (n = 1), *Intestinimonas* (n = 1), unclassified Ruminococcaceae (n = 90)로 분류되었다. Cellulose 분해 미생물인 *Ruminococcus*는 말의 후장발효에서 cellulose 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어왔다(Jullian 등, 1999). *Sporobacter*는 Irish Thoroughbred racehorses 분변에서 발견되었고(O'Donnell 등, 2013), 말의 후장 내 *Sporobacter*의 역할은 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다. *Saccharofermentans*은 반추동물의 반추위에서 섬유소 분해에 관여를 하기 때문에(Perea 등, 2017), 말의 후장에서도 섬유소를 분해하는 역할을 할 것으로 추정된다. *Oscillibacter*는 Thoroughbred와 Mongolian 말의 분변에서 존재하고(Zhao 등, 2016), 섬유소 분해에 관여할 것으로 추정된다(Lee 등, 2012). 추정상의 *Clostridium IV*의 특징은 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다. *Anaerobacterium*은 말 후장에서 cellulose 분해에 관여할 것으로 추정된다(Horino 등, 2014). *Intestinimonas*은 말의 후장에서 발효산물로서 butyrate를 생산하는 미생물로 여겨진다(Kläring 등, 2013). 90개의 sequence는 unclassified Ruminococcaceae로 분류되었다. Unclassified Ruminococcaceae에 속하는 새로운 genus의 분류 및 특성은 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

Family Christensenellaceae에 속하는 1개의 sequence는 genus *Christensenella*로 분류되었고, acetate를 발효산물로 생산하는 미생물로 추정된다(Morotomi 등, 2012). Family Catabacteriaceae에 속하는 1개의 sequence는 genus *Catabacter*로 분류되었다. 이 미생물은 사람에서 치명적인 감염과 관련이 있기 때문에(Lau 등, 2007), 말에서도 비슷한 기능을 할 것으로 추정된다.

나머지 48개의 sequence는 unclassified Clostridiales로 분류되었고, 여기에 속하는 새로운 family와 genus의 분류 및 특성은 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

Order Thermoanaerobacteriales의 1개 sequence는 family Thermoanaerobacteraceae에 속하는 genus *Moorella*로 분류되었다. *Moorella*는 말의 후장 발효산물로서 acetate를 생산할 것으로 추정된다(Pierce 등, 2010).

**Class Erysipelotrichia:** Class Erysipelotrichia의 12 sequences는 family Erysipelotrichaceae에 속하는 genus *Catenibacterium* (n = 1), *Sharpea* (n = 4), *Kandleria* (n = 2), *Faecalitalea* (n = 1), unclassified Erysipelotrichaceae (n = 4)로 분류되었다(Fig. 1). *Catenibacterium*는 발효산물로 acetate, butyrate, lactate를 생산하는 것으로 추정된다(Kageyama와 Benno, 2000). *Sharpea*는 말의 분변에서 발견되었고, 발효산물로 lactate를 생산하는 특징을 가지고 있다(Morita 등, 2008). *Kandleria*와 *Faecalitalea* 또한 발효산물로 lactate를 생산할 것으로 추정된다(De Maesschalck 등, 2014; Kumar 등, 2018).



Unclassified Erysipelotrichaeae에 속하는 새로운 genus의 분류 및 특성은 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

**Class Negativicutes:** Class Negativicutes의 6 sequences는 family Acidaminococcaceae (n = 5)와 Veillonellaceae (n = 1)로 분류되었다(Fig. 1). Acidaminococcaceae의 5 sequences는 모두 genus *Phascolarctobacterium*로 분류되었고, Veillonellaceae의 1 sequence는 unclassified Veillonellaceae로 분류되었다. *Phascolarctobacterium*는 발효산물로 acetate와 propionate를 생산할 것으로 추정된다(Wu 등, 2017). Unclassified Veillonellaceae에 속하는 새로운 genus의 분류 및 특성은 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

#### Phylum Bacteroidetes

Phylum Bacteroidetes의 203개의 sequence는 class Bacteroidia (n = 174), Sphingobacteriia (n = 1), unclassified Bacteroidetes (n = 28)로 분류되었다(Fig. 1).

Class Bacteroidia의 174개 sequence는 family Porphyromonadaceae (n = 30), Prevotellaceae (n = 38), Rikenellaceae (n = 4), unclassified Bacteroidales (n = 102)로 분류되었다.

Family Porphyromonadaceae의 30 sequences는 genus *Paludibacter* (n = 2)와 unclassified Porphyromonadaceae (n = 28)로 분류되었다. *Paludibacter*는 주요 발효 산물로 propionate를 생산하는 미생물로서 말의 후장발효에 기여할 것으로 여겨진다(Ueki 등, 2006). 홀스타인 젖소 분변 내에서 *Paludibacter*는 조사료의 급여가 높을수록 증가했기 때문에 섬유소를 분해하는 기능이 있을 것으로 추정되었다(Zhang 등, 2018). 따라서, 향후 연구에서 말 분변 내 *Paludibacter*가 섬유소 분해와 관련이 있는지 확인할 필요가 있을 것이다.

Family Prevotellaceae의 38개 sequence는 genus *Paraprevotella* (n = 6), *Prevotella* (n = 14), *Alloprevotella* (n = 1), unclassified Prevotellaceae (n = 17)로 분류되었다. *Prevotella*는 amylolytic bacteria로서 총 744 sequence 중에서 약 2%로 우점하였고, 소의 분변에서 보고된 것처럼 후장 내에 이용 가능한 전분성 탄수화물의 양이 증가하면 *Prevotella*도 증가되는 것으로 여겨진다(Azad 등, 2017). *Paraprevotella*와 *Alloprevotella*는 말 분변 내에서 acetate와 succinate를 발효산물로 생산하는 미생물로서 말의 후장발효에 기여하는 것으로 추정된다(Morotomi 등, 2009; Downes 등, 2013). Family Rikenellaceae에 속하는 4개의 sequence는 genus *Rikenella* (n = 1)와 unclassified Rikenellaceae (n = 3)로 분류되었다. *Rikenella* 또한 short chain fatty acid를 발효산물로 생산하는 미생물로서 말의 후장발효에 기여하는 것으로 보여진다(Shi 등, 2017). 현재 분류학상으로 등록된 genus로 분류되지 못한 unclassified Prevotellaceae와 unclassified Rikenellaceae에 속하는 미생물들은 향후 지속적인 연구를 통해 새로운 genus로

정의되어야 할 것이다.

Class Sphingobacteriia에 속하는 1개의 sequence는 family Sphingobacteriaceae와 genus *Pedobacter*로 분류되었다. *Pedobacter*는 주로 토양에 거주하는 미생물로, 말 분변이 토양으로부터 오염되어 검출되었을 가능성이 있다(Cui 등, 2018; Yuan 등, 2018).

#### Phylum Verrucomicrobia

Phylum Verrucomicrobia에 속하는 58개 sequence는 class Subdivision5 (n = 53)와 Verrucomicrobiae (n = 5)로 분류되었다(Fig. 1). Class Subdivision5에 속하는 53개의 sequence는 모두 추정상의 genus Subdivision5\_genera\_incertae\_sedis로 분류되었고, 향후 연구에서 이러한 미생물의 기능이 연구되어야 할 것이다. Class Verrucomicrobiae에 속하는 5개의 sequence는 모두 genus *Akkermansia*로 분류되었다. *Akkermansia*는 말의 후장에서 mucus layer를 분해하는 기능을 가진 것으로 추정된다(Kim 등, 2014).

#### Minor phyla

Domain Bacteria 중 나머지 7개의 phyla는 Actinobacteria (9 sequences, 1.2%), Chloroflexi (1 sequence, 0.1%), Fibrobacteres (24 sequences, 3.2%), Lentisphaerae (3 sequences, 0.4%), Proteobacteria (30 sequences, 4.0%), Spirochaetes (13 sequences, 1.7%), Candidatus Saccharibacteria (3 sequences, 0.4%)로 분류되었다(Fig. 1).

Phylum Actinobacteria의 9 sequences는 family Bifidobacteriaceae (n = 5)와 Coriobacteriaceae (n = 4)로 분류되었다. Bifidobacteriaceae의 5 sequences는 genus *Alloscardovia* (n = 2), *Bifidobacteria* (n = 1), *Parascardovia* (n = 2)로 분류되었다. *Alloscardovia*와 *parascardovia*는 말 분변에서 존재하는 것으로 보고되었고(Endo 등, 2009), 그 기능에 대해서는 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

Family Coriobacteriaceae의 4 sequences는 genus *Eggerthella* (n = 1)와 unclassified Coriobacteriaceae (n = 3)로 분류되었다. *Eggerthella*는 사람에게 있어 대장염을 유발하는 병원성 미생물이므로(Lau 등, 2004), 말에서도 비슷한 기능을 할 것으로 추측된다.

Phylum Chloroflexi의 1개 sequence는 family Anaerolineaceae에 속하는 unclassified Anaerolineaceae로 분류되었다. Chloroflexi는 단지 1개 sequence에 의해 대표되었기 때문에 말의 분변에서 일반적으로 존재하지 않은 박테리아로 추정된다.

Phylum Fibrobacteres의 24 sequences는 모두 family Fibrobacteraceae에 속하는 genus *Fibrobacter*로 분류되었다. *Fibrobacter*는 반추위에서 우점하는 cellulose 분해 박테리아로서, 말의 후장발효에서도 cellulose 분해에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다(Kim 등, 2011).

Phylum Lentisphaerae의 3 sequences는 모두 class Oligosphaeria에 속하는 genus *Oligosphaera*로 분류되었다. *Oligosphaera*는 말 후장에서 말효 산물로 acetate를 생산할 것으로 추정된다(Qiu 등, 2013).

Phylum Proteobacteria의 30 sequences는 class Alphaproteobacteria (n = 3), Betaproteobacteria (n = 1), Deltaproteobacteria (n = 1), Epsilonproteobacteria (n = 8), Gammaproteobacteria (n = 17)로 분류되었다.

Class Alphaproteobacteria의 3 sequences는 family Hyphomicrobiaceae (n = 1)와 unclassified Alphaproteobacteria (n = 2)로 분류되었다. Hyphomicrobiaceae의 1 sequence는 genus *Devosia*로 분류되었다. *Devosia*는 말의 분뇨에서 발견되는 것으로 보고되었고(Albuquerque와 Zurek, 2014), 그 기능은 향후 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

Class Betaproteobacteria의 1 sequence는 family Alcaligenaceae에 속하는 genus *Alcaligenes*로 분류되었고, class Deltaproteobacteria의 1 sequence는 family Bdellovibrionaceae에 속하는, genus *Vampirovibrio*로 분류되었다. *Alcaligenes*는 토양에서 발견되기 때문에(Zhang 등, 2017), 말 분변이 토양으로부터 오염되어 검출되었을 가능성이 있다. *Vampirovibrio*는 다른 세균을 공격하여 용균하는 포식세균(predatory bacteria)으로 알려져 있기 때문에(Ganuza 등, 2016), 말 후장 내에서도 포식세균으로서의 역할을 할 것으로 추정된다.

Class Epsilonproteobacteria의 8 sequences는 family Campylobacteraceae (n = 5)와 family Helicobacteraceae (n = 3)로 분류되었다. Campylobacteraceae의 5 sequences는 genus *Campylobacter*로 분류되었고, Helicobacteraceae의 3 sequences는 genus *Helicobacter*로 분류되었다. *Campylobacter*와 *Helicobacter* 모두 병원성 세균으로서 말의 장내 건강 상태가 좋지 않을 때 분변에 존재할 것으로 추정된다(Moyaert 등, 2007; Moriarty 등, 2015).

Class Gammaproteobacteria의 17 sequences는 family Enterobacteriaceae (n = 12), Moraxellaceae (n = 4), Xanthomonadaceae (n = 1)로 분류되었다. Family Enterobacteriaceae의 12 sequences는 genus *Escherichia/Shigella* (n = 10), *Raoultella* (n = 1), unclassified Enterobacteriaceae (n = 1)로 분류되었고, family Moraxellaceae의 4 sequences는 모두 genus *Acinetobacter*로 분류되었다. Genus *Escherichia/Shigella*는 다양한 편리공생균 또는 병원성 세균에 속하는 species (genus의 하위분류)를 포함한다. 따라서, 숙주인 말 후장에서 *Escherichia/Shigella*는 질병을 유발하지 않고 공생하는 편리공생균(commensal)이거나, 독소를 생산하는 병원성 미생물로서 역할을 할 것으로 추정된다(Anderson 등, 2006). 말 분변에서 분리된 *Acinetobacter*는 acetate를 carbon source로 사용하고 ammonia를 nitrogen source로 사용하는 미생물로 보고되었다(Smet 등, 2014). Family Xanthomonadaceae의 1 sequence

는 genus *Pseudofulvimonas*로 분류되었고, 향후 연구에서 말 후장에서 *Pseudofulvimonas*의 기능이 밝혀져야 할 것이다.

Phylum Spirochaetes의 13 sequences는 family Spirochaetaceae에 속하는 genus *Treponema*로 분류되었다. *Treponema*는 Irish Thoroughbred racehorse 분변에서 발견되었고(O'Donnell 등, 2013), 말 분변 내에서 pectin, xylan 및 fructan과 같은 섬유소를 분해하는 역할을 할 것으로 추정된다(Bekele 등, 2011).

Phylum Candidatus Saccharibacteria의 3 sequences는 모두 추정 상의 genus *Saccharibacteria\_genera\_incertae\_sedis*로 분류되었다. 향후 연구에서 이 genus의 분류와 특성을 밝히는 노력이 필요할 것이다.

### Domain Archaea

Domain Archaea의 98 sequences는 모두 메탄생성균이 속하는 phylum Euryarchaeota로 분류되었다(Fig. 1). Euryarchaeota의 98 sequences는 다시 class Methanobacteria (n = 16), Methanomicrobia (n = 74), Thermoplasmata (n = 8)로 분류되었다.

Class Methanobacteria에 속하는 16 sequences는 모두 family Methanobacteriaceae에 속하는 genus *Methanobrevibacter*로 분류되었다. *Methanobrevibacter*는 반추위 메탄생성균 중 가장 우점하는 미생물로서(Kim 등, 2011), 말의 후장에서도 메탄가스 생성에 중요한 역할을 하는 메탄생성균으로 추정된다.

Class Methanomicrobia에 속하는 74 sequences는 family Methanocorpusculaceae (n = 69)와 Methanosarcinaceae (n = 5)로 분류되었다. Methanocorpusculaceae에 속하는 69개 시퀀스는 모두 genus *Methanocorpusculum*로 분류되었다. 반추가축의 반추위에서는 *Methanobrevibacter*가 가장 우점하는 genus이지만, 말의 후장에서는 *Methanocorpusculum*가 전체 98 Archaea sequences 중 약 70%를 차지하였고 가장 우점하는 genus인 것으로 추정된다. Family Methanosarcinaceae에 속하는 5 sequences는 모두 genus *Methanimicrococcus*로 분류되었다. *Methanimicrococcus*는 전체 98 Archaea sequences 중 약 5%를 차지하였고, 말의 후장에서 메탄생성에 많은 기여를 하지 않을 것으로 추정된다.

Class Thermoplasmata의 8 sequences는 모두 family Methanomassiliococcaceae에 속하는 genus *Methanomassiliococcus*로 분류되었다. *Methanomassiliococcus*는 전체 98 Archaea sequences 중 약 8%를 차지하였고, 말의 후장에서 메탄생성에 많은 기여를 하지 않을 것으로 추정된다.

향후 말 분변에서 이러한 메탄생성균들을 분리·동정하여 세부적인 기능을 밝히는 연구가 수행되어야 할 것이다. 또한 국내에서 사육하는 제주마(박 등, 2018)의 후장에서도 메탄생성균의 군집을 분석하여 어떤 메탄생성균이 메탄 배출량에 가장 큰 기여를 하

는지도 확인되어야 할 것이다.

## 결론

본 연구는 말 분변으로부터 마이크로바이옴 다양성 조사를 위해 Sanger sequencing 기법으로 분석된 말 분변 유래 16S rRNA gene sequence를 메타분석하였다. Bacteria의 경우 phylum 수준에서 Firmicutes가 가장 우점하였고, Bacteroidetes가 두번째로 우점하였다. Firmicutes와 Bacteroidetes의 합은 총 16S rRNA gene sequence의 약 80%를 차지하였다. Firmicutes에는 하위 분류인 genus가 31개가 포함되었고, Bacteroidetes에서는 하위 분류인 genus가 6개가 포함되었다. Archaea에서는 모든 16S rRNA gene sequence가 메탄생성균이 속하는 phylum Euryarchaeota로 분류되었다. 반추동물 반추위에서 *Methanobrevibacter*가 가장 우점하는 메탄생성균이지만, 말의 후장에서 *Methanocorpusculum*가 가장 우점하였다. 본 연구의 미생물 taxonomy 결과는 향후 연구에서 말의 이상적인 후장발효를 통한 소화율 향상을 위한 중요한 기초자료를 제공할 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서 분류된 대부분의 말 분변 내 미생물은 배양되지 못했기 때문에 향후 연구에서는 이러한 미생물을 분리·동정하여 말의 후장발효에서 미생물의 명확한 기능을 확인할 수 있도록 더욱 노력해야 할 것이다.

## CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## ORCID

Seul Lee: <https://orcid.org/0000-0001-9667-8155>

Minseok Kim: <https://orcid.org/0000-0002-8802-5661>

## REFERENCES

- Albuquerque TA, Zurek L. 2014. Temporal changes in the bacterial community of animal feces and their correlation with stable fly oviposition, larval development, and adult fitness. *Frontiers in Microbiology* 5:590.
- Anderson MA, Whitlock JE, Harwood VJ. 2006. Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle, and horses. *Applied and Environmental Microbiology* 72:6914-6922.
- Azad E, Narvaez N, Derakhshani H, Allazeh AY, Wang Y, McAllister TA, Khafipour E. 2017. Effect of *Propionibacterium acidipropionici* P169 on the rumen and faecal microbiota of beef cattle fed a maize-based finishing diet. *Beneficial Microbes* 8:785-799.
- Bekele AZ, Koike S, Kobayashi Y. 2011. Phylogenetic diversity and dietary association of rumen *Treponema* revealed using group-specific 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS Microbiology Letters* 316:51-60.
- Cai S, Dong X. 2010. *Cellulosilyticum ruminicola* gen. nov., sp. nov., isolated from the rumen of yak, and reclassification of *Clostridium lentocellum* as *Cellulosilyticum lentocellum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:845-849.
- Cui MD, Wang X, Jiang WK, Hu G, Yang ZG, Sun GJ, Zhu SJ, Zhou YD, Hong Q. 2018. *Pedobacter agrisoli* sp. nov., isolated from farmland soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68:886-891.
- De Maesschalck, C, Van Immerseel F, Eeckhaut V, De Baere S, Cnockaert M, Croubels S, Haesebrouck F, Ducatelle R, Vandamme P. 2014. *Faecalicoccus acidiformans* gen. nov., sp. nov., isolated from the chicken caecum, and reclassification of *Streptococcus pleomorphus* (Barnes et al. 1977), *Eubacterium bifforme* (Eggerth 1935) and *Eubacterium cylindroides* (Cato et al. 1974) as *Faecalicoccus pleomorphus* comb. nov., *Holdemanella biformis* gen. nov., comb. nov. and *Faecalitalea cylindroides* gen. nov., comb. nov., respectively, within the family *Erysipelotrichaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:3877-3884.
- Dougal K, Harris PA, Edwards A, Pachebat JA, Blackmore TM, Worgan HJ, Newbold CJ. 2012. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. *FEMS Microbiology Ecology* 82:642-652.
- Downes J, Dewhirst FE, Tanner AC, Wade WG. 2013. Description of *Alloprevotella rava* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity, and reclassification of *Prevotella tanneriae* Moore et al. 1994 as *Alloprevotella tanneriae* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:1214-1218.
- Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LM. 2009. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* diversity in horse feces, revealed by PCR-DGGE. *Current Microbiology* 59:651-655.
- Finegold SM, Lawson PA, Vaisanen ML, Molitoris DR, Song Y, Liu C, Collins MD. 2004. *Anaerofustis stercorihominis* gen. nov., sp. nov., from human feces. *Anaerobe* 10:41-45.
- Ganuza E, Sellers CE, Bennett BW, Lyons EM, Carney LT. 2016. A novel treatment protects *Chlorella* at commercial scale from the predatory bacterium *Vampirovibrio chlorellavorus*. *Frontiers in Microbiology* 7:848.
- Gerritsen J, Fuentes S, Grievink W, van Niftrik L, Tindall BJ, Timmerman HM, Rijkers GT, Smidt H. 2014. Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asacharospira* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:1600-1616.
- Golomidova A, Kulikov E, Isaeva A, Manykin A, Letarov A. 2007. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces re-



- veals a complex pattern of ecological interactions. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5975-5981.
- Harris SR, Robinson C, Steward KF, Webb KS, Paillot R, Parkhill J, Holden MT, Waller AS. 2015. Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Streptococcus equi*, is driven by persistent infection. *Genome Research* 25:1360-1371.
- Horino H, Fujita T, Tonouchi A. 2014. Description of *Anaerobacterium chartisolvans* gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic bacterium from *Clostridium* rRNA cluster III isolated from soil of a Japanese rice field, and reclassification of *Bacteroides cellulosolvans* Murray et al. 1984 as *Pseudobacteroides cellulosolvans* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:1296-1303.
- Julliard V, de Vaux A, Millet L, Fonty G. 1999. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3738-3741.
- Julliard V, Grimm P. 2016. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. *Journal of Animal Science* 94:2262-2274.
- Kageyama A, Benno Y. 2000. *Catenibacterium mitsuokai* gen. nov., sp. nov., a gram-positive anaerobic bacterium isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1595-1599.
- Kim M, Kim J, Kuehn LA, Bono JL, Berry ED, Kalchayanand N, Freetly HC, Benson AK, Wells JE. 2014. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. *Journal of Animal Science* 92:683-694.
- Kim M, Morrison M, Yu Z. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology* 76:49-63.
- Kim M, Park T, Yu Z. 2017. Metagenomic investigation of gastrointestinal microbiome in cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 30:1515-1528.
- Kim M, Wells JE. 2016. A meta-analysis of bacterial diversity in the feces of cattle. *Current Microbiology* 72:145-151.
- Kläring K, Hanske L, Bui N, Charrier C, Blaut M, Haller D, Plugge CM, Clavel T. 2013. *Intestinimonas butyriciproducens* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the mouse intestine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:4606-4612.
- Kopečný J, Zorec M, Mrazek J, Kobayashi Y, Marinšek-Logar R. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:201-209.
- Kumar S, Treloar BP, The KH, McKenzie CM, Henderson G, Attwood GT, Waters SM, Patchett ML, Janssen PH. 2018. *Sharpea* and *Kandleria* are lactic acid producing rumen bacteria that do not change their fermentation products when co-cultured with a methanogen. *Anaerobe* 54:31-38.
- Larue R, Yu Z, Parisi VA, Egan AR, Morrison M. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing. *Environmental Microbiology* 7:530-543.
- Lau SK, McNabb A, Woo GK, Hoang L, Fung AM, Chung LM, Woo PC, Yuen KY. 2007. *Catabacter hongkongensis* gen. nov., sp. nov., isolated from blood cultures of patients from Hong Kong and Canada. *Journal of Clinical Microbiology* 45:395-401.
- Lau SK, Woo PC, Woo GK, Fung AM, Wong MK, Chan KM, Tam DM, Yuen KY. 2004. *Eggerthella hongkongensis* sp. nov. and *Eggerthella sinensis* sp. nov., two novel *Eggerthella* species, account for half of the cases of *Eggerthella* bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 49:255-263.
- Lauková A, Simonová M, Stropfová V, Štyriak I, Ouwehand AC, Várady M. 2008. Potential of Enterococci isolated from horses. *Anaerobe* 14:234-236.
- Lee GH, Kumar S, Lee JH, Chang DH, Kim DS, Choi SH, Rhee MS, Lee DW, Yoon MH, Kim BC. 2012. Genome sequence of *Oscillibacter ruminantium* strain GH1, isolated from rumen of Korean native cattle. *Journal Bacteriology* 194:6362.
- Matthies C, Evers S, Ludwig W, Schink B. 2000. *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1591-1594.
- Moriarty EM, Downing M, Bellamy J, Gilpin BJ. 2015. Concentrations of faecal coliforms, *Escherichia coli*, enterococci and *Campylobacter* spp. in equine faeces. *New Zealand Veterinary Journal* 63:104-109.
- Morita H, Nakano A, Shimazu M, Toh H, Nakajima F, Nagayama M, Hisamatsu S, Kato Y, Takagi M, Takami H, Akita H, Matsumoto M, Masaoka T, Murakami M. 2009. *Lactobacillus hayakitensis*, *L. equigenerosi* and *L. equi*, predominant lactobacilli in the intestinal flora of healthy thoroughbreds. *Animal Science Journal* 80:339-346.
- Morita H, Shiratori C, Murakami M, Takami H, Toh H, Kato Y, Nakajima F, Takagi M, Akita H, Masaoka T, Hattori M. 2008. *Sharpea azabuensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive, strictly anaerobic bacterium isolated from the faeces of thoroughbred horses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:2682-2686.
- Morotomi M, Nagai F, Sakon H, Tanaka R. 2009. *Paraprevotella clara* gen. nov., sp. nov. and *Paraprevotella xylaniphila* sp. nov., members of the family 'Prevotellaceae' isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:1895-1900.
- Morotomi M, Nagai F, Watanabe Y. 2012. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order *Clostridiales*, and proposal of *Christensenellaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:144-149.
- Moyaert H, Decostere A, Vandamme P, Debruyne L, Mast J, Baele M, Ceelen L, Ducatelle R, Haesebrouck F. 2007. *Helicobacter equorum* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from horsefaeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:213-218.



- O'Donnell MM, Harris HM, Jeffery IB, Claesson MJ, Younger B, O'Toole PW, Ross RP. 2013. The core faecal bacterial microbiome of Irish Thoroughbred racehorses. *Letters in Applied Microbiology* 57:492-501.
- Perea K, Perz K, Olivo SK, Williams A, Lachman M, Ishaq SL, Thomson J, Yeoman CJ. 2017. Feed efficiency phenotypes in lambs involve changes in ruminal, colonic, and small-intestine-located microbiota. *Journal of Animal Science* 95:2585-2592.
- Pierce E, Becker DF, Ragsdale SW. 2010. Identification and characterization of oxalate oxidoreductase, a novel thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxoacid oxidoreductase that enables anaerobic growth on oxalate. *Journal of Biological Chemistry* 285:40515-40524.
- Qiu YL, Muramatsu M, Hanada S, Kamagata Y, Guo RB, Sekiguchi Y. 2013. *Oligosphaera ethanolica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, carbohydrate-fermenting bacterium isolated from methanogenic sludge, and description of *Oligosphaeria classis* nov. in the phylum *Lentisphaerae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:533-539.
- Schleifer KH, Kilpper-Bälz R, Devriese LA. 1984. *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov.: three new coagulase-negative, novobiocin-resistant species from animals. *Systematic and Applied Microbiology* 5:501-509.
- Shi H, Chang Y, Gao Y, Wang X, Chen X, Wang Y, Xue C, Tang Q. 2017. Dietary fucoidan of *Acaudina molpadioides* alters gut microbiota and mitigates intestinal mucosal injury induced by cyclophosphamide. *Food & Function* 8:3383-3393.
- Simonová M, Lauková A, Styriak I. 2005. *Enterococci* from rabbits-potential feed additive. *Czech Journal of Animal science* 50:416.
- Smet A, Cools P, Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Haesebrouck F, Kempf M, Nemec A, Vaneechoutte M. 2014. *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:4007-4015.
- Ueki A, Akasaka H, Suzuki D, Ueki K. 2006. *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:39-44.
- Wong K, Shaw TI, Oladeinde A, Glenn TC, Oakley B, Molina M. 2016. Rapid microbiome changes in freshly deposited cow feces under field conditions. *Frontiers in Microbiology* 7:500.
- Wu F, Guo X, Zhang J, Zhang M, Ou Z, Peng Y. 2017. *Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract. *Experimental and Therapeutic Medicine* 14:3122-3126.
- Yan W, Xiao X, Zhang Y. 2016. Complete genome sequence of the *Sporosarcina psychrophila* DSM 6497, a psychrophilic *Bacillus* strain that mediates the calcium carbonate precipitation. *Journal of Biotechnology* 226:14-15.
- Yuan K, Cao M, Li J, Wang G. 2018. *Pedobacter mongoliensis* sp. nov., isolated from grassland soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68:1112-1117.
- Zhang HH, Wang Y, Zhao C, Wang J, Zhang XL. 2017. Biodegradation of ochratoxin A by *Alcaligenes faecalis* isolated from soil. *Journal of Applied Microbiology* 123:661-668.
- Zhang J, Shi H, Wang Y, Cao Z, Yang H, Li S. 2018. Effect of limited diets with different forage to concentrate ratios on fecal bacterial and archaeal community composition in holstein heifers. *Frontiers in Microbiology* 9:976.
- Zhao Y, Li B, Bai D, Huang J, Shiraigo W, Yang L, Zhao Q, Ren X, Wu J, Bao W, Dugarjaviin M. 2016. Comparison of fecal microbiota of Mongolian and Thoroughbred Horses by high-throughput sequencing of the V4 Region of the 16S rRNA gene. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 29:1345-1352.
- 박설화, 신상민, 양병철, 김남영, 우제훈, 신문철, 유지현, 손준규. 2018. Jeju Crossbred Horses 정액 생산 시 Pentoxifylline 농도 가정자 성장에 미치는 영향. *J. Emb. Trans.* 33:17-22.