

## 飼料中へのプロポリス残渣の添加が 横斑プリマスロックの盲腸内細菌叢へ及ぼす影響

伊藤 謙<sup>1</sup>・赤峰知奈美<sup>1</sup>・河田 和<sup>2</sup>・志村洋一郎<sup>2</sup>・稲元民夫<sup>2</sup>・喜多一美<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 岩手大学農学部, 岩手県盛岡市上田 020-8550

<sup>2</sup> 秋田県立大学生物資源科学部, 秋田県秋田市新城中野 010-0195

現在, 成長促進を目的として家畜・家禽の飼料へ抗生物質が添加されている。しかし, 抗生物質を長期間使用すると, 抗生物質に対する耐性菌が現れ, バイオセキュリティを脅かす可能性がある。そこで, 近年では抗生物質に代わる天然物由来の成分を飼料に添加し, 成長促進効果を示すか否か調べられている。プロポリスはミツバチによって集められ, 抗菌作用を示すことが報告されている。したがって, 本研究では, エタノール抽出後のプロポリス残渣が肉用鶏である横斑プリマスロックの盲腸内細菌叢へ及ぼす影響を調査した。プロポリス残渣を2%含む飼料を10日間, ニワトリへ給与した。対照区としてプロポリス残渣を含まない飼料を給与した。飼養期間終了後, ニワトリから盲腸を摘出し, 盲腸内容物を採取した。盲腸内容物から総DNAを抽出し, 細菌に普遍的に存在する16S rRNA遺伝子をPCR-DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)にて増幅・分離した。分離されたDNAバンドの光学強度を定量解析ソフトを用いて測定した。その結果, プロポリス残渣添加区における1本のバンドの光学強度が有意に低くなった。有意差の認められたDNAバンドの塩基配列を調べたところ Ruminococcaceae 科と同定された。本研究の結果より, プロポリス残渣を飼料へ添加することで, グラム陽性嫌気性球菌である Ruminococcaceae 科を減少させる可能性が示された。

キーワード: プロポリス残渣, 細菌叢, 盲腸, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法, 横斑プリマスロック

### 緒 言

抗生物質による成長促進作用が発見されたのは1940年代である。当時, 乾燥させた *Streptomyces aureofaciens* の菌糸およびクロールテトラサイクリン(放線菌由来の抗生物質)を飼料へ添加することで家畜の成長を促進させることが発見された(Castanon, 2007)。以後ヨーロッパでは, 法律で抗生物質の飼料への最大添加量を制限しつつ様々な抗生物質が使用されるようになった。しかし, 抗生物質を長期間使用すると抗生物質に対する耐性菌が現れ, バイオセキュリティを脅かす可能性があることが示唆され, 2006年1月1日に抗生物質を成長促進剤として動物の飼料に添加することを禁ずる法律が全EU加盟国で施行された。日本においても2004年に食品安全委員会が飼料添加物及び動物医薬品に起因する薬剤耐性菌の食品健康影響を評価するための基礎資料として, 食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗生物質の重要度のランク付けが行われた。このように, 国内外問わず家畜・家禽の飼料への抗生物質添加が問題視されるようになり, 抗生物質に代わる天然物由来の抗菌物質が注目されるように

なった。ここで, 天然物由来の抗菌物質の一つとしてプロポリスが挙げられる。プロポリスとは, ミツバチが樹皮の割れ目から樹脂を採取し, 自身の唾液と混合させたものを巣箱の隙間や壁に塗り付けたものである。プロポリスは巣の修繕および浸水防止の他に抗菌性が認められており, 巣を衛生的に保つ作用がある(照屋ら, 2006)。そこで本研究では, プロポリスの抗菌性に着目し, エタノール抽出後のプロポリス残渣を飼料へ添加した飼料を肉用鶏である横斑プリマスロックへ給与し, 盲腸内細菌叢へどのような影響を及ぼすのか調査した。盲腸内細菌叢を解析するために Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE; 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)を行った。PCR-DGGEとは, まず細菌で普遍的に存在する16S rRNA遺伝子を標的としてPCRを行う。その際, 40塩基のグアニンおよびシトシン(GCクランプ)の配列を含むプライマーを用いることで, 増幅したDNAにGCクランプを付加させ, それぞれのDNAに解離速度の違いを生じさせる。その後, 変性剤を含むゲルを用いて電気泳動を行うことで配列の異なるDNA断片を別々のバンドとして分離する方法である。最近我々は, PCR-DGGEで増幅・分離したDNAバンドの光学強度と元のサンプル中の細菌数は比例することを示した(Kita *et al.*, in press)。そこで, 本研究では, PCR-DGGEにおけるDNAバンドの光学強度の測定することで, 飼料へのプロポリス残渣添加が盲腸内細菌叢に及ぼす影響を調査した。

2013年11月8日受付, 2013年12月30日受理

連絡者: 喜多一美

〒020-8550 岩手県盛岡市上田3-18-8

Tel: 019-621-6163

Fax: 019-621-6163

E-mail: kitak@iwate-u.ac.jp

## 材料と方法

### 1. 供試鶏および飼養試験

40日齢の横斑プリマスロックを種鶏場（黎明舎種鶏場，大館，秋田）から購入し，肉用鶏飼料（穀物65%，油かす21%，魚粉6%，その他8%；CP18%，ME3,300kcal/kg）を用いて103日間飼養した。試験終了前の10日間，プロポリス残渣（角館養蜂場株式会社，八幡平，岩手）を2%添加した飼料をニワトリ6羽に給与した。本試験では，プロポリスをエタノールに2年間浸し，アルコール抽出した後の残渣を用いた。対照区として，プロポリス残渣を含まない肉用鶏飼料をニワトリ6羽へ給与した。全てのニワトリは民間の農場（ルーデンス農場，西根，岩手）内で飼育した。飼養試験終了後，ニワトリから盲腸を採取し， $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。本研究は，岩手大学動物実験委員会の承認を得ている。

### 2. 盲腸内容物からのDNA抽出

盲腸内容物からDNAを抽出する前に，盲腸内容物の洗浄を行った。盲腸から盲腸内容物1gを量り取り，ダルベッコ改変リン酸緩衝生理食塩水（DPBS）を用いて懸濁した後，ナイロンメッシュ（セルストレイナー， $100\mu\text{m}$  Nylon，BD Falcon<sup>®</sup>，日本DB株式会社，福島）へ通し，盲腸内容物から異物を除去した。サンプルを $3,300\times\text{g}$ ， $4^{\circ}\text{C}$ で10分間遠心分離した後，上清を捨て，沈殿物を $35\text{ml}$ のDPBSを用いて懸濁した。懸濁液を再び遠心分離し，上清を捨てた。沈殿物をTE buffer（ $10\text{mM}$  Tris-HCl（pH 7.5）， $1\text{mM}$  EDTA）を用いて懸濁した。懸濁液を $1\text{ml}$ 分取した後， $9,300\times\text{g}$ ， $4^{\circ}\text{C}$ で10分間遠心分離し，上清を捨てた。洗浄したサンプルは $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。洗浄したサンプルからの総DNA抽出はISOPLANT II DNA抽出キット（株式会社ニッポンジーン，東京）を用いた。抽出した総DNAは $200\mu\text{l}$ のTE bufferに溶解させた。

### 3. 盲腸内細菌のPCR-DGGE

細菌において普遍的に存在する16S rRNA遺伝子のV3領域を標的としてPCRを行うために，以下のDNAプライマーを使用した。357F-GC（5'-CGCCC GCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGCACGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3'（357Fプライマーの5'末端にアデニンを1ヌクレオチド，グアニンを25ヌクレオチドおよびシトシンを14ヌクレオチド付加），518R（5'-GTATT-ACCGCGGCTGCTGG-3'；Muyzer *et al.*, 1993）。それぞれのプライマーの濃度は $10\text{pmol}/\mu\text{l}$ に調製した。 $20\mu\text{l}$ のGo Taq Green Master Mix（Promega, Madison, WI, USA）， $2\mu\text{l}$ のプライマー溶液および $5\mu\text{l}$ のバクテリアDNA溶液（ $50\text{ng}/\mu\text{l}$ ）を混合した後，PCRを行った。PCRは以下の条件で行った。 $94^{\circ}\text{C}$ ，4分を1サイクル； $94^{\circ}\text{C}$ ，30秒， $65\text{--}56^{\circ}\text{C}$ ，30秒および $72^{\circ}\text{C}$ ，30秒を20サイクル（2サイクル毎に $1^{\circ}\text{C}$ 下げ）； $94^{\circ}\text{C}$ ，30秒， $55^{\circ}\text{C}$ ，30秒， $72^{\circ}\text{C}$ ，1分を10サイクル； $72^{\circ}\text{C}$ ，4分を1サイクル， $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。

DGGEはDCode<sup>TM</sup> Universal Mutation Detection System（Bio-Rad，Hercules, CA, USA）のプロトコルに従って行った。8%ポリアクリルアミド，変成剤濃度勾配が20–60%のグラジエントゲルをグラジエントメーカー（Model 475 Gradient Delivery System, Bio-Rad）を用いて作製した。変性剤として7M尿素を用い，40%ホルムアミドを100%変性剤とした時の20–60%変性剤濃度勾配

とした。PCR産物 $5\mu\text{l}$ と70%グリセロール $2\mu\text{l}$ を混合した後，混合したサンプルとDGGE marker II（株式会社ニッポンジーン，東京）をゲルにアプライし， $130\text{V}$ ， $60^{\circ}\text{C}$ で5時間泳動を行った。泳動バッファーは $1\times\text{TAE}$ （ $40\text{mM}$  Tris-acetate， $1\text{mM}$  EDTA；pH 8.0）を用いた。泳動後，ゲルをSYBR Gold（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を用いて染色し，ルミノ・イメージアナライザー（LAS-4000，富士フイルム株式会社，東京）を用いてバンドを確認した。その際，バンドの光学強度はGel-Pro Analyzer（Version 3.1，日本ローバー株式会社，東京）を用いて解析した。

主要なDNAバンドをメスで切り取り，バンドからDNAを抽出するためにTE bufferに浸し， $4^{\circ}\text{C}$ で一晩置いた。ホモジナイズし，抽出したDNAをWizard SV Gel（Promega）and PCR Clean-UP System（Promega）を用いて精製した。その際，357F（5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'）と518Rを用いて再度PCRでDNAの増幅を行った。増幅した16S rRNA遺伝子をpGEM-T Easy Vector（Promega）を用いてプラスミドを形成し，*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ へ遺伝子導入した。16S rRNA遺伝子を含むプラスミドを精製し，BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）のマニュアルに従ってシーケンスした。その際に，M13FおよびM13Rのプライマー（Yanisch-Perron *et al.*, 1985）を用いた。得られた塩基配列を用いて，Basic Local Alignment Search Tool（BLAST）検索を行った。BLASTとは，遺伝子データベース扱う機関（DNA Data Bank of Japan；DDBJ，European Nucleotide Archive；ENA，The European Bioinformatics Institute；EBI，National Center for Biotechnology Information；NCBI）が所有するシーケンスデータベース上のデータと目的の塩基配列データを照合し，類似する配列を導き出すツールである。また，BLAST検索後のDNA塩基配列情報はDDBJのデータベースへ登録した。

### 4. 統計解析

結果は平均値±標準誤差で表した。市販統計パッケージSAS（SAS/STAT Version 6，SAS Institute, Cary, NC, USA）（SAS，1999）を用いて統計処理を行った。一元配置分散分析を用いて，プロポリスの効果を要因分析し，平均値の差の検定はStudentのt検定により解析した。

## 結果

プロポリス添加飼料を給餌したニワトリの盲腸内容物中に生息する細菌由来16S rRNA遺伝子のPCR-DGGEを図1に示した。番号は切り出したバンドを示す。切り出したバンドの光学強度を表1に示した。その結果，バンド番号④で対照区よりプロポリス添加区の光学強度が有意に高かった（ $P<0.05$ ）。

切り出したバンドの16S rRNA遺伝子塩基配列を，DDBJのBLAST検索を用いて分析した。配列の相同性が90–95%のものを科として同定し，96%以上のものを属として同定した。本研究では，*Paraprevotella*属（相同率96%），Bacteroidaceae科（相同率92%），*Bacteroides*属（相同率96%），Ruminococcaceae科（相同率95%），*Faecalibacterium*属（相同率96%），unclassified Bacteria（miscellaneous）（相同率93%），*Pseudoflavonifractor*属（相同率100%），*Acetanaerobacterium*属（相同率96%）が同定さ

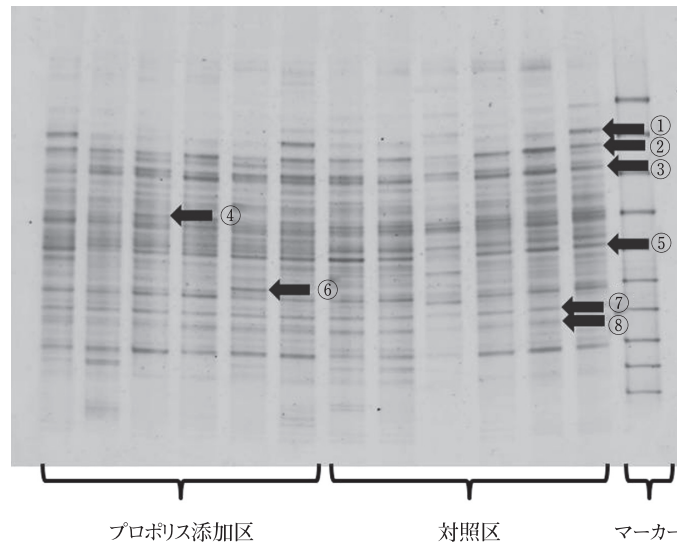


図 1. PCR-DGGE によるニワトリの盲腸内細菌 16S rDNA の増幅および分離。プロポリス残渣添加飼料を給与したニワトリおよび対照飼料を給与したニワトリから盲腸内容物を採取した。盲腸内容物中細菌から総 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を PCR-DGGE にて増幅・分離した。丸数字のバンドは切り出して DNA を増幅し、シーケンス後、菌種を同定した。

表 1. PCR-DGGE によって分離された DNA バンドの光学強度

No.	飼料中プロポリス濃度	
	0%	2%
①	15.0 ± 1.6	18.2 ± 3.0
②	20.5* ± 2.2	26.1 ± 2.1
③	37.5 ± 3.0	41.5* ± 3.5
④	33.9 <sup>a</sup> ± 4.0	23.2 <sup>b</sup> ± 1.5
⑤	26.5 ± 2.9	17.1 ± 5.8
⑥	25.6 ± 5.4	18.0 ± 3.2
⑦	13.6 ± 1.1	14.8 ± 0.7
⑧	17.6* ± 1.1	21.0 ± 1.3

図 1 において丸数字を付したバンドの光学強度をゲル画像定量解析ソフト (Gel-Pro) を用いて解析した。平均値 ± 標準誤差、n=9。<sup>a-b</sup>:  $p < 0.05$ 。\*1 つの欠損値。

れた (表 2)。表 2 から、有意差の認められたバンド④の細菌は Ruminococcaceae 科であった。以上から、飼料へプロポリスを給与することでニワトリ盲腸内 Ruminococcaceae 科が減少することが示された。

以下は解析した細菌の塩基配列を DDBJ の遺伝子データベースへ登録した際の Accession number および相同性が最も高かった細菌名である。AB850870 (uncultured *Acetanaerobacterium* sp.), AB850871 (uncultured *Pseudoflavonifractor* sp.), AB850872 (uncultured Bacteroidaceae bacterium), AB850873 (uncultured *Faecalibacterium* sp.), AB850874 (uncultured *Paraprevotella* sp.), AB850875 (uncultured Bacteroidaceae bacterium), AB850876 (uncultured *Faecalibacterium* sp.), AB850877 (uncultured Bacte-

表 2. BLAST 検索による細菌の同定

No.	菌名	分類	相同性 (%)
①	<i>Paraprevotella</i>	属	96
②	Bacteroidaceae	科	92
③	<i>Bacteroides</i>	属	96
④	Ruminococcaceae	科	95
⑤	<i>Faecalibacterium</i>	属	96
⑥	unclassified Bacteria	no rank	93
⑦	<i>Pseudoflavonifractor</i>	属	100
⑧	<i>Acetanaerobacterium</i>	属	96

切り出した DNA バンドに含まれる細菌の塩基配列を解析し、DDBJ の BLAST 検索によって菌種を同定した。相同性が 90 ~ 95% を科として、96% 以上を属として同定した。

roidaceae bacterium)。

## 考 察

本研究から、プロポリスを飼料へ給与することでニワトリの盲腸内細菌叢が変化し、特に Ruminococcaceae 科が減少することが示された。Ruminococcaceae 科はグラム陽性嫌気性球菌である (渡邊ら, 2010)。Grange *et al.* (1990) は、プロポリスのエタノール抽出物はグラム陽性菌に属する *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus cereus* およびグラム陰性菌に属する *Branhamella catarrhalis* の増殖を完全に抑制したと報告している。また、彼らはグラム陰性菌に属する *Pseudomonas aeruginosa* および *Esch-*



*erichia coli* の増殖をある程度阻害するが、*Klebsiella pneumoniae* に対しては効果が認められず、プロポリスはグラム陰性菌よりグラム陽性菌の増殖を優先的に抑制したことを明らかにしている。これらの報告は、グラム陽性菌である Ruminococcaceae 科が減少した本研究の効果と一致している。プロポリスには複数の抗菌物質が含まれていることが報告されており (Debuyse, 1983; Meresta and Meresta, 1985-1986; Dimov *et al.*, 1992; Metzner *et al.*, 1979), これらの抗菌物質の抗菌活性はストレプトマイシンやオキシテトラシクリンよりも低い、抗菌スペクトルが広いことが報告されており (照屋ら, 2006), 今後本研究で用いられたプロポリス残渣にも Ruminococcaceae 科以外の菌への抗菌性が見出される可能性もあると考えられた。

プロポリスは世界各地で採取されるが、土地や時期によって含有される物質の種類および構成成分が異なっている (Ghisalberti *et al.*, 1978; Bankova *et al.*, 1992)。プロポリスの成分は、ミツバチが集める植物の滲出液、ミツバチからの分泌物およびプロポリスの精製度合いの3つの要素によって決定される (Ghisalberti, 1979; Marcucci *et al.*, 1994)。ヨーロッパ産のプロポリスの原料植物はポプラであり、抗菌成分としてフラボノイドの一種であるアグリコンを含む。これに対してブラジル産のプロポリスはアレクリンが原料植物とされており、抗菌成分である桂皮酸誘導体やテルペノイドを含む。ヨーロッパ産とブラジル産のプロポリスでは、プロポリスの原料植物および成分が異なっているが、抗菌性を持つ点では共通である。海外同様に、国内においても地域によってプロポリスの成分が異なることが報告されている。例えば、沖縄産のプロポリスでは他の地域と比較して抗酸化作用およびポリフェノール含量が著しく高い。これは沖縄が亜熱帯に属し、他の地域と植生が異なることが原因だとされている (Hamasaka *et al.*, 2004)。本研究では岩手県八幡平産のプロポリス残渣をニワトリの飼料へ添加した。八幡平付近の植生はブナ林が多くを占めていることから (宮脇ら, 1978), ブナ由来の成分が抗菌作用を示した可能性が高い。ブナ科のクリ属やコナラ属植物では柔細胞が死ぬ間に水溶性化合物であるタンニンを合成し、タンニンも抗菌作用を示すことが知られている (Taguri *et al.*, 2004; 2006)。また、クリ属ではタンニンの一種である castalagin を多く含むことが報告されている (田中, 2008)。よって、本試験で使用したプロポリスにおいても水溶性成分であるタンニン等が多く含まれ、グラム陽性嫌気性球菌である Ruminococcaceae 科を減少させた可能性も考えられた。今後は八幡平産のプロポリス中の抗菌成分の特定を行い、ブナの抗菌成分と一致するか否か調査することが必要である。

## 謝 辞

本研究は独立行政法人科学技術振興機構 (JST) 復興促進プログラム (A-STEP) の援助を受けた。飼養試験に関しては肉の横沢株式会社およびブルーデンス農場の支援を受けた。DNA のシーケンスに関しては秋田県立大学生物資源科学部バイオテクノロジーセンターの協力を得た。上記の協りに深く感謝いたします。

## 引用文献

- Bankova V, Dyulgerov A, Popov S, Evstatieva L, Kuleva L, Pureb O and Zamjansan Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, 23: 79-85. 1992.
- Castanon JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86: 2466-2471. 2007.
- Debuyse E. La propolis. Docteur en Pharmacie Thesis, Université de Nantes, France, 82pp. 1983.
- Dimov V, Ivanovska N, Bankova V and Popov S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. *Vaccine*, 10: 817-823. 1992.
- Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World*, 60: 59-84. 1979.
- Ghisalberti EL, Jefferies PR, Lanteri R and Matisons J. Constituents of propolis. *Experientia*, 34: 157-158. 1978.
- Grange JM and Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83: 159-160. 1990.
- Hamasaka T, Kumazawa S, Fujimoto T and Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various area of Japan. *Food Science and Technology Research*, 10: 86-92. 2004.
- Kita K, Ito RK, Akamine C, Kawada W, Shimura Y and Inamoto T. Influence of propolis on the bacterial flora in the cecum of Nanbukashiwa. *Journal of Poultry Science*, in press.
- 照屋俊明・車 炳允・米沢貴之・永井和夫・禹 濟泰. プロポリスに含まれる生理活性物質と薬理活性. *生物機能開発研究所紀要*, 6: 1-19. 2006.
- Marcucci MC, Salatino MLF, Salatino A and Lopes CMA. Chemical and biological studies of Brazilian propolis. Proc IV Iberolatinamerican Meeting Apic, Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Recursos Renovables, Rio Cuarto, Argentina, 193-196. 1994.
- Meresta L and Meresta T. Antibacterial activity of flavonoid compounds of propolis, occurring in flora in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 28-29: 61-63. 1985-1986.
- Metzner J, Bekemeier H, Paintz M and Schneidewind E. On the antimicrobial activity of propolis and propolis constituents (author's transl). *Pharmazie*, 34: 97-102. 1979.
- 宮脇 昭・奥田重俊・原田 洋・佐々木寧・鈴木邦雄・藤原一絵. 八幡平 (十和田・八幡平国立公園南部) の森林植生. *植物生態論集*: 吉岡邦二博士追悼: 85-106. 1978.
- Muyzer G, de Waal EC and Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700. 1993.
- SAS Institute. SAS User's Guide: Statistics, 8th edition. Cary, NC, USA, 1999.
- Taguri T, Tanaka T and Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27: 1965-1969. 2004.
- Taguri T, Tanaka T and Kouno I. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl struc-

ture. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29 : 2226-2235. 2006  
田中 隆. 植物ポリフェノールに関する化学的研究とその紅茶色素生成機構解明への展開. YAKUGAKU ZASSHI, 128 : 1119-1131. 2008.  
渡邊邦友・後藤隆次・田中香お里. グラム陽性嫌気性球菌群～分

類命名の変化と病原因子・全ゲノム解析研究の動向～. モダンメディア, 56 : 320-328. 2010.  
Yanisch-Perron C, Vieira J and Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains : Nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33 : 1003-119. 1985.

## Influence of Dietary Propolis Residue on the Bacterial Flora in the Cecum of Barred Plymouth Rock

Ito R. Ken<sup>1</sup>, Chinami Akamine<sup>1</sup>, Wataru Kawada<sup>2</sup>, Yoichiro Shimura<sup>2</sup>,  
Tamio Inamoto<sup>2</sup> and Kazumi Kita<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550

<sup>2</sup> Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Shimoshinjo, Akita 010-0195

Recently, antibiotics is added into feeds of domestic animals and poultry for the growth promotion. The use of antibiotics for long term would give biosecurity threats because of arising antibiotic-resistant bacteria. Thereafter, various natural substrates having growth promoting effects have been attempted to use as feed additives instead of antibiotics. Propolis is collected by honeybees and known to have antibacterial effect. In the present study, therefore, the effect of propolis residue after ethanol extraction on cecal microflora of barred Plymouth Rock was examined. The diet containing 2% propolis residue was given to chickens for 10 days. Control birds were fed a diet without propolis residue. At the end of experiment, ceca were removed and the cecal content was collected. Total DNA was isolated from cecal content. The bacterial 16S rRNA gene was amplified and separated by PCR-DGGE. Optical density of DGGE bands was analyzed using a commercial gel image analyzer. One DGGE band in the propolis residue group was lower than that in the control group. The analyzed sequence revealed that the lowered band with low optical density was Family Ruminococcaceae. These results suggested that dietary propolis residue could suppress the growth of Family Ruminococcaceae, which is one of gram-positive anaerobic bacteria.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 51 : J1-J5, 2014)

**Key words** : propolis residue, bacterial flora, cecum, denaturing gradient gel electrophoresis, Barred Plymouth Rock