発酵リキッド飼料を給与した豚ふん便の 16s rDNA 配列を用いた菌叢解析

角川幸治・井尻 哲*・中野公隆**・山内慎也・土屋義信

広島県立総合技術研究所食品工業技術センター, 広島市南区比治山本町 12-70, 732-0816

* 食協株式会社, 広島市南区松川町 5-9, 732-0826

** 広島県立西条農業高等学校, 東広島市鏡山 3-16-1, 739-0046

(2006 年 6 月 13 日受付, 2006 年 11 月 30 日受理)

要 約 食品残さを原料にした発酵リキッド飼料を豚に給与することで, ふん便中の *Firmicutes* の存在比率が上昇した。試験区のみで存在比率が上昇した菌については, *Eu-bacterium tortuosum* の近縁種であることは分かったが, 相同性が 86% と低かったため菌名の特定は出来なかった。また, この菌叢変化が豚に与える影響については, 増体成績が良好であったこと, 下痢などの体調不良を起こさなかったことなどから, 少なくとも豚にとって害になるような菌叢変化ではないと考えられた。

一方, スターターとして添加した *Lactobacillus plantarum* A305 は, 胃酸耐性の不足から, 豚腸内への定着が不十分であることが分かった。このため, 試験区と対照区の間で, 期待したほどのプロバイオティック効果が出なかったものと考えられた。しかし, 菌叢の変化自体は起こっていたため, 乳酸菌の死菌体もしくは乳酸発酵時の代謝物の影響によって菌叢が変化したものと考えられた。

緒 言

動物の腸管には非常に多くの細菌が混在しているが, それらは宿主である動物と共生関係にあり, 宿主動物の健康と大きな関係がある。動物の健康は, 基本的には有用菌と有害菌のバランスの上に成り立っており, この腸内細菌のバランスを改善して宿主の健康に寄与する有用な生きた微生物

物は「プロバイオティックス」¹⁾と呼ばれる。その代表例は乳酸菌であり, 近年では, 人間向けの食品工業で用いられるだけでなく, 家畜用飼料にも広く用いられ始めている。

家畜の飼料に関しては, これまで生産性の向上を目的として様々な飼料添加物が用いられてきた。なかでも, 1940 年代に飼料中に微量の抗生物質を常時給餌すると, 家畜の発育促進と飼料要求

Investigation of Fecal Microbial Community Structure Using 16s rDNA Sequence in Pigs Fed Fermented Liquid Feed

K. KAKUGAWA, S. IJIRI*, K. NAKANO**, S. YAMAUCHI and Y. TSUCHIYA

Hiroshima Prefectural Technology Research Institute Food Technology Research Center, 3-10-32 Hijiyamahonmachi, Minami-ku, Hiroshima 732-0816, Japan

* Shokkyo Co., Ltd, 5-9 Matsukawa-chou, Minami-ku, Hiroshima 732-0826, Japan

** Hiroshima Prefectural SAIJO Agricultural High School, 3-16-1 Kagamiyama, Higashi-hiroshima 739-0046, Japan

連絡者: 角川幸治 (E-mail: k.kakugawa.db@it-hiroshima.ac.jp Tel. 082-921-6472)

(現住所: 広島工業大学情報学部健康情報学科, 広島県広島市佐伯区三宅 2-1-1, 731-5193)

率の改善が起こることが発見されて以来、家畜の飼料に抗生物質が添加されるようになってきた。しかし、抗生物質耐性菌の出現などが原因で、畜産先進国において抗生物質の飼料への添加が厳しく制限されるようになり、家畜の発育促進、飼料効率の改善、雑菌汚染の防止などの目的で、乳酸菌などのプロバイオティックスを飼料に添加しようという試みが各地で行われている¹⁻⁴⁾。

このような背景の中、筆者らのグループでは、澱粉資化性の乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* A305 を単離した。この乳酸菌は、胃酸耐性、胆汁酸耐性も有していた⁵⁾ ため、澱粉系の素材を含む食品残さの飼料化に相当であると考えられた。そこで、本菌を用いて広島県内の食品企業から発生する食品残さをを用いた発酵リキッド飼料を調製後、豚を用いた給与試験を実施し、乳酸発酵飼料を給与した豚群の成長が対照区よりも良好であるという結果を得ることが出来た⁶⁾。一般に、発酵リキッド飼料は乳酸菌によるプロバイオティック効果が期待できると報告⁷⁻⁹⁾ されている。間接的な効果としては、豚の肌つやが良くなる、増体が良くなるといった効果が得られ、直接的には、与えた乳酸菌や乳酸の効果により豚の腸内菌叢が変化していると報告^{1,10)} されている。豚の腸内菌叢については、1960 年代から盛んに研究されているが、その多くは培養法による微生物の検出¹¹⁻¹⁵⁾ である。一般に、自然界に存在している微生物のうち、99% 以上の微生物は培養できないと言われており、培養法を用いた微生物の検出だけでは、豚の腸内菌叢を正確に反映しているとは言い難い¹⁶⁾。そこで本研究では、PCR-DGGE 法など分子生物学的手法を用い、豚の腸内菌叢を調査することにした。

本研究では、前報⁶⁾ で報告した給与試験の際に採取した豚のふん便を用いて菌叢解析を行い、*Lactobacillus plantarum* A305 をスターターとし、食品残さを原料として調製した発酵リキッド飼料がプロバイオティックな効果を示したかどうか検証した。

材料および方法

1. ふん便の採取

前報⁶⁾ のとおり、発酵リキッド飼料の給与試験は広島県立西条農業高校において 2005 年 1 月 13 日から 2 月 2 日の 20 日間実施した。菌叢解析用のふん便は、試験開始日 (0 日)、6 日後、13 日後、試験終了日 (20 日後) の体重測定時に採取した。採取時は、豚舎の床にベニヤ板をひき、豚舎に敷き詰めてあるおが屑がふん便に付着しないようにした。また、試験に用いた豚には全て番号を付け、豚毎にふん便を区別して採取した。体重測定時に飼育担当者が監視を行い、豚が排便すると同時に無菌袋を裏返しにして、無菌部分がふんに触れるようにして採取した。袋を元に戻した後密封し、直ちに冷凍保存した。その後、試験を行うまで -20℃ で保管した。

なお、以後の実験は、特に示さない限り、対照区 5 頭の中で最も発育が良好であった No. 6 の豚のふん便と、試験区 6 頭の中で最も発育が良好であった No. 2 の豚のふん便をそれぞれ用いて行った。

2. 分子生物学的手法を用いた菌叢の解析

(1) DNA の抽出

凍結保存していたふん便を解凍し、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) を用い、説明書に従って DNA の抽出を行った。

(2) クローンライブラリー法¹⁷⁾

ふん便から抽出した DNA を鋳型とし、フォワードプライマーとして 341F (5'-CCTACGG-GAGGCAGCAG-3')、リバープライマーとして 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT-3') を用いて 16s rDNA の V3 領域を PCR で増幅した。なお、本研究における PCR 反応は、全てタカラサーマルサイクラー TP3000 (宝酒造) を用いた。反応液の組成は、TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を 0.25 μ l、PCR で増幅した鋳型 DNA を 1 μ l、フォワードプライマー、リバープライマーを 25 pmol ずつ、10 $\times$ ExTaq Buffer を 5 μ l、dNTP Mixture を 4 μ l、BSA を終濃度 1 μ g/ μ l になるように加え、最後に滅菌水で 50 μ l とした。PCR 反応は次のような条件で行った。まず、第 1 ステッ

プとして 94℃, 2 分インキュベートした。第 2 ステップは, 変性反応として 94℃, 30 秒, アニーリング反応として 57℃, 30 秒, 伸長反応として 72℃, 1 分インキュベートするという反応を 30 サイクル繰り返した。第 3 ステップは, 72℃, 3 分インキュベートした。PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) で精製し, pGEM-T Easy Vector System II (Promega) を用いて TA クローニングと大腸菌への形質転換を行った。反応はすべて説明書に従って行った。任意に選出した形質転換体 30 個を用いて, 上記と同様の反応でコロニー PCR を行った。PCR 産物を, 再度 QIAquick PCR Purification Kit で精製し, 精製済みの PCR 産物 3 μ l を 1 U の HaeIII (東洋紡) および RsaI (東洋紡) で 37℃, 1 時間個別に処理した後, その一部を 1.5% アガロースゲル電気泳動にかけた。1 時間の泳動の後, ゲルをエチジウムブロマイド (関東化学) で染色し, Molecular Imager FX (Bio-Rad) で DNA の検出を行い, Quantity One (Bio-Rad) を用いて制限酵素パターンの解析を行った。その結果を基に, 形質転換体のグルーピングを行った。

(3) PCR-DGGE 法

ふん便から抽出した DNA 又はクローンライブラリーで使用した DNA を鋳型とし, フォワードプライマーとして GC-341F (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCCGCCGCCCGCCCGCCCTACGGGAGGCAGCAG-3'), リバースプライマーとして 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTT-AGTTT-3') を用いて 16s rDNA の V3 領域をタッチダウン PCR 法により増幅した¹⁸⁾。タッチダウン PCR は次のとおり行った。まず, 第 1 ステップとして 94℃, 5 分インキュベートした。第 2 ステップは, 最初に, 変性反応として 94℃, 1 分, アニーリング反応として 64℃, 1 分, 伸長反応として 72℃, 3 分インキュベートするという反応を 2 回繰り返し, 以後, アニーリング温度を 2 サイクル毎に 1℃ ずつ下げ, 最終的にアニーリング温度が 55℃ になるまで反応を繰り返した。第 3 ステップは, 変性反応として 94℃, 1 分, アニーリング反応として 55℃, 1 分, 伸長反応として 72℃ 10 分反応を行った。反応液の組成は,

TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を 0.25 μ l, 鋳型 DNA を 1 μ l, フォワードプライマー, リバースプライマーを 25 pmol ずつ, 10×ExTaq Buffer を 5 μ l, dNTP Mixture を 4 μ l, BSA を終濃度 1 μ g/ μ l になるように加え, 最後に滅菌水で 50 μ l とした。PCR 産物は, D-Code システム (Bio-Rad) を用いて変成剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) で分析した¹⁹⁾。泳動は, 装置のマニュアルに従って行った。泳動後のゲルは, SYBR Green I (Molecular Probe) で染色し, Molecular Imager FX (Bio-Rad) で DNA バンドの検出を行った。

(4) 塩基配列の決定

PCR-DGGE 法およびクローンライブラリー法にて, 乳酸発酵飼料を給与したことによって存在比率が変化したと予想されたバンドについて, 塩基配列の決定を行った。シーケンス反応には, BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いた。塩基配列の決定は ABI PRISM 310 システム (Applied Biosystems) を用いて行い, 得られた塩基配列は国立遺伝学研究所 日本 DNA データバンクの Web ページで公開されている BLAST 検索²⁰⁾ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>) により, 相同性の検索を行った。次に, 分離菌株と近縁基準株との分子系統樹は ClustalW²¹⁾ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>) を用いて, 近隣結合法 (NJ 法)²²⁾ によるアライメント解析を行い, NJPLOT²³⁾ を用いて作成した。

実験結果および考察

1. クローンライブラリー法を用いた菌叢解析

緒言に記したとおり, 豚のふん便内の菌叢を難培養微生物も含めて明確にするため, 分子生物学的な手法を用いて解析を行った。まず, クローンライブラリー法を用いて給与試験開始日 (0 日) と給与試験終了日 (20 日後) の真正細菌の存在比率の推定を行うことにした。まず, 取得した 16s rDNA 遺伝子クローンについて, RFLP 解析を行った。その結果, 取得したクローンは 39 グループ (Fig1~Fig39) に分類することができた (図 1)。この 39 グループの各クローンの塩基配列を決定し, Blast 検索によって相同性の解析を行っ

図 1. ふん便から回収した DNA の RFLP 解析

Fig. 1. RFLP analysis using DNA extracted from Pig's feces

た。その結果を表 1 に記すが、検出された菌のほとんどが、難培養微生物のクローンとして登録されている未知の微生物の 16S rDNA と高い相同性を示し、取得したクローンの属、種を明確に確定することは出来なかった。

そこで、次に、Blast 検索の結果を基に、分子系統樹の作成を行った。分子系統樹は、試験に用いた 16s rDNA の塩基配列の多重整列を行い、各塩基配列間の進化距離を求め、その結果を図示したものであり、進化的に近縁な種は系統樹を描画すると近くに配置される。よって、系統樹の作成を行うことにより、未知な微生物であってもどのような微生物が近縁に属しているか推定することが出来る。その結果を図 2~4 に示す。図に示したとおり、Pig1 から Pig39 までの全てのグループが、*Bacteroides*, *Spirochaetes* および *Firmicutes* に属していた。門レベルでの存在比率の比較を図 5 に示す。LESER らは、消化管内の真正細菌の比率を調査しているが、それによると *Firmicutes* が 81%, *Bacteroides* が 11.2%²⁴⁾ ということであり、本研究の結果では *Firmicutes* の比率が若干低いものの、ふん便中の菌叢も、消化管内の菌叢と比較的似た値を示すものと考えられた。図 5 に示し

たとおり、本研究に用いた豚のふん便中には、対照区の 0 日目で 63.3%, 試験区の 0 日目で 66.7% の *Firmicutes* に属する細菌が存在していた。20 日間の試験終了後、対照区の方は門レベルの細菌の存在比率はほとんど変わらないものの、試験区の方は、*Firmicutes* の存在比率が 83.3% と大幅に上昇していた。図 2 を見ると、対照区に比べて試験区での存在比率が大きく上昇しているのは Pig26 および Pig27 であった。Pig26, 27 は、図 4 に示す *Firmicutes* の系統樹の中で同じクラスターに位置している。しかし、既知の菌の中で、最も相同性の高い菌は腸内常在菌である *Eubacterium tortuosum* であったが、相同性が 86% と非常に低く、現時点では、菌名を決定することは出来なかった。

2. PCR-DGGE 法を用いた菌叢解析

クローンライブラリー法は、定量性に優れるものの、微生物菌叢全体を把握するには非常に大量のクローンを解析しなければならない。一方、PCR-DGGE 法は、定量性はクローンライブラリー法に劣るものの、菌叢の変化を容易に観察することが出来る。よって、次の実験として、対照区および試験区の 0 日目、6 日目、13 日目、20 日

表 1. 豚ふん便から回収された真正細菌 16s rDNA 遺伝子の Blast 検索結果

Table 1. Result of Blast search using 16s rDNA gene of eubacteria extracted from pig's feces

リボタイプ ^a	菌名	アクセッション番号 ^b	相同性 (%) ^c
Pig 1	Uncultured bacterium	AY239410	93
Pig 2	Uncultured bacterium	AF371910	94
Pig 3	Uncultured bacterium	AY991608	95
Pig 4	Uncultured bacterium	AF371917	96
Pig 5	Uncultured bacterium	DQ263706	87
Pig 6	Uncultured rumen bacterium	AB185739	94
Pig 7	Uncultured bacterium	AF371883	99
Pig 8	Uncultured bacterium	AF371886	94
Pig 9	Uncultured bacterium	AF371875	100
Pig 10	Uncultured bacterium	AF371874	97
Pig 11	Uncultured bacterium	AF371874	98
Pig 12	Uncultured bacterium	AF371874	99
Pig 13	Uncultured bacterium	AY212764	98
Pig 14	Uncultured bacterium	AY212758	92
Pig 15	Uncultured bacterium	AY212749	96
Pig 16	<i>Spirochaetaceae species</i>	X89052	90
Pig 17	<i>Treponema zioleckli</i>	DQ065758	94
Pig 18	Uncultured bacterium	AY920194	98
Pig 19	Uncultured rumen bacterium	AB185579	91
Pig 20	Uncultured bacterium	AY985031	96
Pig 21	Uncultured rumen bacterium	AB185652	95
Pig 22	Uncultured rumen bacterium	AB185652	96
Pig 23	Uncultured bacterium	AF371940	100
Pig 24	Uncultured rumen bacterium	AB034082	93
Pig 25	<i>Streptococcus parauberis</i>	AF284579	98
Pig 26	Uncultured bacterium	AY985758	99
Pig 27	Uncultured bacterium	AF371530	96
Pig 28	Uncultured bacterium	AY920082	96
Pig 29	Uncultured bacterium	AJ852378	95
Pig 30	Uncultured bacterium	AF371751	97
Pig 31	Uncultured bacterium	DQO15283	97
Pig 32	Uncultured bacterium	AF371614	97
Pig 33	Uncultured bacterium	AY984380	97
Pig 34	Uncultured bacterium	AY985233	99
Pig 35	Uncultured bacterium	AY986378	98
Pig 36	Uncultured bacterium	AY920149	94
Pig 37	Uncultured bacterium	AY986336	98
Pig 38	Uncultured bacterium	AF371803	94
Pig 39	Uncultured bacterium	AY986372	99

^aRFLP 解析によってグループ分けした rDNA タイプ.^bDNA 塩基配列の GenBank 登録番号.^cBlast 検索によって決定された供試 DNA 塩基配列と GenBank 登録 DNA 塩基配列との相同性

タッチダウンPCR法によって増幅しているため、バンドの濃度はある程度の定量性を有していると考えられる。PCR-DGGE法の結果と、クローンライブラリー法の結果を比較すると、その結果は合致しており、(1) *Firmicutes* に属し *E. tortuosum* の近縁種であると考えられる Pig26

は、発酵リキッド飼料を給与した豚のみ大きく増え、(2) *Bacteroides* に属し、*P. oris* の近縁種であると考えられる Pig9 は、発酵リキッド飼料を給与した豚のみ減少していた。なお、*Eubacterium* 属、*Prevotella* 属とも腸内常在菌であるためこの

図 4. 16s rDNA 配列に基づいた *Firmicutes* の系統樹

Fig. 4. Phylogenetic tree of *Firmicutes* based on 16s rDNA sequencing

図 6. 糞便から回収した DNA の PCR-DGGE 法による解析

Fig. 6. PCR-DGGE analysis using DNA extracted from Pig's feces

図 5. クローンライブラリー法による菌叢変化

Fig. 5. Microbial community structure analyzed by clone library method

菌叢変化が豚の健康にとって良いことなのか悪いことなのか本データだけでは判定が出来ない。本研究では、これまで報告^{1,7-10)}されているようなプロバイオティックな効果は確認できなかったが、逆に、下痢などの体調不良の症状も示さなかったため、少なくともこの菌叢変化は豚にとって害を与える様な変化では無いことが示唆された。

ところで、前項にも示したとおり、今回の給与試験のふん便から抽出した DNA を用いたクローンライブラリー法では、スターターとして用いた *Lactobacillus plantarum* A305 の存在は確認できなかった。そこで、*L. plantarum* 専用プライマーを用い、今回の給与試験のふん便から抽出した DNA と 2004 年 11 月 4 日から 11 月 24 日の 20 日間、発酵リキッド飼料の調製方法や嗜好性を検討する目的で予備試験を行った際に採取したふん便から抽出した DNA をそれぞれテンプレートに用いて PCR-DGGE 法による検出を試みた。その結果、電気泳動像は示さないが、給与試験のふん便を検体に用いた場合は *L. plantarum* のバンドを明確に確認できなかったが、予備試験のふん便を検体に用いた場合は *L. plantarum* のバンドを明確に検出することが出来た。このことから、*L. plantarum* A305 の腸内定着性能は不十分であり、予備試験の時にはかろうじて腸内定着が出来たが、給与試験の時には、ほとんど腸内定着が出来なかったものと考えられた。今回の研究では、澱粉資化能を菌株選抜の第 1 条件としたため、*L. plantarum* A305 に胃酸耐性、胆汁耐性がある⁵⁾ことは確認していたものの、腸内定着性という点に着目すると胃酸耐性が不十分だったのではないかと考えられた。

上記したとおり、乳酸発酵飼料を給与した場合、6 日後から豚ふん便内の菌叢は変化することが確認できた。特徴的な変化は、腸内常在菌である *E. tortuosum* の近縁種である Pig26 の増加および同じく腸内常在菌である *Prevotella oris* の近縁種である Pig9 の減少であった。また、スターターとして用いた *L. plantarum* A305 の腸内への定着は不安定であることが示唆された。しかしながら、死菌体であってもプロバイオティックな効果を持つことがあるという報告²⁵⁾がある事

を考慮すると、本研究の場合も、*L. plantarum* A305 の死菌体もしくは乳酸など乳酸発酵時の代謝産物により、わずかながら菌叢変化が誘導されたのではないかと考えられる。

一方、前報⁹⁾の結果を併せて考察すると、飼料の栄養設計を正しく行えば、豚の増体自体は良好に行うことが出来るものの、明確なプロバイオティックな効果は確認できておらず、本研究だけでは増体成績そのものに乳酸菌添加の効果がどの程度あるのか判断が出来ない。また、対照として用いている乾燥飼料と食品残さの成分の違いが影響を与えている可能性も否定できない。そのため、菌叢変化以外に豚の肉質などの評価を行って比較しなければ、*L. plantarum* A305 を用いた発酵リキッド飼料のプロバイオティックな効果の検証は出来ないと思われる。本研究で飼育した豚は、市場への出荷を前提としていたため研究期間中に豚の解剖等を行うことが出来ず、同様の理由で消化管内の菌叢を直接調査することも不可能であった。これらの点については今後の検討課題である。

以上の結果から、*L. plantarum* A305 を用いて発酵リキッド飼料を製造し、事業化を目指すためには、*L. plantarum* A305 の胃酸耐性の強化を行うとともに、乳酸菌発酵における代謝物の影響や死菌、生菌のプロバイオティック効果の違い、原料の影響、肉質の調査などについて更に検証していくことが重要であると考ええる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、豚の飼育およびふん便の採取をして頂きました広島県立西条農業高等学校実験農場 久保秋人教諭、ならびに同校畜産科 2 年養豚プロジェクトの皆様（当時）に感謝いたします。また、研究全体に渡ってご指導を頂きました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所機能性飼料研究チーム 川島知之チーム長に感謝申し上げます。

なお、本研究の一部は、平成 16 年度ひろしま産業創生研究補助事業（リサイクル枠）により実施しました。

引用文献

- 1) 蔡 義民, プロバイオティック乳酸菌を利用した飼料調製加工技術, 畜産の研究, **59**, 241-246, 2005.
- 2) 伊藤喜久治: 「家畜・家禽用プロバイオティクス」, 167-177, エヌ・ティー・エス, 東京, 2005.
- 3) 蔡 義民・増田信義・藤田泰仁・河本英憲・安藤 貞: 茶飲料残渣の飼料調整・貯蔵技術の開発, 日本畜産学会報, **72**, 536-541, 2001.
- 4) 蔡 義民・藤田泰仁・村井 勝・小川増弘・吉田宣夫・北村 亨・三浦俊治: 飼料イネサイレージ調製への乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* 畜草 1 号) の利用, 日本草地学会誌, **49**, 477-485, 2003.
- 5) 山内慎也・角川幸治・松本英之・土屋義信・井尻 哲: 食品残さの発酵リキッド飼料化に用いる乳酸菌の特性評価, 日本養豚学会誌, **44**, 51-58, 2007.
- 6) 井尻 哲・中山亜紀・中野公隆・山内慎也・角川幸治・土屋義信: 食品製造副産物を主原料とした肥育豚用発酵リキッド飼料の調製と給与成績, 日本養豚学会誌, **44**, 31-39, 2007.
- 7) CAI, Y.: Identification and Characterization of Enterococcus Species Isolated from Forage Crops and Their Influence on Silage Fermentation, J. Dairy Sci., **82**, 2466-2471, 1999.
- 8) CAI, Y., S. KUMAI, M. OGAWA, Y. BENNO and T. NAKASE: Characterization and identification of Pediococcus species isolated from forage crops and their application for silage preparation, Appl. Environ. Microbiol., **65**, 2901-2906, 1999.
- 9) 蔡 義民: サイレージ乳酸菌の役割と高品質化の調製. 日本草地学会誌, **47**, 527-533, 2001.
- 10) ENNAHAR, S., Y. CAI, Y. FUJITA: Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis, Appl. Environ. Microbiol., **69**, 444-451, 2003.
- 11) SMITH, H.W., W.E. CRABB: The faecal bacterial flora of animals and man: its development in the young, J. Pathol. Bacteriol., **82**, 53-66, 1961.
- 12) ALLISON, M.J., I.M. ROBINSON, J.A. BUCKLIN and G.D. BOOTH: Comparison of Bacterial Populations of the Pig Cecum and Colon Based upon Enumeration with Specific Energy Sources, Appl. Environ. Microbiology, **37**, 1142-1151, 1979.
- 13) MOORE, W.E., L.V. MOORE, E.P. CATO, T.D. WILKINS and E.T. KORNEGAY: Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine, Appl. Environ. Microbiol., **53**, 1638-1644, 1987.
- 14) ROBINSON, I.M., S.C. WHIPP, J.A. BUCKLIN and M.J. ALLISON: Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs, Appl. Environ. Microbiol., **48**, 964-969, 1984.
- 15) RUSSEL, E.G.: Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs, Appl. Environ. Microbiol., **37**, 187-193, 1979.
- 16) AMANN, R.I., W. LUDWIG and K.H. SCHLEIFER: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, Microbiol. Rev., **59**, 143-169, 1995.
- 17) WILSON, K.H. and R.B. BLITCHINGTON: Human Colonic Biota Studied by Ribosomal DNA Sequence Analysis, Appl. Environ. Microbiol., **62**, 2273-2278, 1996.
- 18) DON, R.H., COX, P.T., WAINWRIGHT, B.J., BAKER, K., MATTICK, J.S.: 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification, Nucleic Acids Res., **19**, 4008, 1991.
- 19) 石井浩介・中川達功・福井 学: 微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用, 日本微生物生態学会誌, **15**, 59-73, 2000.
- 20) ALTSCHUL, S.F., T.F. MADDEN, T.F., SCHAFER, J. ZHANG, W. MILLER and D.J. LIPMAN: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res., **25**, 3389-3402, 1997.
- 21) THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS and T.J. GIBSON: CLUSTAL W: improving the sen-

- sitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acid Res.*, **22**, 4673-4680, 1994.
- 22) SAITOU, N. and M. NEI : The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425, 1987.
- 23) PERRIERE, G. and M. GOUY : WWW-Query : An on-line retrieval system for biological sequence banks, *Biochimie.*, **78**, 364-369, 1996.
- 24) LESER, T.D., J.Z. AMENUVOR, T.K. JENSEN, R.H. LINDECRONA and M. BOYE, K. MOLLER : Culture-Independent Analysis of Gut Bacteria : the Pig Gastrointestinal Tract Microbiota Revisited, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 673-690, 2002.
- 25) KIMOTO, H., S. OHMOMO and T. OKAMOTO : Cholesterol Removal from Media by Lactococci, *J Dairy Sci.*, **85**, 3182-3188, 2002.

Investigation of Fecal Microbial Community Structure Using 16s rDNA Sequence in Pigs Fed Fermented Liquid Feed

Koji KAKUGAWA, Satoru IJIRI*, Kimitaka NAKANO**,
Shinya YAMAUCHI and Yoshinobu TSUCHIYA

Hiroshima Prefectural Technology Research Institute Food Technology Research Center,
3-10-32 Hijiya-machonmachi, Minami-ku, Hiroshima 732-0816, Japan

* Shokkyo Co., Ltd, 5-9 Matsukawa-chou, Minami-ku, Hiroshima 732-0826, Japan

** Hiroshima Prefectural SAIJO Agricultural High School, 3-16-1 Kagamiyama,
Higashihiroshima 739-0046, Japan

A fecal microbial community structure in pigs fed fermented liquid feed was investigated. The phylogenetic diversity of the fecal microbial community in pigs was analyzed by the PCR-clone library study and PCR-DGGE analysis. The V3 region of 16s rDNA was amplified by PCR using total DNA extracted from pig feces as a template. A clone library comprising of 120 cloned 16s rDNA sequences was classified into 39 ribotypes by RFLP analysis, and all clones were found to belong to *Bacteroides*, *Spirochaetes*, and *Firmicutes*. The abundance ratio of *Firmicutes* increased greatly from 66.7% to 83.3% for a pig fed fermented liquid feed. From the results of PCR-DGGE, Pig26 clone that belongs to *Firmicutes* showed a marked increase. Because the homology between 16s rDNA of a known bacterium and Pig26 clone was low (<86%) as analyzed by Blast, we could not identify the Pig26 clone. Therefore, it was impossible to presume a feeding effect of fermented liquid feed based on a dominant organism name. On the other hand, the gastric acid resistance of *Lactobacillus plantarum* A305 used as a starter was insufficient. Therefore, *Lactobacillus plantarum* A305 was hardly able to grow in the digestive organ. Taken all together, the change in a pig's microbial community due to *Lactobacillus plantarum* A305 was slight and that change did not influence the pig's health.

Jpn. J. Swine Science, **44**, 2 : 40-50

Key words : *Lactobacillus plantarum* A305, PCR-DGGE, microbial community structure, pig, feces