

ANIMAL

Positive effects of grazing on blood components and intestinal microbiota in growing horses

Ji Hyun Yoo^{1,2,*}, Jong An Lee¹, Jae Young Choi¹, Sang Min Shin¹, Moon Cheol Shin¹, Hyeon Ah Kim¹, Yong Jun Kang¹, Hee Chung Ji¹, In Cheol Cho¹, Byoung Chul Yang¹

¹Subtropical Livestock Research Institute, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Jeju 63242, Korea

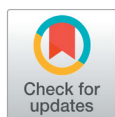
²Division of Animal and Dairy Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

*Corresponding author: yoojihyun1@korea.kr

Abstract

Production of high-quality horses is important to make the horse industry grow. Grazing during the growing period can be an important factor affecting the production of high-quality horses. The objective of this study was to determine the effects of grazing on growing horses by analyzing their blood components and intestinal microbiota. Twelve growing horses for evaluating blood components and ten growing horses for evaluating intestinal microbiota were raised for about seven months and separated by two treatments: grazing vs. stable. Complete blood count, blood chemistry, and creatine kinase levels were analyzed as blood components and a 16s rRNA gene sequence analysis was performed to analyze intestinal microbiota. Calcium ions tended to be lower in the group with grazing treatment. Alkaline phosphatase and creatine kinase tended to be higher in the group with grazing treatment. These results indicate that grazing can provide horses with more exercise than staying in stables. At the phylum level, *Firmicutes/Bacteroidetes* ratios in grazing and stable groups were 4.2 and 6.5, respectively. Because various studies have reported that a high *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio indicates obesity, the method of raising horses might affect their physical ability. At the species level, rates of *Clostridium butyricum* in grazing and stable groups were 3.2% and 13.1%, respectively. Some strains of *C. butyricum* can cause several diseases such as botulism. These results indicate that grazing can positively affect growing horses in terms of blood components and intestinal microbiota. Moreover, grazing can be helpful to make growing horses healthy through proper exercise.

Key words: blood components, grazing, growing horses, intestinal microbiota



 OPEN ACCESS

Citation: Yoo JH, Lee JA, Choi JY, Shin SM, Shin MC, Kim HA, Kang YJ, Ji HC, Cho IC, Yang BC. Positive effects of grazing on blood components and intestinal microbiota in growing horses. Korean Journal of Agricultural Science 49:963-971. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20220087>

Received: August 10, 2022

Revised: November 23, 2022

Accepted: November 25, 2022

Copyright: © 2022 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

말 산업 육성 5개년 계획 등을 통해 국내 말 산업을 육성하기 위한 지속적인 노력이 이루어졌다. 그 결과로 COVID-19 pandemic 이전인 2019년에는 총 말 사육 두수가 약 27,246두이고, 산업 규모가 약 34,125억 원으로 조사되는 등 상당한 규모까지 성장한 상태라고 볼 수 있다(KRA, 2020). 이러한 말 산업을 지속적으로 육성하기 위해서는 건강하고 우수한 말 개체들을 계속해서 공급해 주는 것이 중요하고 우수한 말을 생산하기 위해서는 적절한 말 사육 관리가 필요하다고 본다.

우수한 말을 생산하기 위해서는 육성기 말 사육이 중요하다. 말이 2세가 되기 전의 육성마 기간에 골격과 체형이 급속도로 발달하는데, 이때 방목을 통한 자연스럽게 적절한 운동이 말의 성장과 강건성 제고에 큰 도움이 된다(Jelan et al., 1996; Morel et al., 2007; Fradinho et al., 2016; 2019). 그리고 방목은 말 개체 사이의 사회화 훈련을 자연스럽게 시켜주는 방법으로 무리 생활에 잘 적응하도록 해준다(Glunk et al., 2014; Davis et al., 2020). 또한 행동학적으로 무리생활을 하고 이동생활을 하기 때문에 일정한 수의 말들과 함께 방목을 시키는 것이 말 스트레스 관리에 중요하며, 뛰거나 이동함으로써 스트레스를 해소하기 때문에 일정한 넓이의 공간을 확보하는 것이 중요하다(Chodkiewicz, 2020). 이처럼 말에게 적절한 방목지를 확보해 주는 것은 이상행동을 예방하고 복지를 실현할 수 있게 해주는 것으로 알려져 있다(Visser et al., 2012; Bott et al., 2013).

하지만 육성기 말에게 중요한 방목이 개체에게 미치는 영향에 대한 연구는 사실상 미흡한 실정이라고 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서는 방목이 육성마의 생리적 특성에 미치는 영향을 분석하여 방목이 육성마 개체에게 어떻게 작용하는 지 알아보고자 하였다. 특히 생리적 특성 중 혈액 성분과 장내 미생물이 축사에서 사육(사사)된 육성마에 비해 어떻게 달라지는 지 알아보고자 하였다. 동물의 혈액 성분은 건강상태와 체내의 생리적인 변화를 확인하는 주요 지표로 활용되는 데(Lee et al., 2002), 특히 creatine kinase, 칼슘이온 등은 근육운동과 관련성이 높은 혈액 화학치이다(Park et al., 2016). 또한 말은 후장(hindgut)에서 음식을 소화시키는 초식동물로 대장에서의 미생물 활동이 매우 중요하다. 그리고 장내 미생물의 경우 마치 '블랙박스'처럼 동물의 건강상태나 생리적 상태를 알 수 있게 해주는 주요 지표로 활용된다(Julliand and Grimm, 2016; Garber et al., 2020; Park et al., 2021). 이러한 지표들을 활용하여 육성기 말을 방목시켰을 때 사사된 육성마와의 생리적인 차이를 구명하고자 본 연구를 수행하였다.

Materials and Methods

시험 재료 및 개요

공시축 및 처리구 배치

사육 방법에 따른 혈액 성분 변화를 보기 위한 시험은 2020년 3월부터 2020년 11월까지 약 7개월간 이루어졌다. 제주도 소재의 국립축산과학원 난지축산연구소의 방목지와 말 사육시설에서 진행되었다. 12개월령 내외의 암컷 국내산 승용마(더러브렛 × 제주마) 12두를 공시하여 방목 및 사사 2개의 처리구를 설정하고 각 6두씩 배치하였다.

사육 방법에 따른 장내 미생물 변화를 보기 위한 시험은 2021년 3월부터 2021년 11월까지 약 7개월간 이루어졌다. 시험 장소는 혈액 성분 시험과 동일했고, 12개월령 내외의 암컷 국내산 승용마(더러브렛 × 제주마) 10두를 공시하여 방목 및 사사 2개의 처리구를 설정하고 각 5두씩 배치하였다.

말 사양 관리

두 시험 모두에서 방목 처리구의 시험축들은 전 기간 주야 방목으로 사육되었다. 방목지 면적은 약 1.5 ha 정도였고, orchard grass와 tall fescue 위주로 혼합 파종된 목초지였다. 농후사료를 처리구 평균 체중의 약 1% 정도 수준으로 추가 급여해주었다. 사사 처리구의 시험축들은 전 기간 축사 내에서 사육되었다. 축사는 약 100 m² 크기의 계류식 축사를 사용하였다. 조사료는 건초를 무제한 급여하였고 농후사료는 처리구 평균 체중의 약 1% 정도 수준으로 급여하였다.

주요 수행 내용

육성마 방목에 따른 혈액 성분 변화 분석

혈액 성분 분석을 위한 채혈을 사육 기간 중 총 5회(3.30., 4.28., 6.1., 8.5., 11.16.) 실시하였는데 말들이 공복을 유지한 상태에서 경정맥에 주사기를 사용하여 실시하였다. 그리고 혈액일반성분(complete blood count, CBC), 혈액화학검사(blood chemistry)를 분석하였고, 추가로 creatine kinase (CK)를 분석하였다. 이들 분석 항목들은 표준분석법에 의거하여 분석하였다.

육성마 방목에 따른 장내 미생물 분석

장내 미생물 분석을 위해 말의 분변을 직장에서 직접 채취하였다. 분변은 사육 종료 후(11월) 채취하였다. 채취 후 시료에서 Genomic DNA를 추출하기 위해 QIAamp PowerFecal DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였고 제품 프로토콜에 따라 진행하였다. 이후 표준 분석법에 의거하여 16s rRNA gene의 V3-V4 hypervariable region을 기반으로 특성을 분석하였다. 미생물 종 분류는 QIIME (version 1.9.1 ; Caporaso et al., 2010)를 통해 분석을 진행했고 UCLUST 알고리즘을 사용하였으며 서열 참조 데이터베이스로 RDP를 사용하도록 구성되었다.

통계 분석

본 연구의 자료들의 통계 처리는 STATA BE 17 software (StataCorp., Texas, USA)를 이용하여 분석하였다. 처리 간에 차이는 Independent sample t-test를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

Results and Discussion

육성마 방목에 따른 혈액 성분 변화

혈액 분석 결과 중 적혈구 수(red blood cell, RBC), 평균적혈구헤모글로빈농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 백혈구 수(white blood cell, WBC)를 Table 1에 나타내었다. 세가지 항목 모두 시험 기간 동안 처리 간의 유의적인 차이가 나타나지는 않았다. RBC와 MCHC는 유산소 능력 향상과 관련이 있는 지표이나(Bailey and Davies, 1997; Hahn et al., 2001; Kim et al., 2013) 주로 고도의 차이가 큰 경우와 같이 환경적 영향의 차이가 큰 경우에 주로 유의적인 차이를 보일 수 있는 것으로 사료된다. 본 연구에서의 방목 과 사사 사육 환경은 고도가 비슷하다는 등의 이유로 유산소 능력에 유의미한 차이를 만들 수 있는 환경은 아니었던 것으로 사료된다. WBC의 경우 처리 간의 유의적인 차이는 없었으나, 분석 시기에 따라 평균값이 방목 처리구가 컸다가 사사 처리구가 커지는 등, 변동되는 경향을 보였는데 축사 내외부 기상 등의 환경에 따라 생리적인 반응이 달라졌기 때문으로 사료된다. 운동 시 생

리적으로 필수적인 요소로 알려져 있는 칼슘 이온(calcium, Ca²⁺)의 경우(Kim and Lee, 2017; Berchtold et al., 2000) 처리 간에 유의적인 차이는 대체로 없었으나 평균 값이 방목 처리구에서 대체로 낮은 경향을 보였다(Table 1). Ca²⁺은 운동하는 과정에서 3단계의 주요 기작을 통해 근육의 수축과 이완을 조절하는 역할을 한다. 그중 3번째 기작에서 myosin에 결합되는 것으로 알려져 있는데 지속적인 운동이 혈액 내 Ca²⁺ 소모에 영향을 준 것으로 사료된다(Berchtold et al., 2000). 육성기에 뼈와 연골 등 신체 성장과 관련이 있다고 알려진 alkaline phosphatase가 방목 육성마에서 대체로 높은 경향을 보였는데(Table 1) 이를 통해 방목 시 자연스러운 운동의 효과로 인해 뼈의 성장이 촉진될 수 있을 것으로 사료된다(Henson et al., 1995; Lee et al., 2006; Cappai et al., 2018). Creatine kinase는 효소의 일종으로 creatine phosphate와 adenosine diphosphate (ADP)를 adenosine triphosphate (ATP)로 전환하여 동물에게 에너지를 제공하기 위한 기작에 필수적이다(Jackson et al., 1996). 따라서 동물의 운동과 관련이 있는데 방목 육성마에서 전체적으로 높은 경향을 보였다(Table 1). 방목 시 더 많아지는 운동량이 영향을 미친 것으로 사료된다.

Table 1. Blood components of growing horses during the experiment.

Item and treatment	3.30.	4.28.	6.1.	8.5.	11.16.
Red blood cell (10 × 12·L ⁻¹)					
Grazing	9.6 ± 2.7	5.7 ± 1.0	5.9 ± 0.7	5.9 ± 0.6	9.8 ± 0.6
Stable	8.8 ± 0.4	5.7 ± 0.6	5.8 ± 0.7	5.6 ± 1.0	10.1 ± 1.2
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g·dL ⁻¹)					
Grazing	35.9 ± 0.9	58.5 ± 5.9	63.3 ± 7.0	59.7 ± 4.7	33.1 ± 0.6
Stable	35.3 ± 0.3	60.4 ± 4.8	60.7 ± 4.4	59.2 ± 6.1	34.3 ± 1.7
White blood cell (10 × 9·L ⁻¹)					
Grazing	10.7 ± 2.7	42.2 ± 10.2	39.0 ± 7.9	39.3 ± 7.8	8.1 ± 2.8
Stable	12.6 ± 0.1	35.1 ± 7.3	36.8 ± 10.2	38.1 ± 11.3	9.6 ± 1.5
Calcium (Ca ²⁺ , mg·dL ⁻¹)					
Grazing	11.2 ± 0.7	11.8 ± 0.2a	11.6 ± 0.6	10.6 ± 1.2	11.9 ± 0.6
Stable	11.1 ± 0.7	11.5 ± 0.2b	12.2 ± 0.4	11.2 ± 0.2	12.2 ± 0.3
Alkaline phosphatase (U·L ⁻¹)					
Grazing	399.5 ± 50.6	401.3 ± 44.6a	390.0 ± 27.5a	320.8 ± 36.9	315.8 ± 66.8
Stable	381.0 ± 60.7	345.5 ± 40.4b	308.2 ± 23.0b	287.2 ± 38.5	295.2 ± 45.3
Creatine kinase (IU·L ⁻¹)					
Grazing	315.7 ± 70.6	285.7 ± 23.6	369.2 ± 50.4 a	295.0 ± 70.9	368.7 ± 96.3
Stable	615.8 ± 217.8	323.5 ± 185.3	239.7 ± 18.6 b	247.2 ± 41.3	308.5 ± 57.1

Mean ± standard deviation.

a, b: Means in a row with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

육성마 방목에 따른 장내 미생물 특성 변화

시험 종료 후 육성마들의 문 수준과 속 수준, 중수준에서의 장내 미생물 분석 결과를 Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3에 나타내었다. 상대적 비율이 1%를 초과하는 미생물들만 표시했다. 분류되지 않은 미생물들은 et cetera로 표시하였고 이들에 대해서도 향후 연구가 필요 할 것으로 사료된다.

문 수준에서 방목 및 사사 처리구의 *Firmicutes* 비율이 각각 63.7, 69.8%로 사사 처리구에서 상당히 높게 나타났다(Fig. 1) ($p < 0.05$). 그 다음으로는 *Bacteroidetes*가 각각 15.5, 11.4%로 나타났고 방목 처리구에서 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 1) ($p < 0.05$). 방목 처리구의 육성마들의 장내에는 *Bacteroidetes*가 높은 비율을 차지하고 사사 처리구의 육성마들의 장내에서는 *Firmicutes*가 높은 비율을 차지하는 것으로 나타났다.

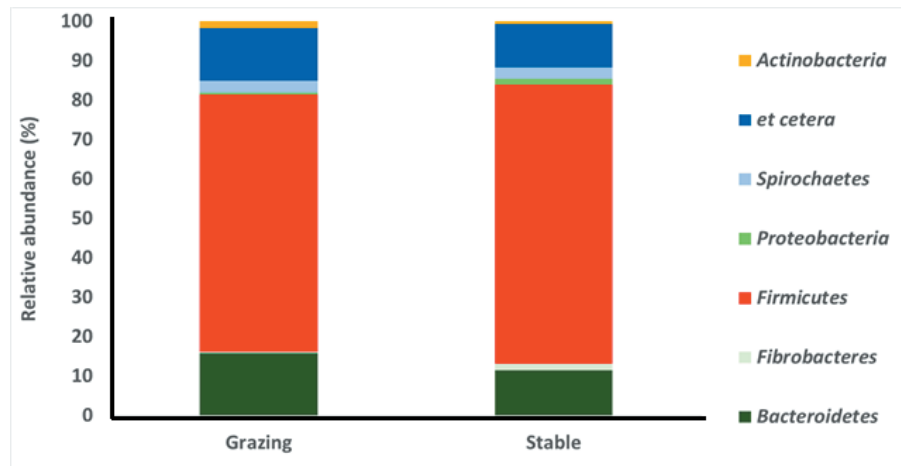


Fig. 1. Taxonomic relative abundance of growing horses' intestinal microbiota in phylum level after the experiment.

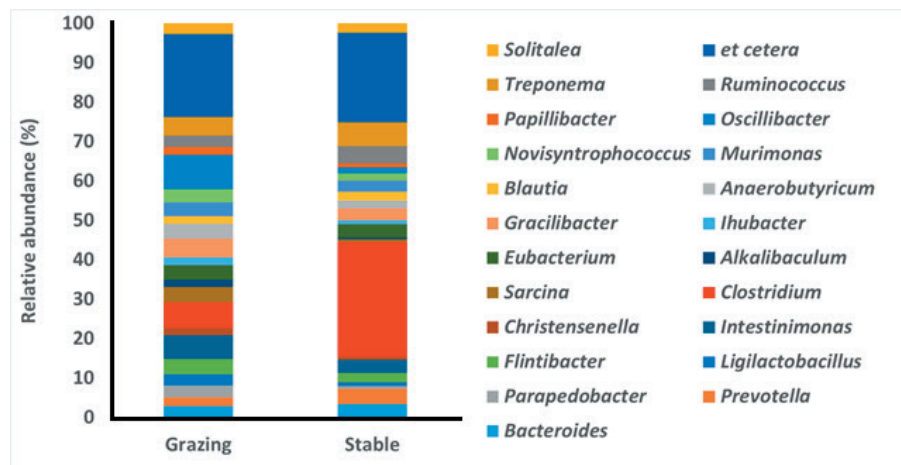


Fig. 2. Taxonomic relative abundance of growing horses' intestinal microbiota in genus level after the experiment.

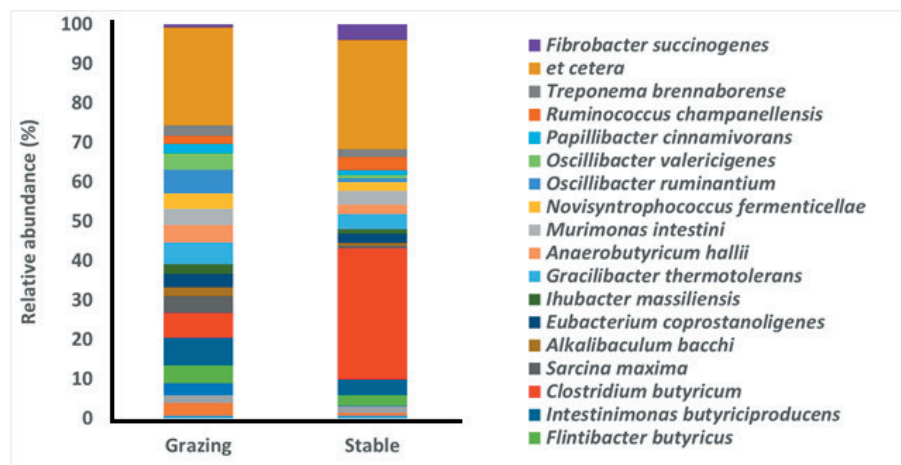


Fig. 3. Taxonomic relative abundance of growing horses' intestinal microbiota in species level after the experiment.

장내 미생물 중 *Firmicutes*와 *Bacteroidetes*는 사람과 동물에서 비만도를 측정하는 지표로 활용된다. 다수의 연구에서 비만도가 높을수록 *Firmicutes/Bacteroidetes*의 비가 높아진다고 보고한 바가 있다(Morrison et al., 2018; Garber et al., 2020; Magne et al., 2020; Stojanov et al., 2020; Park et al., 2021). 본 연구에서의 *Firmicutes/Bacteroidetes*의 비가 방목 및 사사 처리구에서 각각 약 4.2과 6.5로 나타나 육성기 말의 사사 사육이 말의 비만으로 이어질 수도 있는 것으로 사료된다. 특히 Indiani 등은 어린이들에게서 소아비만도가 높을 경우 *Firmicutes/Bacteroidetes*비가 높게 나타난다고 보고하였다(Indiani et al., 2018). 이를 통해 육성기 말 사육 방법이 말의 비만도에 더욱 크게 작용할 수 있을 것으로 사료된다. 말은 경마, 승마 등 주로 운동능력이 요구되는 축종으로 이를 위해서는 근육 및 골격의 발달이 중요하다. 하지만 비만도의 상승은 이러한 신체 능력 및 운동 능력을 저해할 수 있고 말의 경제성을 저하시킬 우려가 있을 것으로 사료된다.

문 수준에서, 위 두 종류의 미생물 다음으로 높게 나타난 것은 *Spirochaetes*로, 비율이 각각 2.9, 2.9%로 나타났다(Fig. 1). *Spirochaetes*는 말과 소에서 피부병(dermatitis)과 연관이 있는 미생물로 알려져 있다(Rashmir-Raven et al., 2000). 그리고 속 수준에서 *Spirochaetes treponema*는 질병 역학조사의 지표로 활용될 수 있는 미생물로 알려져 있다(Marčeková et al., 2021). 속 수준에서, *S. treponema* 역시 각각 약 2.9, 2.9%로 처리 간의 비율 차이는 없었다(Fig. 2). 또한 두 처리구 모두 문 수준에서 *Spirochaetes*의 비율이 다소 낮은 편으로 나타나 육성기 말 사육 방법이 피부병 등의 질병에 미치는 영향은 높지 않은 것으로 사료된다(Fig. 1).

문 수준에서 *Fibrocacteres*의 비율이 높지는 않았지만 사사 처리구에서 약 1.6%로 방목 처리구의 약 0.4%보다 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 1) ($p < 0.05$). *Fibrocacteres* 문 미생물은 주로 lignocellulic materials의 분해에 관여하는 미생물들로 종 수준에서 *Fibrobacter succinogenes*도 방목 및 사사 처리구가 각각 0.4, 1.6%로 처리 간의 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다(Daly et al., 2001; Ransom-Jones et al., 2012) (Fig. 3) ($p < 0.05$). 이것은 주로 생초를 먹어야 하는 방목 생활과 건초를 섭취하는 사사 생활의 차이에서 기인했을 것으로 사료된다. 하지만 Zhu 등(2021)은 목초(pasture grass), 사일리지(silage), 건초(hay)를 각각 급여한 말들의 장내 미생물 비율을 비교했을 때 문 수준에서 *Fibrocacteres*의 비율이 처리 간에 유의적인 차이가 없다고 하여 본 연구와 다른 결과를 보고하였다. 또한 *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes* 중 *Spirochaetes*만 차이가 나타나는 것으로 보고하였다(Zhu et al., 2021). 따라서 방목 및 사사 육성마의 장내 미생물 차이는 사료의 종류보다는 적절한 운동 가능 여부 등 사육 환경이 다른 점에서 기인했을 가능성도 있는 것으로 사료되어 추후 이를 확인하기 위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

속 수준에서 *Clostridium*이 방목 및 사사 처리구에서 각각 약 4.0, 13.8%로 사사 처리구에서 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 2) ($p < 0.05$), 종 수준에서 *Clostridium butyricum*이 방목 및 사사 처리구에서 각각 약 3.2, 13.1%로 사사 처리구에서 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 3) ($p < 0.05$). *Clostridium butyricum*은 자연에서 자주 발견되는 미생물로, 일부 strain들은 사람과 동물에서 독성이 없고 probiotics로 사용되기도 한다. 하지만 일부 strain들은 병원성 미생물로 작용하여 유아에게 botulism을 일으키는 원인이 되고 조산 된 신생아의 necrotizing enterocolitis를 일으키는 원인이 되기도 하는 등 장 점막에 좋지 않은 영향을 준다(Cassir et al., 2016). 이렇게 특히 어린 동물의 장에 좋지 않은 영향을 줄 수 있는 *C. butyricum*가 사사 처리구에서 높게 나타난 것은 축사 환경이 방목에 비해 어린 말의 장 건강에 좋지 않게 작용할 수 있다는 것을 의미한다고 사료된다. 하지만 다양한 *C. butyricum*의 종류가 보고되고(Cassir et al., 2016; Hwang et al., 2016) 그에 따른 특성이 다양한 점을 고려하여 이 부분에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Conclusion

본 연구는 말에게 가장 중요한 시기라고 알려진 육성기에 방목시켰을 때 생리적 특성에 미치는 영향을 분석하여 말 방목의 효과를 구명해 말 방목 사양 시스템 설정 등에 활용할 수 있도록 하기 위하여 수행되었다. 혈액 성분 분석 결과 운동 및 골격 성장과 관련된 칼슘 이온, alkaline phosphatas 등의 항목들이 방목 사육 된 육성마들에서 사육 육성마들에 비해 긍정적인 수치를 보여 방목이 말들에게 일정 수준 자연스러운 운동이 가능하도록 하는 것으로 볼 수 있다고 사료된다. 장내 미생물 분석 내용 중, 문 수준에서 *Firmicutes/Bacteroidetes*의 비가 사사 처리구에서 높은 것으로 나타났다. *Firmicutes/Bacteroidetes*의 비는 다수의 선행 연구에서 값이 높을수록 사람 및 동물의 비만도가 높다고 보고된 바가 있어 방목이 육성마의 신체능력 관리에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한 종 수준에서 botulism과 necrotizing enterocolitis를 일으키는 병원성 미생물인 *Clostridium butyricum* 비율이 사사 처리구에서 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과들을 종합하여 볼 때 육성기에 말을 방목시킨다면 자연스러운 운동이 사사되는 말들 보다 더 많이 이루어질 수 있고, 신체적, 생리적으로 강건성이 증진 될 수 있을 것으로 사료된다.

Conflict of Interests

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

Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 시험연구사업(연구개발과제명: 방목초지 일년생 사료작물 생산 기술 및 육성마 방목 효과에 관한 연구, 연구개발과제번호: PJ01486401)의 지원으로 수행되었습니다.

Authors Information

Ji Hyun Yoo, <https://orcid.org/0000-0003-1815-4115>

Jong An Lee, <https://orcid.org/0000-0002-4761-1808>

Jae Young Choi, <https://orcid.org/0000-0001-8264-1482>

Sang Min Shin, <https://orcid.org/0000-0001-7924-1365>

Moon Cheol Shin, <https://orcid.org/0000-0001-6744-7155>

Hyeon Ah Kim, <https://orcid.org/0000-0002-4203-9857>

Yong Jun Kang, <https://orcid.org/0000-0001-8949-7831>

Hee Chung Ji, <https://orcid.org/0000-0002-7566-582X>

In Cheol Cho, <https://orcid.org/0000-0003-3459-1999>

Byoung Chul Yang, <https://orcid.org/0000-0002-2519-0352>

References

- Bailey D, Davies B. 1997. Physiological implications of altitude training for endurance performance at sea level: A review. *British Journal of Sports Medicine* 31:183-190.
- Berchtold M, Brinkmeier H, Muntener M. 2000. Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological Reviews* 80:1215-1265.
- Bott R, Greene E, Koch K, Martinson K, Siciliano P, Williams C, Trotter N, Burk A, Swinker A. 2013. Production and environmental implications of equine grazing. *Journal of Equine Veterinary Science* 33:1031-1043.
- Caporaso J, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F, Costello E, Fierer N, Peña A, Goodrich J, Knight R, et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7:335-336.
- Cappai M, Picciau M, Dimauro C, Cherchi R, Pinna W. 2018. Circulating levels of total cholesterol and alkaline phosphatase in healthy foals from weaning to 18 months of age vary significantly in relation to growth stage. *Journal of Equine Veterinary Science* 62:102-108.
- Cassir N, Benamar S, La Scola B. 2016. *Clostridium butyricum*: From beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection* 22:37-45.
- Chodkiewicz A. 2020. Advantages and disadvantages of polish primitive horse grazing on valuable nature areas-a review. *Global Ecology and Conservation* 21:e00879.
- Daly K, Stewart C, Flint H, Shirazi-Beechey S. 2001. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* 38:141-151.
- Davis K, Iwaniuk M, Dennis R, Harris P, Burk A. 2020. Effects of grazing muzzles on behavior, voluntary exercise, and physiological stress of miniature horses housed in a herd. *Applied Animal Behaviour Science* 232:105108.
- Fradinho M, Bessa R, Ferreira-Dias G, Caldeira R. 2016. Growth and development of the Lusitano horse managed on grazing systems. *Livestock Science* 186:22-28.
- Fradinho M, Mateus L, Bernardes N, Bessa R, Caldeira R, Ferreira-Dias G. 2019. Growth patterns, metabolic indicators and osteoarticular status in the Lusitano horse: A longitudinal study. *PLoS ONE* 14:e0219900.
- Garber A, Hastie P, Murray J. 2020. Factors influencing equine gut microbiota: Current knowledge. *Journal of Equine Veterinary Science* 88:102943.
- Glunk E, Sheaffer C, Hathaway M, Martinson K. 2014. Interaction of grazing muzzle use and grass species on forage intake of horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 34:930-933.
- Hahn A, Gore C, Martin D, Ashenden M, Roberts A, Logan P. 2001. An evaluation of the concept of living at moderate altitude and training at sea level. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 128:777-789.
- Henson F, Davies M, Skepper J, Jeffcott L. 1995. Localisation of alkaline phosphatase in equine growth cartilage. *Journal of Anatomy* 187:151-159.
- Hwang O, Lee Y, Cho S, Han D, Lee S, Kwag J, Park S. 2016. The effect of palm kernel meal supplementation in the diet on the growth performance and meat quality of swine, and on the level of odorous compounds and bacterial communities in swine manure. *Korean Journal of Agricultural Science* 43:777-787. [in Korean]
- Indiani C, Rizzardi K, Castelo P, Ferraz L, Darrieux M, Parisotto T. 2018. Childhood obesity and firmicutes/bacteroidetes ratio in the gut microbiota: A systematic review. *Childhood Obesity* 14:501-509.
- Jackson C, de Lahunta A, Divers T, Ainsworth D. 1996. The diagnostic utility of cerebrospinal fluid creatine kinase activity in the horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10:246-251.
- Jelan Z, Jeffcott L, Lundeheim N, Osborne M. 1996. Growth rates in Thoroughbred foals. *Pferdeheilkunde* 12:291-295.
- 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.
- Kim H, Lee W. 2017. Exercise and reactive oxygen species. *Journal of Life Science* 27:1078-1085.
- Kim J, Lee B, Kim N, Choi Y. 2013. Effects of high altitude training on maximal exercise capacity, RBC, and Hb concentration in cross-country skier. *The Korea Journal of Sports Science* 22:1313-1324. [in Korean]

- KRA (Korea Racing Authority). 2020. 2019 Factual survey report of horse industry. KRA, Gwacheon, Korea. [in Korean]
- Lee C, Park N, Jin S, Kim Y, Kang D, Kim K. 2002. Changes in serum vitamin E and trace mineral levels and other blood parameters in growing thoroughbred horses during the period of pasture grazing and stable feeding. *Journal of Animal Science and Technology* 44:719-726. [in Korean]
- Lee S, Lee S, Rhie Y, Kim J, Kim D, Kim H. 2006. The effect of blood zinc level on the growth of children. *Journal of Korean Society of Pediatric Endocrinology* 11:155-161. [in Korean]
- Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pesoa S, Navarrete P, Balamurugan R. 2020. The firmicutes/bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients* 12:1474.
- Marčeková P, Mad'ar M, Styková E, Kačířová J, Sondorová M, Mudroň P, Žert Z. 2021. The presence of *Treponema* spp. in equine hoof canker biopsies and skin samples from bovine digital dermatitis lesions. *Microorganisms* 9:2190.
- Morel P, Bokor A, Rogers C, Firth E. 2007. Growth curves from birth to weaning for Thoroughbred foals raised on pasture. *New Zealand Veterinary Journal* 55:319-325.
- Morrison P, Newbold C, Jones E, Worgan H, Grove-White D, Dugdale A, Barfoot C, Harris P, Argo C. 2018. The equine gastrointestinal microbiome: Impacts of age and obesity. *Frontiers in Microbiology* 9:3017.
- Park T, Cheong H, Yoon J, Kim A, Yun Y, Unno T. 2021. Comparison of the fecal microbiota of horses with intestinal disease and their healthy counterparts. *Veterinary Sciences* 8:113.
- Park Y, Kim S, Yang J. 2016. Changes of TPR and blood chemistry based on exercise intensity of riding horses. p. 49. In *The 16th International Symposium on Developmental Biotechnology*.
- Ransom-Jones E, Jones D, McCarthy A, McDonald J. 2012. The Fibrobacteres: An important phylum of cellulose-degrading bacteria. *Microbial Ecology* 63:267-281.
- Rashmir-Raven A, Black S, Rickard L, Akin M. 2000. Papillomatous pastern dermatitis with spirochetes and *Pelodera strongyloides* in a Tennessee Walking Horse. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12:287-291.
- Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. 2020. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms* 8:1715.
- Visser E, Van Wijk-Jansen E. 2012. Diversity in horse enthusiasts with respect to horse welfare: An explorative study. *Journal of Veterinary Behavior* 7:295-304.
- Zhu Y, Wang X, Deng L, Chen S, Zhu C, Li J. 2021. Effects of pasture grass, silage, and hay diet on equine fecal microbiota. *Animals* 11:1330.