

ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) の腸内細菌とその薬剤耐性状況

木嶋祥子¹⁾・中馬猛久^{1)†}・大塚美加²⁾・佐々木恭子²⁾・岡本嘉六¹⁾

(¹⁾鹿児島大学農学部, (²⁾いおワールドかごしま水族館)

平成23年10月7日 受理

要 約

鯨類の腸内保有細菌は環境のモニタリング評価に有用と期待されるが、それらの分離報告は少ない。かごしま水族館のハンドウイルカは錦江湾とつながった屋外水路での展示を通し、湾内の細菌を摂取していると考えられ、外部環境の影響を受けている可能性がある。そこで、直腸便から菌を分離同定し、*E. coli*と*Vibrio*科細菌について、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による遺伝子解析、薬剤感受性試験を実施し、薬剤耐性遺伝子の検索を行い錦江湾の影響を調査した。2008年11月から2009年3月に得た14検体のうち、*E. coli*、*Vibrio*科細菌は、各々9(64.3%)、6(42.9%)検体から分離され、非病原性常在菌と考えられた。PFGE解析の結果、*E. coli*は6クラスターに分類され、各個体に固有の株の定着が確認された。一方*Vibrio*科細菌では大きく5クラスターに分類され、複数個体で同じクラスターの株を共有しており、摂取後、腸管内を通過していくと考えられた。MIC測定の結果、*Vibrio*科細菌全34株はオキシテトラサイクリン(OTC)、オフロキサシン(OFLX)に感受性だった。*E. coli*は投薬歴がないOTCに7/45株(15.6%)が耐性で、*tetA*遺伝子のみを保有し、すべて水路に出る個体由来だったが、投薬歴があるOFLXには25/34株(73.5%)が耐性で、水路展示の有無とは無関係であり、水族館外部からOTC耐性株が獲得されていると推測できる。

キーワード：イルカ、大腸菌、ビブリオ、薬剤耐性

序 論

ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) は水族館等での飼育数が最も多い鯨類である。しかしその保有細菌についての情報は、野生ハンドウイルカの保有細菌に関する研究[1]やストランディングまたは混獲された鯨類由来細菌の報告[2]、飼育鯨類の感染症に関する調査報告[3]など少数が存在するのみで、健康な状態での腸内細菌叢に関する知見は得られていない。さらに、これらの研究では主に肛門周辺のスワブを検体としており[1, 2]、糞便そのものを調査した研究はより少ない。

また、海洋は、人獣医療に伴い陸上で、養殖業に伴い海上で使用された抗菌物質や、使用に伴って発生、選択された抗菌物質耐性細菌の終着点である。

近年海洋環境中に多くの耐性細菌が存在していることが明らかになってきており[4, 5, 6]、鯨類はこうした環境にさらされ、かつ食性、生態がヒトと部分的にはあるが共通するため、水や堆積物などの環境材料を調査するよりも感染症や耐性細菌の蔓延、汚染物質の蓄積といった潜在的な人へのリスクの評価に有効であると考えられている。かごしま水族館ではハンドウイルカをろ過、消毒等が行われた海水を用いた屋内の飼育プールだけでなく、月に数回、錦江湾と直接つながった水路で展示している。イルカがこの水路中の小魚や海藻を摂取する行動も見られているため、展示期間中に錦江湾に存在する様々な細菌を摂取していると考えられる。

そこで、良好な健康状態のハンドウイルカが腸管内に保有している正常細菌叢の構成細菌を明らかにす

†：連絡責任者：中馬猛久（獣医学科獣医公衆衛生学研究室）

Tel: 099-285-8734, E-mail: chuma@agri.kagoshima-u.ac.jp

¹⁾ 鹿児島大学農学部（〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24）

²⁾ いおワールドかごしま水族館（〒892-0814 鹿児島市本港新町3-1）

るために、糞便を採取し、分離、培養、同定を行った。特定菌種が腸管内に定着しているのか否かを確認するために分子生物学的解析を行い、抗菌物質耐性状況を調査することにより、錦江湾の影響を評価した。

材料と方法

1. 材料の採集

かごしま水族館で飼育されているハンドウイルカ7頭のうち、4頭は錦江湾と直接つながっている水路(全長275m, 約7000m²)での展示歴があり、他の3頭はない。イルカを仰臥位で肛門が常に水面に出ている状態に定位させ、アルコール綿により肛門周囲の消毒を行い、50mlのシリンジに接続した栄養カテーテルで直腸内の糞便を吸引して採取した。2008年11月から2009年3月は、表1に示すように、計14検体を得た。2009年4月から10月は、1か月に1回、原則として水路での展示歴がある4個体(R, N, M, K)から毎回採材した。

2. 細菌の分離

2008年11月から2009年3月までは、糞便中の構成細菌を調べるために腸内細菌科, *Vibrio*科, *Staphylococcus*属, *Erysipelothrix*属, その他の細菌の分離を目的とした。糞便をマッコンキー寒天培地, DHL寒天培地, マンニット食塩培地(以上, 栄研化学株式会社)ランバック寒天培地, TCBS寒天培地(日本製薬株式会社)に塗布し37℃で24時間好気培養した。5%ウマ脱線血寒天培地は37℃で24時間好気および嫌気培養した。発育したコロニーのうち、性状が異なるものを3株程度ずつ釣菌し、純培養した。

*Erysipelothrix*属菌の分離は、Fidalgoら[7]の方法

表1 ハンドウイルカ糞便検体(2008.11~2009.3)

個体	採材時期				採材回数
	'08.11	'08.12	'09.02	'09.03	
R	○ ¹⁾	-	○	-	2
N	- ²⁾	○	○	○	3
M	-	○	-	○	2
K	-	○	○	○	3
C	○	-	-	-	1
My	○	○	-	-	2
T	○	-	-	-	1
計					14

2008.11~2009.3のハンドウイルカ糞便検体の採材状況を示す。

¹⁾ 検体を得られたもの

²⁾ 検体を得られなかったもの

により、直腸便をトリプトソイブイオン培地(栄研化学株式会社)に0.3%のTris, 0.1%のTween80, 0.3%のアジ化ナトリウム, 5 μ g/mlのクリスタルバイオレットを添加した液体培地で37℃48時間培養後、5%馬脱線血寒天培地に塗布し、37℃48時間培養した。直径が約0.1mm, 凸状, 円形の透明コロニーを*Erysipelothrix*属と仮定した。

2009年4月~10月は、*E. coli*と*Vibrio*科細菌の分離のみを行った。

3. 飼育環境中の細菌数測定

飼育環境中の*E. coli*と*Vibrio*科細菌の密度を調べるために、餌(ホッケ・サバ・シシャモ)および、海からの取水直後、一時ろ過後、展示プール、水路、展示プールと水路の間の通路から海水を採取し、細菌数を計測した。餌は約25gに滅菌生理食塩水45mlを加えてストマッカー処理し、0.5mlを増菌培養後、マッコンキー寒天培地とTCBS寒天培地に画線塗布して培養した。5か所から採集した海水はADVANTEC 0.45 μ m(TOYO Roshi kaisha, LTD)で17~25mlをろ過し、前出の寒天培地に貼付し培養した。検出最大値は90CFU/10mlである。

4. 細菌の同定

純培養した菌株は、グラム染色, カタラーゼ試験, オキシダーゼ試験, OF試験, VP/MR試験, 耐塩性試験およびTSI, LIM, シモンズクエン酸寒天培地を用いた生化学的性状検査を用いて菌種の同定を行った。

*Erysipelothrix*属の同定にはPCR法[7]を用いた。

5. PFGE

*E. coli*は*Xba* I を使用したRibotらの方法[8], *Vibrio*科は*Not* I を使用したUrtazaらの方法[9]で行った。得られたバンドパターンをMEGA version4.0 softwareを用いてクラスター解析した。

6. PCR

表2に示す20pmol/ μ lのプライマーとTaqDNA polymerase (Takara), を用いて*Erysipelothrix*属の同定を行った。また、薬剤感受性試験の結果オキシテトラサイクリン(OTC, ナカライテスク株式会社)に耐性であった7株の*E. coli*について、表2に示す20pmol/ μ lのプライマーとEmerald Amp PCR polymerase (Takara)を用いてテトラサイクリン耐性遺伝子(*tetA, B, C, D, E, G, M*)の検索を行った。供試DNAはインスタジーンDNA精製マトリクス(Bio-rad Laboratories)を用いて抽出し、PCRサイクルはそれぞれ既報[10, 11, 12, 7]に一部修正を加えて行った。

表2 PCR反応に用いたプライマー

標的遺伝子	プライマーの配列	バンドサイズ (bp)	引用文献
<i>Erysiperothrix</i> 属 16SrRNA	MO101-AGA TGC CAT AGA AAC TGG TA	407	[19]
	MO102-CTG TAT CCG CCA TAA CTA		
<i>tetA</i>	F-GGC GGT CTT CTT CAT CAT GC	502	[10]
	R-CGG CAG GCA GAG CAA GTA GA		
<i>tetB</i>	F-CAT TAA TAG GCG CAT CGC TG	930	[10]
	R-TGA AGG TCA TCG ATA GCA GG		
<i>tetC</i>	F-AAC AAT GCG CTC ATC GT	1138	[11]
	R-GGA GGC AGA CAA GGT AT		
<i>tetD</i>	F-AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	787	[12]
	R-GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC		
<i>tetE</i>	F-AAA CCA CAT CCT CCA TAC GC	278	[12]
	R-AAA TAG GCC ACA ACC GTC AG		
<i>tetG</i>	F-GCT CGG TGG TAT CTC TGC TC	468	[12]
	R-AGC AAC AGA ATC GGG AAC AC		
<i>tetM</i>	F-GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG	406	[12]
	R-CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC		

表3 ハンドウイルカ糞便中の細菌の検出状況

菌種	陽性検体数 (n=14)	陽性個体数 (n=7)	株数	
腸内細菌科	<i>E. coli</i>	12 (85.7%)	7 (100%)	35
	<i>P. mirabilis</i>	2 (14.3%)	1 (14.3%)	8
	不明	2 (14.3%)	2 (28.6%)	2
<i>Vibrio</i> 科	<i>Vibrio</i> 属	5 (35.7%)	4 (57.1%)	8
	<i>Aeromonas</i> 属	2 (14.3%)	2 (28.6%)	2
<i>Staphylococcus</i> 属	0 (0%)	0 (0%)	0	
<i>Erysipelothrix</i> 属	0 (0%)	0 (0%)	0	
その他 (同定不能)	14 (100%)	7 (100%)	127	

7. 薬剤感受性試験

分離された全*E. coli*と*Vibrio*科細菌について、OTCとオフロキサシン (OFLX, SIGMA) のMIC値を、OTCおよびOFLXに耐性の*E. coli*について、アンピシリン (ABPC)、セファロチン (CET)、クロラムフェニコール (CP)、カナマイシン (KM) (以上SIGMA)、ホスホマイシン (FOM, 明治製菓株式会社) のMIC値を、CLSIに準拠した微量液体希釈法で測定した。

結 果

1. 糞便中の構成細菌

各細菌の検出状況を表3に示す。*E. coli*は7頭全頭から分離され、14検体中12検体(85.7%)から分離された。同様に*Vibrio*属菌は4頭、5検体(35.7%)か

ら、*P. mirabilis*と*Aeromonas*属菌は2頭、2検体(14.7%)から、各々検出された。*Staphylococcus*属菌および*Erysipelothrix*属菌はともに検出されなかった。その他、同定不能な菌株が全検体から合計127株分離された。

2. 分離株のクラスター分析

2008年11月から2009年10月にかけて分離した*E. coli* 45株、*Vibrio*科細菌34株について解析を行った。

Xba Iを用いて行った*E. coli*のPFGEのクラスター解析を基に作成した樹形図を図1aに示した。45株中43株で十分な解析が可能で、I-Va, Vbの6つのクラスターに大別された。2回以上*E. coli*が検出された個体は個体R, N, M, K, Myの5個体で、個体R, N, MではクラスターI、個体KではクラスターVb、個体MyではクラスターII、IIIに属する株が繰り返し分離された。また、各個体から分離され

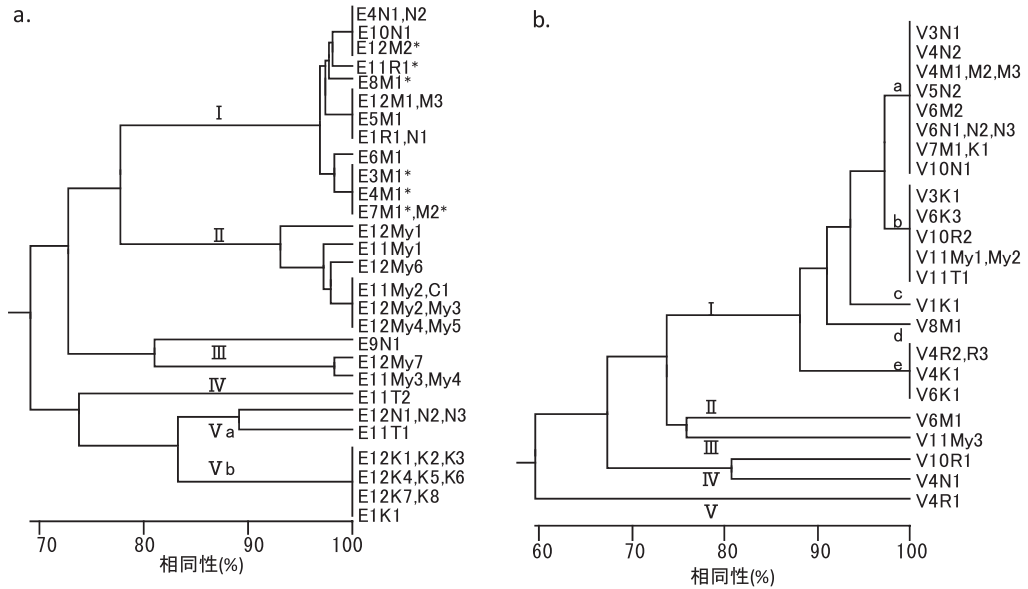


図1 PFGEに基づくクラスター解析

株名は左から菌種, 採取した時期, 由来個体, 通し番号を示す。例: E4N1=*E. coli*のうち4月に個体Nのサンプルから分離した1番目の株。

個体R/N/M/Kは水路展示歴があり, 個体C/My/Tはない。

a. *E. coli*の樹形図。Xba Iを用い, IからVa,bの6つのクラスターに大別された。クラスターI, IIはすべてOFLX耐性株。右肩に*がついている株はOTC耐性株。

b. *Vibrio*科の樹形図。Not Iを用い, IからVの5つのクラスターに大別された。クラスターIは相同性100%のものをまとめてサブクラスターa-eとした。

たクラスターの種類は1種類が4個体, 2種類が2個体, 3種類が1個体であった。OTC耐性株は全てクラスターIに属し, クラスターI, IIの株は全てOFLX耐性株だった。

Not Iを用いて行った*Vibrio*科細菌のPFGEのクラスター解析を基に作成した樹形図を図1bに示した。34株中30株で十分な解析が可能で, I-Vの5つのクラスターに大別された。クラスターIに25株が集中し, 相同性100%のものを集めてサブクラスターa-eとした。他のクラスターに属する株は1ないし2株であった。2回以上*Vibrio*科の細菌が分離された個体はR, N, M, Kの4個体であり, 個体N, MではクラスターIa, 個体KではクラスターIbが繰り返し分離されているが, 個体Rでは繰り返し分離されたクラスターはなかった。また, 各個体から分離されたクラスターの種類は, 1種類が1個体, 2種類が2個体, 3種類以上が3個体と, *E. coli*と比較して多かった。

3. 飼育環境中の細菌

各サンプルからの細菌の検出状況を表4に示す。ホッケ, サバ, シシャモの3種の餌料からは, *E.*

表4 飼育環境中の細菌数

試料	<i>E. coli</i>	<i>Vibrio</i> 科
ホッケ	—	—
餌料 ¹⁾ サバ	—	—
シシャモ	—	—
取水直後	0	0.4
一時ろ過後	0	5.2
海水 ²⁾ 展示プール	0.4	4.4
屋外水路	1.7	3.4
プール・水路間の通路	1.7	>90

¹⁾ 試料約0.2gあたりの陽性(+), 陰性(-)を示す

²⁾ 検出された菌数(CFU/10ml)を示す

*coli*も*Vibrio*科細菌も検出されなかった。取水直後の海水と一時ろ過後の海水からは*E. coli*は検出されなかったが, *Vibrio*科細菌はそれぞれ0.4, 5.2CFU/10ml検出された。通路からは*Vibrio*科細菌は検出最大値以上の細菌が検出された。

4. 糞便由来*E. coli*および*Vibrio*科細菌の薬剤耐性状況

*E. coli*45株のうちOTC, OFLXに対し, 各々7株(15.6%), 25株(55.6%)が耐性だった。またOTC耐

表5 *E. coli*, *Vibrio*科のMIC分布

菌種	薬剤	MIC (μ g/ml)												
		<0.25	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
<i>E. coli</i>	OTC				0	17	20	1	0	0	0	0	1	6
	OFLX	20	0	0	0	0	0	0	2	7	16	0		
<i>Vibrio</i> 科.	OTC		0	11	17	6	0							
	OFLX	34	0											

表6 OTCまたはOFLX耐性*E. coli*の薬剤耐性状況

薬剤	MIC (μ g/ml)											
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
ABPC						0	1	0	0	0	0	23
CET						0	16	13	0			
CP				0	1	7	12	5	0			
KM			0	6	4	9	6	0				
FOM				0	1	10	11	2	1	0		

性の7株はすべてOFLXにも耐性であった。一方 *Vibrio*科34株はOTC, OFLXに対し全株が感受性だった(表5)。OTCおよびOFLX耐性の*E. coli*25株のうち, ABPCに対し24株(96%)が耐性であったが, CET, KM, CP, FOMには全株が感受性だった(表6)。

5. 個体の水路展示歴と薬剤耐性*E. coli*の出現状況との関連

個体の水路展示歴と, 薬剤耐性*E. coli*の出現状況を表7に示した。45株中水路展示歴のある個体由来の株は31株, ない個体由来の株は14株であった。OTC耐性の7株は, すべて水路展示歴のある個体に由来していた。一方, OFLX耐性の25株は, 水路展示歴のある個体由来16株(51.6%), ない個体由来は9株(64.3%)と, 耐性株出現状況は個体の水路展示歴と関連していなかった。

6. テトラサイクリン耐性遺伝子の保有状況

PCR法で検索したテトラサイクリン耐性遺伝子(*tetA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *G*, *M*)のうち, OTC耐性*E. coli*7株は全株が*tetA*のみを保有しており, その他の遺伝子は保有していなかった。

考 察

本研究では, 14検体の糞便を培養した結果, *E. coli*は7個体全頭, 12検体(85.7%)から分離された。この割合は野生ハンドウイルカ245頭の肛門スワブを培養したBuckらが報告した*E. coli*の分離率(41.0%)[1]よりも高く, 糞便を直接培養することによ

て陸上哺乳類同様*E. coli*はハンドウイルカの腸管内に普遍的に存在することがより明らかとなった。PFGEによるクラスター解析の結果, 2回以上*E. coli*が分離されている5頭全頭で, 繰り返し分離されるクラスターが存在しており, また各個体から分離されるクラスターの種類は1種類であることが多かった(図1)。このことから, 個体ごとに特定の*E. coli*株が定着していることが示された。

一方*Vibrio*属は過半数を超える4個体, 5検体(35.7%)から分離されている。*Vibrio*科細菌のPFGEによるクラスター解析の結果, 大多数の株はクラスターIに分類された(図1)。このうち相同性が100%のものを集めてサブクラスターa-cとした。2回以上*Vibrio*科細菌が分離されている4個体のうち繰り返し分離されるクラスターが存在するのは3個体だけだった。また, 各個体から分離されるクラスターの種類が3種類以上である個体が50%を占め, 1個体が様々な株を保有していた。すなわち, *Vibrio*属の細菌は陸上哺乳類と異なり, ハンドウイルカの腸管内に一般的に存在していることが示唆されるが, *E. coli*のように腸管内に定着しているというよりは, 摂取し腸管内を通過していくものであると考えられた。

ブタ同様に鯨類に豚丹毒を起こす*Erysipelothrix*属細菌は検出されなかった。ブタでは保菌動物の糞便, 尿, 唾液などが感染源になるといわれている。今回実験に供した7頭のハンドウイルカのうち1頭には過去に豚丹毒の発症歴があるものの, 現在は保菌していないことが示された。

表7 個体の水路展示歴と薬剤耐性*E. coli*の出現状況

	水路展示歴		計 (n=45)
	あり (n=31)	なし (n=14)	
OTC耐性株	7 (22.6%)	0 (0%)	7 (15.6%)
OFLX耐性株	16 (51.6%)	9 (64.3%)	25 (55.6%)

その他の細菌の中には同定できない菌株が多かった。今回同定に用いた手法は主に腸内細菌科を中心とした一般的な病原細菌の同定に用いる生化学的性状検査であった。よって、糞便中の構成細菌を正確に解明するためには、生化学的性状検査だけでなくシーケンスなどの分子生物学的手法の導入も検討する必要がある。

*E. coli*全45株のうちOTC耐性株は7株(15.6%)、OFLX耐性株は25株(55.6%)であった(表5)。OTCはかごしま水族館においてイルカへの投薬歴がなく、OFLXは投薬歴がある。ハンドウイルカ7頭のうち頻繁に水路に出るのは4頭であり、残りの3頭はほとんど水路展示歴がない。OTC耐性株は水路展示歴のある個体からのみ検出され、OFLX耐性株は水路展示歴とは無関係に検出されていることから(表7)、OTC耐性株は水路展示を通して外界から獲得したものと推定できる。水路展示以外の細菌の侵入経路として、餌料や飼育水として用いる海水も考慮したが、表4のとおり、*E. coli*は展示プールや屋外の水路および両者をつなぐ通路からのみ検出されており、前述の推定を補強する結果となった。

OTCをはじめとするテトラサイクリン系薬への耐性をコードする38種の遺伝子のうち[13, 14] *Escherichia*属菌で主要な遺伝は*tet* (A, B, C, D, E, G, M)である。*tet*(A, B)は*E. coli*がもつテトラサイクリン耐性遺伝子として最も一般的であり、*tetA*は動物由来株、*tetB*はヒト由来株で多いとされている[15]。また、*tetB*は海産魚介類の養殖場由来の細菌からも多く検出されている[16, 4]。*tetC*は動物から検出されることは少ないものの、下水処理場の汚泥中の大腸菌群の91%が保有しているという報告がある[17]。*tetD*は、ヒトとブタ由来の*E. coli* [15]や、様々な動物由来の*E. coli* [18]で、耐性株のうち数%だけが保有することが示されている。*tetE*は非伝達性のプラスミドに存在していることが多く、*Vibrio*属、*Aeromonas*属といった海洋細菌では一般的である[14]。*tetG*は、様々な動物由来の*E. coli*を調べてもまったく検出されていない[18]。*tetM*は本来グラム陽性菌のテトラサイクリン耐性

遺伝子としてよく知られていたが、トランスポゾンに組み込まれてグラム陰性菌にも広がっていることが近年知られるようになった[14]。本実験で分離されたOTC耐性株はすべて*tetA*のみを保有しており、陸上の動物由来の耐性*E. coli*の侵入が示唆された。

OTCまたはOFLX耐性*E. coli*25株のうち、23株はABPCに耐性であったが、CET, CP, KM, FOMにはすべて感受性であり、臨床上問題になるような顕著な多剤耐性化は認められなかった。

*Vibrio*科細菌は全株がOTCにもOFLXにも感受性であった。水族館での投薬歴があるOFLXに対して*E. coli*と*Vibrio*科細菌で耐性株出現状況が異なる理由としては、1) *Vibrio*科細菌は*E. coli*と異なりイルカの腸管内に定着していないためにOFLX投与による耐性株の選択圧が影響しにくいこと、2) *E. coli*と異なり*Vibrio*科細菌では外界に存在するOFLX耐性菌の割合が低いことから、*E. coli*のOFLX株はもともと外界から取り込まれたものが投薬による選択圧でイルカ群内に広がったものであり、*Vibrio*科では外界から取り込む機会がなかったためにイルカ群内に広がることもなかった、という仮説がたてられるが、現時点では証明できない。

本研究により、健康なハンドウイルカの腸管内には陸上哺乳類と同様に*E. coli*が常在しており、各個体に固有の*E. coli*が定着していることが分かった。一方陸上哺乳類と異なり*Vibrio*属細菌が高率に保有されていることも明らかになったが、*E. coli*とは異なり摂取したあと腸管内を通過していくものであることが分かった。

また、水路展示によってイルカの腸内に保有されている細菌の薬剤耐性が影響を受けていることが示された。また、耐性株の由来として陸上の哺乳類が考えられた。しかし、全容解明のためには周辺で分離された耐性株との遺伝子型の比較等さらなる検討が必要である。

引用文献

- [1] Buck JD, Wells RS, Rhinehart HL, Hansen LJ. 2006. Aerobic microorganisms associated with free-ranging Bottlenose Dolphins in coastal gulf of Mexico and Atlantic ocean waters. *J. Wildl. Dis.* 42:536-544
- [2] Pereira CS, Amorim SD, Santos AFM, Siciliano S, Moreno IB, Ott PH, Rodrigues DP. 2008. *Pleciomonas shigelloides* and *Aeromonadaceae* Family Pathgens Isolated from Marine Mammals of Southern and Southeastern Brazilian Coast.

- Braz. J. Microbiol. 39:749-755
- [3] 江の島マリン. 2005. 鯨類の感染症について. 動水誌 46:6-20
- [4] Furushita M, Shiba T, Maeda T, Yahata M, Kaneoka A, Takahashi Y, Torii K, Hasegawa T, Ohta M. 2003. Similarity of Tetracycline Resistance Genes Isolated from Fish Farm Bacteria to Those from Clinical Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5336-5342
- [5] Fernando B, José-Luis M, Rafael C. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:260-265
- [6] Hargrave MT, Doucette LI, Haya K, Friars FS, Armstrong SM. 2008. A micro-dilution method for detecting oxytetracycline-resistant bacteria in marine sediments from salmon and mussel aquaculture sites and an urbanized harbour in Atlantic Canada. *Mar. Pollut. Bull.* 56:1439-1445
- [7] Fidalgo SG, Wang Q, Riley TV. 2000. Comparison of methods for detection of *Erysipelothrix* spp. and their distribution in some Australasian seafoods. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2066-2070
- [8] Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. 2006. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3:59-67
- [9] Martínez-Urtaza J, Lozano-Leon A, DePaola A, Ishibashi M, Shimada K, Nishibuchi M, Liebana E. 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolation from clinical source in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42:4672-4678
- [10] Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 91:73-84
- [11] Frech G, Schwarz S. 2000. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, D ublin, Choleraesuis, Hadar, and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. *J. Appl. Microbiol.* 89:633-641
- [12] Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes* 15:209-215
- [13] Roberts MC. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 245:195-203
- [14] Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:232-260
- [15] Schwaiger K, Hölzel C, Bauer J. 2010. Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Vet. Microbiol.* 142:329-336
- [16] Dang H, Zhang X, Song L, Chang Y, Yang G. 2006. Molecular characterizations of oxytetracycline resistant bacteria and their resistance genes from mariculture waters of China. *Mar. Pollut. Bull.* 52: 1494-1503
- [17] Zhang T, Zhang M, Zhang X, Fang HH. 2009. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting Enterobacteriaceae in activated sludge of sewage treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 43:3455-60
- [18] Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strain isolated from diverse human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2503-2507
- [19] Makino S, Okada Y, Maruyama T, Ishikawa K, Takahashi T, Nakamura M, Ezaki T, Morita H. 1994. Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animal by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:1526-1531

Antimicrobial resistance of enteric bacteria isolated from bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)

Shouko KIJIMA, Takehisa CHUMA, Mika OTSUKA, Kyoko SASAKI and Karoku OKAMOTO

Abstract

Bacteria inhabiting the intestines of cetaceans are expected to be invaluable for environmental estimation. Some of the bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) kept at Kagoshima Aquarium are not only housed in indoors but are also able to use an outside waterway in Kinko-wan Bay.

To determine the influence of the bay's environment, intestinal bacteria were isolated from the cetaceans. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of the isolates were also carried out. Nine (64.3%) and six (42.6%) rectum samples collected between November 2008 and March 2009 were positive for *Escherichia coli* and Vibrionaceae, respectively. The isolated bacteria were considered to be non-pathogenic. PFGE analysis classified the *E. coli* isolates into 6 clusters. Each dolphin was considered to have its own type of *E. coli*. Whereas the isolates of Vibrionaceae were classified into 5 clusters, and the same types of isolates were common in different dolphins, suggesting that these bacteria would pass through the dolphins' intestines. All 34 isolates of Vibrionaceae were sensitive to both oxytetracycline and ofloxacin. Seven *E. coli* isolates out of 45 carried the *tetA* gene and were resistant to OTC that had not been used for treatment. All resistant isolates were detected from the dolphins that sometimes used the outside waterway. Twenty-five of the 34 Vibrionaceae isolates were resistant to OFLX that had been used for treatment. There was no relation between the resistance to OFLX and whether the dolphins had been into the waterway. It may be inferred that OTC resistant bacteria isolates were acquired from outside the aquarium.