

海水养殖环境细菌耐药性的危害^{*}

党宏月¹ 宋林生¹ 张志南²

(¹中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(²中国海洋大学, 青岛 266003)

为解决人口、资源、环境等人类面临的重大问题, 海洋作为地球上尚未充分开发的重要疆域而备受重视。中国以海水养殖业为基础的“蓝色农业”在缓解人口增长对陆地农业的压力, 促进沿海地区经济的发展中正发挥着重要作用。然而, 近 10 年来, 世界范围内海水微生物流行性和暴发性病害相继发生, 严重制约了海水养殖业的健康发展(相建海, 2003)。为了防治细菌性病害, 大量的抗生素药类被应用于养殖过程的各个阶段, 巨大的选择压力导致了海水养殖水域耐药细菌的种类和数量的显著增加, 养殖生物耐药病原菌病害的发生也越来越频繁, 微生物病害防治的难度越来越大。更严重的问题是培养的水产养殖品往往携带耐药细菌, 通过食物链传递, 将对人类健康和生命安全直接构成威胁(Sornm et al., 2002)。一些海产生物病原菌本身也是人类病原菌, 如一些海洋弧菌(French et al., 1989; Wong et al., 2000), 这些水陆两栖人畜共患病原菌耐药性的获得及这种病害的发生和流行将会给人类带来灾难性的后果。另外, 由于大多耐药因子的可传播性, 海水养殖环境中正常菌群的耐药性同样是一个不可忽视的严峻问题(Sornm et al., 2002)。大多数抗性决定子(耐药基因)是在可移动和传递的遗传载体, 如质粒或接合转座子上, 可在不同菌株甚至是不同种属细菌间相互传递(Ferber, 1998; O'Brien, 2002)。再加上养殖水体的半封闭性(池养中的定期或不定期的换水)或全开放性(滩涂或近海的网箱或筏式养殖), 耐药细菌有可能被潮汐和海流带入近岸的非养殖区及海滨旅游区, 通过菌间遗传物质的传递, 耐药基因有可能被传入环境中的人体病原菌, 大大增加了人体耐药病原菌病害发生和流行的可能性及危害程度(Miranda et al., 2001; Thayanavan et al., 2003)。大量抗生素的使用还改变了养殖海域及临近自然海区细菌群落的结构及种类和功能多样性, 破坏了生态平衡和海洋正常的生命过程(Chejso et al., 2003)。养殖水域作为可能的抗药因子的孳生地、储藏库和扩散源(Miranda et al., 2002; Rhodes et al., 2000), 已引起了全球性的关注。世界上一些水产养殖国家相继开展了养殖水体耐药细菌的调查研究, 并有一些国家已对养殖中抗生素的种类、使

^{*} 国家自然科学基金(编号: 40476058 和 40576069)和中国科学院海洋研究所引进人才启动经费(编号: LSC 2-3-1)联合资助。

通讯作者: 党宏月, 副研究员, 从事海洋微生物分子生态学和生物海洋学研究, E-mail: hydang@ms.qd.p.ac.cn

收稿日期: 2005 年 9 月 1 日。

用方法、使用剂量、残存量及检测标准进行了行政化的规范和管理(李爱华, 2002)。目前我国对海水养殖水体细菌耐药危害的认识明显不足, 许多需要进行的研究尚未开展, 为更有效地防治耐药细菌病害, 避免耐药基因在海洋环境中的广泛传播扩散, 保护海洋生态环境及资源, 提高养殖产品卫生质量, 保护海滨旅游环境及人民群众身体健康, 在我国开展海水养殖环境耐药细菌及其抗性机理的调查研究已是刻不容缓, 这项工作的重点应在于查清耐药因子的源及其传播途径和动态, 并在此基础上寻找治理的科学办法, 以达到防患于未然的目的。20世纪滥采乱捕导致的近海渔业资源的严重衰竭是一个非常深刻的教训, 希望这种急功近利、涸泽而渔的状况不会再度在海产养殖业中出现。我们应该把海洋细菌耐药性的研究提升到直接关系到人类生存和发展的环境和资源问题的高度来对待, 避免海洋成为耐药因子孳生、繁衍、传播和扩散的潘多拉魔盒。

一、国际上对耐药细菌危害的认识

自从20世纪40年代青霉素等药物临床应用以来, 抗生素挽救了全球无以计数的生命, 为人类的生命安全和生活幸福做出了巨大贡献。可以说抗生素是20世纪最重要的医学发现之一(Berkehan et al., 1993)。除了临床上被用于人的细菌性感染预防和治疗外, 抗生素药物还被广泛应用于农牧渔业, 以防治细菌性病害和促进养殖动物和作物的生长。但是, 广泛大量抗生素的使用以及相当程度的滥用导致了抗生素抗性细菌种类和数量的急剧增加。自从1940年发现能水解青霉素的 β 内酰胺酶以来(Abraham et al., 1940), 已在革兰氏阳性和阴性细菌中发现了几百种不同的耐药基因(O'Brien, 1997)。由于细菌具有较高的自发突变率、短的世代时间和快速获得外源遗传物质的能力, 以及一些抗生素具有细菌性信息素(sex pheromones)的作用, 可诱导结合、转座和转化等细菌间遗传物质传递的发生(Courvalin et al., 2001), 因此细菌耐药性产生、获得和传播的速度非常快。每种新抗生素药物在投入使用后不久就会有相应的耐药细菌接踵出现(Barbosa et al., 2000; Davies, 1994)。耐药细菌大大缩短了抗生素药物的有效使用寿命, 尤其是近十几年来, 耐药病原菌的增加导致了全球性感染疾病发病率和病死率的显著增加(Shlaes et al., 1997)。据估计, 美国用于治疗耐药细菌感染的费用每年就高达几十亿美元(US Congress, Office of Technology Assessment, 1995)。耐药细菌已构成了对人类生存和持续发展的严重威胁(Neu, 1992; Wise et al., 1998)。1972年, 墨西哥有1万多人被抗氯霉素的伤寒杆菌感染, 导致了1400多人死亡。人类现在面临的所谓“抗生素危机”其本质是“抗生素耐药危机”(Murray, 1999), 有识之士已在担忧人类会不会最终因抗生素的穷尽而走向灭亡。许多国家已开展了细菌耐药性的广泛深入研究及耐药细菌及其污染动态的密切监测。目前发现大量使用及滥用抗生素的养殖业是耐药细菌产生和扩散的一个重要滋生地。耐药细菌污染源的危害性日益受到人们的普遍重视, 世界卫生组织(WHO)曾多次召开国际会议以研讨和规划抗生素药物在食品动物养殖中的合理应用。许多国家也频频出台一些政府管理政策以限制和规范抗生素药类在养殖业中的应用(徐士新, 2001)。由细菌耐药性引起的人类严峻生存危机使得细菌耐药性研究成为当今国际细菌学和医学的一个热点, 耐药病原菌全球性监测和预警已在许多国家开展起来。

二、海水养殖水域作为潜在耐药细菌和抗性因子的污染源

环境微生物学和分子遗传学研究表明，在海洋环境中存在着三个层次的抗生素耐药性污染源和传播载体：环境中的耐药细菌库、耐药质粒和噬菌体库以及耐药基因库。其中每一污染源和传播载体的扩散都是以指数形式实现的，这是因为这些扩散过程要以DNA的复制为基础，以细菌的繁殖、噬菌体的扩增、质粒的倍增和传递以及基因拷贝的复制和分配为途径。再加上自然海水的流动性，耐药性在海洋中的传播和扩散速度非常快、范围非常广、危害特别大。海洋中细菌的多样性、抗性质粒和噬菌体的多样性以及耐药基因的多样性决定了海洋耐药机理及耐药性传播扩散途径的多样性和复杂性。更重要的是，由于陆地和海洋的直接相互作用及人与海洋的直接或间接相互作用，海洋中三个层次的抗生素耐药性污染源和传播载体都有可能引起陆地环境和人群的耐药污染及传播和扩散。

近10年来，世界范围内的微生物病害给海水养殖业带来惨重的打击和损失。据不完全统计，我国每年水产养殖病害发病率高达50%以上，造成的直接经济损失每年达百亿元之巨。而其中的细菌性病害往往具有暴发性和传染性的特点，危害极其严重。目前已记录的海水养殖鱼虾贝的细菌疾病不下20种（钱云霞等，2001）。尽管优化苗种和合理使用生态制剂是未来养殖业预防细菌性病害的发展方向，但长期以来抗生素化学治疗一直是养殖业细菌性疾病防治的常规方法，抗生素经常被作为饲料添加剂、药饵、药浴或被直接播撒在养殖水体内部以期达到防治疾病和抑菌灭菌的目的。但在实际应用中往往由于对病原诊断的不及时或不准确，抗生素的应用往往无法对症下药，再加上药物使用技术的相对滞后，又缺乏相应政策法规的严格监督执行，使得抗生素药物滥用的情况非常严重（李爱华等，2001）。抗生素，尤其是广谱抗生素的滥用是耐药细菌产生的重要原因。

在水产养殖中由于抗生素的不合理使用而引起病原菌耐药性的报道已屡见不鲜（李爱华等，1997）。早在1957年，在美国就首次观察到由抗磺胺药的杀鲑气单胞菌（*Aeromonas salmonicida*）引起的虹鳟流行性感染疾病。日本也在1971年观察到养殖的大马哈鱼中发生由抗磺胺药和抗氯霉素杀鲑气单胞菌引起的大规模流行性细菌感染病害（Aoki et al., 1983）。随后，由耐药菌引起的水产养殖病害的发生越来越频繁，目前已记录的耐药病原菌还有嗜水气单胞菌（*A. hydrophila*）、迟钝爱德华氏菌（*Edwardsiella ictaluri*）、鳃鱼爱德华氏菌（*E. ictaluri*）、杀鱼巴斯德氏菌（*Pasteurella piscicida*）、溶藻胶弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）、鳗弧菌（*V. anguillarum*）、哈维氏弧菌（*V. harveyi*）、副溶血弧菌（*V. parahaemolyticus*）、杀鲑弧菌（*V. salmonicida*）、鲁氏耶尔森菌（*Yersinia ruckeri*）等（陈会波等，1992；李爱华等，1997；郑国兴等，1999；DePaola et al., 1995）。近年来更严重的是，由多重药物抗性质粒介导的4~5种耐药表型已在养殖生物病原菌中非常普遍。大量抗生素，尤其是广谱抗生素滥用的另一恶果是，养殖生物病害不但没有得到抑止或消除，反而破坏了养殖环境及养殖生物体内和体表正常菌群的有益生物活动，导致遭受病害和尚没有遭受病害的养殖生物失去了抗感染的天然屏障，反而为抗药病原菌的乘虚而入提供了方便。国外许多专家学者认识到了细菌耐药性在水产养殖中的危害性，开展了

养殖生物病原菌耐药谱及生物地理分布的研究,并分离分析了一些抗性质粒的结构、类型和耐药谱,从而使病原菌耐药性的发生、发展及其机理的研究进一步深化(李爱华等,1997)。中国科学院水生生物研究所李爱华等对个别淡水鱼病原菌的个别质粒也进行了提取、分子结构、抗性机理等较深入的研究(李爱华,1998),中国香港中文大学对海水鱼病原弧菌亦做了抗性质粒的分析研究(Li et al., 1999)。但是由于细菌耐药机制的复杂性,比如,细菌对四环素就有30多种不同的耐药基因(Roberts 2003),海洋环境中的细菌至少也有7种以上的不同四环素耐药基因,单用一些质粒的结构特征来研究环境细菌对四环素不同的耐药机制及其起源、传递、扩散途径和动态是远远无法达到目的的。除质粒外,其他一些可移动或传递的遗传载体(如转座子和整合子)也可能参与养殖环境中耐药基因的传播和扩散(Miranda et al., 2003; Rhodes et al., 2000)。另外,海水养殖环境的一个显著特点是细菌和海洋噬菌体的浓度和种类都非常高,一些由细菌染色体介导的耐药基因可通过转导和基因重组而得以实现菌间横向传递,海洋噬菌体在细菌耐药性的传播扩散方面将起到非常大的作用。因此,目前国外研究的主流和热点已转移到在分子水平上测定耐药因子的遗传载体关键结构的核酸序列、起源和耐药基因的核酸序列及其编码的蛋白质氨基酸序列(Funushita et al., 2003; Nonaka et al., 2002; Rhodes et al., 2000; Schmidt et al., 2001; Yoo et al., 2003),并在此基础上对主要抗生素的抗性基因进行系统发育分析,为病原菌耐药机理的快速准确分子诊断提供手段,为监测耐药因子的起源、获得、滞留、传播、扩散途径和动态提供更灵敏、更精确、更快捷的方法,为抗生素的合理使用和管理提供科学依据。

三、细菌耐药机理

传统认为细菌抗药基因的产生多是由于细菌在抗生素的胁迫作用下长期进化的结果。一些抗性基因本身作为细菌自身防御的一种手段就产生于抗生素产生细菌(Barbosa et al., 2000)。目前已知的抗生素分子作用机理主要包括:抑止细菌细胞壁的合成;抑止细菌细胞内叶酸的代谢;干扰核苷酸的合成;干扰DNA的复制或转录;抑止核糖体内蛋白质的翻译。针对以上抗生素作用机理,细菌在进化中产生或获取了多种耐药机制。

1. 抗生素主动外排机制

耐药细菌可产生膜转运蛋白作为分子泵把扩散入菌胞内的抗生素分子在能量作用下输送到细胞外,因此抗生素无法在菌体内积累以达到效应浓度。一些细菌就是以这一方法达到对四环素的耐药性。最近研究发现主动外排机制也是一些细菌获得多重药物抗性的一个重要手段(Paulsen, 2003)。

2. 抗生素活性结构破坏机制

一些耐药细菌可产生水解酶或钝化酶从而使抗生素分子在酶的作用下被水解或修饰而不再具有抑菌和杀菌活性。经典的例子有 β 内酰胺酶对青霉素和头孢霉素的水解钝化反应及氯霉素乙酰转移酶对氯霉素的修饰钝化反应。

3. 抗生素作用靶位改变机制

抗生素的抑菌或杀菌作用往往依赖于其与作用靶位的特异结合。一些细菌会通过编码蛋白基因突变或酶的修饰而改变抗生素作用靶位的结构从而降低抗生素的亲合力。一些细菌对红霉素和万古霉素的抗性即来自于靶位改变机制。

除以上三种主要耐药机理外，一些细菌还可通过形成保护性生物膜 (biofilm)、产生抗生素的细胞膜渗透障碍或抗生素拮抗物而获得耐药性，还有一些细菌可通过抗生素作用靶酶的过度表达而获得耐药性，更有一些细菌可同时运用多种抗药机制以达到高耐药性。

多数情况下细菌的耐药性属于获得耐药性，其产生主要有 2 条途径，即细菌在药物胁迫下的自身基因突变或外源抗性基因的获得。细菌耐药因子传播扩散主要有垂直转移和横向转移 2 个途径，其中横向转移是抗性因子在不同种属细菌间传播的主要途径，主要以质粒或结合转座子为遗传载体，并通过结合或转化等生物过程实现 (Mazel et al., 1999)。1968 年，危地马拉暴发了一场痢疾，12 500 人死亡，导致这场痢疾的细菌体内有抵抗 4 种抗生素的质粒，使得一些临床常规抗生素药物失去疗效，多数人因得不到有效治疗而死亡，质粒传播扩散耐药性的危害由此略见一斑。在海洋环境中，特别是近岸海水养殖水域，海洋噬菌体的浓度和种类相对较高。以噬菌体为媒介，以转导为手段的遗传物质传递的频率也会较高 (Jiang et al., 1998)，因此海洋噬菌体在细菌耐药因子的传播扩散方面起到非常大的作用。

细菌耐药性产生、获得和传播的速度非常快。几十年来在人与耐药细菌的竞争中发现，细菌耐药性进化的速度远远超过了人类抗生素研制开发的速度。细菌对青霉素和头孢菌素类抗生素抗性的进化为从 20 世纪 50 年代的普通 β 内酰胺酶到 20 世纪 80 年代的超广谱 β 内酰胺酶，这一抗性因子进化的过程如实反映了工业抗生素产品世代的更新。在人与耐药细菌的这场战争中，作为宇宙智慧结晶的人类，其前景并不乐观。多重药物抗性因子的广泛传播使得大多数常用抗生素失去效力，耐药细菌疾病的防治因此也更加困难，细菌耐药的危害也更加严重。近来更发现一些细菌的毒力因子与耐药因子同处于一个遗传载体上 (“嵌合型” 质粒) (黄瑞等, 2003)，细菌在获得耐药性的同时更获得了比以前更强的致病力，反过来也可以说，细菌在获得致病力的同时更获得了这一致病力肆虐的由耐药性提供的保护屏障。欧洲早在 20 世纪 70 年代初期就已禁止了四环素作为生长促进剂在养殖业中的应用，氯霉素也在世界上遭到普遍禁用。这些措施有效地缓解了养殖环境中这两种抗生素的耐药性选择压力，在一定程度上减少了耐药细菌的存活量。但一些追踪研究表明抗四环素或抗氯霉素的病原菌仍普遍存在 (Kim et al., 1993; Sorensen, 1979)，究其原因很可能是一些细菌在获得了耐药因子的同时也获得了一些对细菌生长繁衍有利的其他因子，并且这些因子与耐药因子是处在同一遗传载体上，长期的环境选择使抗性因子也得到了保留，这既是所谓的 “交叉适应” (Lewin, 1992)，多重药物抗性就是这一情况的一个特例，细菌在获得对某一抗生素抗性的同时也获得了对其他抗生素的抗性或抗性潜力。对链霉素耐药细菌的研究表明，耐药性在抗生素选择压力解除时仍得到保留的另一原因是耐药突变菌发生了第二点突变而使得耐药菌缓和了耐药突变产生的适应代价，具有了与敏感菌同样的环境适合度，这即是所谓的 “补偿突

变”(Björkman et al., 2000; Levin et al., 2000)。细菌原初产生的或获得的耐药性很可能在进化历程中被永久保留下来。因此,一些耐药性的形成似乎是一条不归路(Morell 1997)。这不但说明了细菌抗性因子产生、获得、保留、传播、扩散过程和机制的复杂性,也说明了海洋养殖水域作为细菌耐药因子滋生地、储藏库和污染源的潜在危害性,更说明了对付抗药细菌任务的艰巨性。但是,在中国海洋科技领域,耐药细菌带来的水产养殖、海洋环境和人类健康的威胁却尚未得到足够的重视,有关研究更是凤毛麟角。

四、海水养殖环境细菌耐药性研究

细菌耐药性除极少数是由生理性状的改变而实现的,绝大多数是由耐药基因的产生、获得和表达实现的。耐药基因的分子检出可以确定无疑地证明细菌的耐药性,阐释细菌耐药机理,更可以检查耐药因子的起源及传播扩散途径和动态,为耐药细菌,尤其是耐药病原菌的追踪监测提供了其他方法无法取代的最佳手段。利用现代分子生物学技术测定耐药基因的核酸序列还可用来检测耐药基因的变异,用来追踪某一耐药基因的系统发生和进化演化,并通过计算机分子结构建模而预测该耐药基因表达产物耐药谱的演化。另外,基因芯片将是未来用于病原菌耐药性的快速准确分子诊断和耐药机理及其传播途径和动态检验的最重要手段,没有各种抗药基因核酸序列的克隆和测定,没有相关抗性基因种类多样性的基础调查研究,基因芯片在此领域的应用将永远无法得以实现。因此,以分子生物学技术为手段的耐药基因检测研究在我国应得到充分的重视。

由于在养殖水体中耐药基因的分子生物学研究国际上才起步不久,目前研究的对象主要集中在氯霉素和四环素两类抗生素药物的耐药基因上(李爱华等, 1997)。主要的方法包括以 PCR为手段的耐药基因的检出和测序以及以 DNA分子探针核酸杂交为基础的特定耐药基因的检测。

细菌对氯霉素的耐药性主要依赖于质粒介导的氯霉素乙酰转移酶的表达,这个酶目前已知有 4种不同类型(CAT_I, CAT_{II}, CAT_{III}和 CAT_{IV})。国外一些研究表明,在氯霉素被禁用多年后氯霉素耐药细菌仍在环境中普遍存在(Kin et al., 1993),这很可能是由于多重药物抗性所致(Yoo et al., 2003)。氯霉素在 1999 年被禁用前曾是我国防治海水养殖细菌病害的常用药。因此,氯霉素抗性基因是分析环境中耐药因子滞留和传播及其长期危害的最佳选择。

四环素类药物(包括四环素、土霉素、金霉素、强力霉素等)在我国仍被大量应用于海水养殖病害防治中。现已发现海水养殖环境中的细菌至少有 7种以上不同的质粒编码的四环素抗性基因(tetA, tetB, tetC, tetD, tetE, tetG, tetY等)(Adams et al., 1998; Andersen et al., 1994; DePaola et al., 1995; Rhodes et al., 2000; Schmidt et al., 2001),并且世界上不同海域内主要四环素抗性基因的种类和组成有很大的差异,这种差异不止是地理上的,还与细菌耐药性的进化有关。新近研究还表明,在海水鱼类养殖水域中的四环素耐药基因与医学临床中发现的耐药基因具有非常高的同源性(Furushita et al., 2003; Rhodes et al., 2000),说明这 2个系统具有相同的耐药性起源及一定方式的基因流通和传递。因此,海水耐药基因的传播可能对人类直接构成威胁。复杂多样的抗性机

理使得四环素抗性基因是进行不同海域耐药性起源和传播范围比较分析的极佳模型。

近年来喹诺酮类药物(如喹诺酮、环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星等)作为一类高效广谱的抗菌药物,在水产细菌病害的防治中被广泛使用。但国内目前已出现水产病原菌对喹诺酮类药物耐药的报道(郑国兴等,1999)。传统上一直认为细菌对喹诺酮类药物的抗性完全来自于细菌染色体编码基因的表达或变异,如染色体基因编码的药物主动外排系统的高效表达或细菌DNA促旋酶或拓扑异构酶上一些特异位点的基因突变。因此,耐药因子通过质粒等遗传载体的横向扩散而引起对喹诺酮耐药性的大规模传播似乎是不存在的。但新近出现的对喹诺酮具有耐药性的多重耐药质粒pMC252(Martínez-Martínez et al., 1998)及质粒介导的喹诺酮耐性基因*qnr*的发现(Jacoby et al., 2001)修正了人们的这一传统看法,细菌对喹诺酮类药物的耐药性不可借助质粒等遗传载体横向传播的说法已成为过去。在人与耐药细菌的竞争中,遗传属性的可塑性使得细菌又一次走在了人类的前面。喹诺酮药类极端稳定,可长时间滞留在环境中(Halling-Sørensen et al., 1998)。因此,在喹诺酮药类大量使用的海水养殖水域密切监视喹诺酮耐药质粒的出现和传播不但可以帮助我们了解新耐药因子的产生、发展、传播、扩散途径和动态,对新的可传递性耐药因子的机制和发生研究均具有重大的科学价值,而且有可能帮助我们及早抑止和阻灭这类质粒向其他环境和人类广泛传播更具有重大的环境、社会和经济意义。

人类对全球细菌耐药性危害的认识主要来自于大量耐药基因分子生物学的研究,相信在海洋学领域,随着耐药基因分子生物学研究的深入,人类对海水养殖环境微生物的耐药机制及耐药因子的传播扩散途径和动态会有更加深刻的认识,为减轻和防止海洋耐药细菌污染及其危害做出贡献。

五、海水养殖环境细菌耐药性防治

高密度低管理的养殖模式,致使海水养殖环境微生物耐药性已非常严重。作者对大连养殖场的1次调查表明,该养殖场海参养殖池中海水土霉素和氯霉素耐药细菌的数量分别高达可培养细菌总数的36%和32%,所分离到的耐药细菌大部分是海洋弧菌,如亮弧菌(*V. splendidus*)和塔斯马尼亚弧菌(*V. tasmanianensis*)等,并且超过半数以上的耐药细菌携带至少一种抗性基因(党宏月等待发表数据)。近年来全国范围内海参养殖毁灭性病害的频繁发生表明,当病害发生时,抗生素药物治疗法已不再有效,施虐的病原微生物很可能已具有了抗药性,这与作者的研究结果是相符合的。面对如此严峻的形势,国内外一些专家学者和养殖业者已在寻求不依赖于抗生素的新的养殖病害微生物的预防和治理方法。

1. 开发和推广抗生素替代品,严格控制抗生素在海水养殖环境中的应用

抗生素的大量使用和滥用是海水养殖环境耐药微生物大量发生的直接原因。只有抗生素的使用量被控制在合理水平,耐药微生物的发生和病害才能得到缓解。从长远观点来看,在海水养殖环境中最好不要使用抗生素类药物,尤其是广谱抗生素类药物。为达到这一目的,目前应大力推行抗生素替代品的研发和应用,如抗菌肽和疫苗等。在养殖

中还应提倡和推广生物防治技术,如应用益生菌和噬菌体等生物制剂,避免抗生素在海水养殖环境中的使用和积累。

2. 改进养殖模式,预防病害微生物的发生和大量繁殖

养殖密度过高、养殖环境恶劣和养殖管理低级是目前海水养殖普遍存在的问题,也是海水养殖过程中微生物病害频发的最根本原因,其危害程度可能将不亚于陆地畜牧业近年来带给我们的警示,疯牛病、禽流感 and 近期报道的猪链球菌感染的暴发和流行最初可能都是由于饲养密度过高、养殖环境太差而引起的病害微生物大量繁殖所致。为预防和避免海水养殖环境中耐药微生物病害的发生和流行,首先是要控制养殖密度、改良养殖环境、加强养殖管理以控制病害微生物的暴发。在该方面应加大复式养殖等生态养殖模式的研究和在生产实践中的推广应用,“蓝色农业”要走“绿色环保”之路。一味地以大量使用抗生素等“高压”措施来控制养殖水体微生物的数量是不符合生态规律的,必将受到自然规律的惩罚。

3. 选育抗病良种,提高养殖动物自身免疫力以避免微生物病害的发生

由于数十年单一品种的长期连续养殖,海水养殖生物种质退化问题可能已非常严重,加上病原微生物普遍具有的快速变异和进化适应能力,目前国内外一些主要海水养殖品种抵御病原微生物入侵的能力越来越差,微生物病害的频繁暴发也在意料之中,再加上多重抗性耐药因子的普遍大量存在,全军覆没式的病害时有发生。选育抗病优良品种、避免养殖品种单一化和退化是预防养殖水体病原微生物病害发生和流行的另一关键措施。由于海洋养殖生物物种资源非常有限,通过基因工程改良现有品种将成为这一领域的关键技术。

4. 建立全国海水养殖环境耐药微生物监控网,做到早期预警、快速诊断和高效防治

在世界卫生组织的倡议下,陆地耐药微生物监控网已在全球建立起来,国外一些国家和地区对海水养殖环境耐药微生物的监测已经或正在开始,我国在该方面的认识和投入明显不足,应在全国沿海范围内建立海水养殖环境耐药微生物等有害微生物的监控站和监测网,通过微生物分离培养技术、现代分子微生物学中的质粒分离纯化和抗性基因分析技术,以及实时 PCR 及基因和蛋白质芯片快速高通量大规模监测技术的应用,在有害微生物、质粒和基因三个水平上实现对海水耐药微生物的快速监测。

5. 加强药物管理,避免抗生素药类的不合理使用和滥用

1998年世界卫生大会(The World Health Assembly, WHA)敦促各成员国采取措施鼓励正确使用价格合适的抗菌药物;禁止无执照医务人员的处方自行使用抗菌药物;改进行为规范以阻止病害的传播,进而阻止耐药菌的扩散;加强立法,禁止假冒伪劣抗菌药物的生产、销售和流通,禁止在非正规市场上销售抗菌药物;减少在食用动物中使用抗菌药物。人们越来越意识到目前应采取行动以阻止这场微生物耐药性引起的未来灾难。面对这一挑战,世界卫生组织《遏制抗微生物药物耐药性的全球战略》提供了一个延

缓耐药菌的出现和减少耐药菌扩散的干预框架，主要措施有：减少传染病的传播；完善获取合格抗菌药物的途径；改善抗菌药物的使用；加强卫生系统及其监控能力；加强规章制度和立法；鼓励开发合适的新药和疫苗。这项战略以人为本，干预对象是与耐药性问题有关并需要参与解决这一问题的人群：包括医师、药剂师、兽医、消费者以及医院、公共卫生、农业、专业社团和制药产业等的决策者们。中国是世界海水养殖第一大国，在中国，由于没有较完善的海水养殖业兽医体系，每个养殖单位（不管是个体养殖户还是大的养殖企业）在对待养殖病害的防治上都有相当大的自主权，抗生素药物的过量使用和滥用非常突出，加强海水养殖业的行为规范管理极其重要。

六、结 语

中国水产养殖过程中抗生素滥用的现象过去一直比较严重，药物残留经常超标。更有甚者，违禁使用药物及禁用药物残留问题时有发生。1995～2000年，日本市场多次退回并销毁抗生素超标的我国鳗鲡及其制品。从1996年起，欧盟禁止我国水产品进入欧盟市场，1997～1998年欧盟官员连续两年对我国进行考察，一直认为我国水产品在水产养殖过程中用药混乱，政府对药物残留监控不利。1999年，欧盟再次考察后终于决定对我国水产品开放市场，但好景不长，在2002年1月31日，由于我国出口的养殖虾中氯霉素等药物残留问题，欧盟食物链与消费品管理委员会通过决议，自2月1日起全面暂停从我国进口动物性产品。滥用和违法使用抗生素药物不但严重影响了我国水产养殖品在国际上的声誉和我国水产养殖业的健康持续发展，同时也增加了海水耐药细菌产生的机会及其危害程度。

由海水养殖用药引起的耐药细菌污染是一个非常严肃和客观的问题，这一问题不仅关系到养殖业的健康持续发展和海洋环境的优劣，而且关系到人类的身体健康和生命安全。人体耐药病原菌疾病的大规模发生和流行所能造成的危害将不亚于SARS或禽流感所造成的危害，这也是为什么国际上对这一问题如此关心和斥巨资进行研究的首要原因。1999年，在美国卫生和人类服务部（HHS）的牵头下，由10个联邦局和部组成了一个处理抗微生物药物耐药性的特别工作组。由美国疾病控制中心（CDC）、食品和药物管理局（FDA）和国立卫生研究所（NIH）共同主持。该工作组认为，美国有责任并有潜力从以下四个方面改进公共卫生：①迅速而有效地应对来自微生物耐药性的威胁；②简化并鼓励开发及妥善使用有助于耐药性问题的产品；③帮助提高消费者和卫生工作者可获得的、有关抗生素耐药和妥当使用原则等信息的质与量，方便产品的安全有效使用，并延长产品的寿命；④重视并协调FDA解决抗生素耐药所需要的科学研究。工作组还制定了一份行动计划于2001年公布，名为防止抗微生物药耐药公共卫生行动计划。

为避免或减少海产动物和人类的耐药病原菌的产生、传播及其所引起的暴发性或流行性疾病出现，尊重人民群众享受清洁安全的生活和娱乐空间的权益，为我们的子孙后代营造一个可持续发展的生态、生存和生活环境，我们应尽快采取措施，开展我国的海洋耐药细菌及其耐药因子的调查研究，尤其是在分子生物学水平上对耐药基因的起源、传播、扩散途径及动态的研究，建立耐药细菌、耐药质粒和耐药基因的监测技术平

台、预警系统和长期监测站和监测网, 研制病害微生物非抗生素的高效化学和生物防治方法, 确保我们要走在细菌的前面, 不要被耐药细菌打一个措手不及。我们还要呼吁政府有关职能部门和社会的参与, 加强抗生素药物的科学使用、管理及法律和社会监督。决不能让海水养殖环境成为危害人民健康和生命的耐药因子孳生、繁衍、传播和扩散的有害场所。

参 考 文 献

- 陈会波, 林阳东, 翁燕玲等. 1992. 鳗鲡赤鳍病病原菌的分离鉴定和耐药性的研究. 水生生物学报, **16**(1): 40~46
- 黄瑞, 吴淑艳, 张学光. 2003. 伤寒杆菌耐药质粒 R_{SB8} 毒力基因的研究. 中华微生物学和免疫学杂志, **23**(5): 393~396
- 李爱华. 1998. 鱼类病原菌中 R^+ 质粒的检出及其特性. 水生生物学报, **22**(4): 319~324
- 李爱华. 2002. 水产养殖中使用的抗菌药物及细菌耐药性. 中国水产科学, **9**(1): 87~91
- 李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深等. 2001. 我国鱼类病原——嗜水气单胞的耐药性研究. 微生物学通报, **28**(1): 58~63
- 李爱华, 王伟俊. 1997. 鱼类病原菌耐药质粒的研究概况. 鱼类病害研究, **19**(3~4): 1~10
- 钱云霞, 邵健忠, 王国良. 2001. 海水养殖鱼类细菌性疾病研究概况. 海洋湖沼通报, **2**: 78~87
- 相建海. 2003. 海洋生物学. 北京: 科学出版社. 287~296
- 徐士新. 2001. 国外对抗菌药物耐药性的研究和相关规定. 中国兽药杂志, **35**(5): 51~55
- 郑国兴, 周 凯. 1999. 嗜水气单胞菌欧洲鳗皮肤溃疡分离株的耐药性. 中国水产科学, **6**(3): 69~72
- Abraham E P, Chan E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature, **146**: 837
- Adams C A, Austin B, Meaden P G et al. 1998. Molecular characterization of plasmid mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. Appl Environ Microbiol, **64**: 4194~4201
- Andersen S R, Sandaa R A. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. Appl Environ Microbiol, **60**: 908~912
- Aoki T, Kikao T, Iemura N et al. 1983. The susceptibility of *A. salmonicida* strains isolated in cultured and wild salmonids to various chemotherapeutics. Bull Jpn Soc Sci Fish, **49**: 17~22
- Barbosa T M, Levy S B. 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. Drug Resist Urdat, **3**: 303~311
- Berkehan R L, Hughes J M. 1993. The conquest of infectious diseases: who are we kidding? Ann Intern Med, **119**: 426~427
- Bjorkman J, Nagaev I, Berg O G et al. 2000. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. Science, **287**: 1479~1482
- Chepossi E, Vezzulli L, Milano A et al. 2003. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. Aquaculture, **219**: 83~97
- Courvalin P, Trieu-Cuot P. 2001. Minimizing potential resistance: the molecular view. Clin Infect Dis, **33**: S138~S146
- Davies J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science, **264**: 375
- DePaola A, Peele J T, Rodrick G E. 1995. Effect of oxytetracycline medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. Appl Environ Microbiol, **61**: 2335~2340
- DePaola A, Roberts M C. 1995. Class D and E tetracycline resistance determinants in gram-negative bacteria from catfish ponds. Mol Cell Probes, **9**: 311~313
- Fether D. 1998. New hunt for the roots of resistance. Science, **280**: 27
- French G L, Woom L, Hui Y W et al. 1989. Antimicrobial susceptibilities of halophilic vibrios. J Antimicrob Chemother, **24**: 183~194
- Furushima M, Shiba T, Maeda T et al. 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish-farm bacteria to those from clinical isolates. Appl Environ Microbiol, **69**: 5336~5342

- Halling Sørensen B, Nielsen SN, Lanzky PF et al. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere*, **36**, 357~394.
- Jacoby GA, Chow N, Waites K. 2001. Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance. In: Program and Abstracts of the Forty first Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL, 2001. Washington, DC: American Society for Microbiology, USA. Abstract 2120, P. 145.
- Jiang SC, Paul JH. 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 2780~2787.
- Kim E, Aoki T. 1993. Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmids of *Piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan. *Microbiol Immunol*, **37**, 103~109.
- Levin BR, Perrot V, Walker N. 2000. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics*, **154**, 985~997.
- Lewin CS. 1992. Mechanisms of resistance development in aquatic microorganisms. In: Michel C and Aldeman D, J. Eds. *Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality*. Paris: Office International des Epizooties, 288~301.
- Li J, Yie J, Foo RW T et al. 1999. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream *Sparus salta*. *Mar Pollut Bull*, **39**, 245~249.
- Manínez Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, **351**, 797~799.
- Mazel D, Davies J. 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol Life Sci*, **56**, 742~754.
- Miranda CD, Kehrenberg C, Ulph C et al. 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 883~888.
- Miranda CD, Zemelman R. 2001. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile. *Mar Pollut Bull*, **42**, 1096~1102.
- Miranda CD, Zemelman R. 2002. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Sci Total Environ*, **293**, 207~218.
- Morell V. 1997. Antibiotic resistance: road of no return. *Science*, **278**, 575~576.
- Murray BE. 1999. Can antibiotic resistance be controlled?. *N Engl J Med*, **330**, 1129~1230.
- Neu HC. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, **257**, 1064~1073.
- Nonaka L, Suzuki S. 2002. New Mg^{++} -dependent oxytetracycline resistance determinant Tet34 in *Vibrio* isolates from marine fish intestinal contents. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 1550~1552.
- O'Brien TF. 1997. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin Infect Dis*, **24**, S2~S8.
- O'Brien TF. 2002. Emergence, spread and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Dis*, **34**, S78~S84.
- Paulsen IT. 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr Opin Microbiol*, **6**, 446~451.
- Rhodes G, Huys G, Swings J et al. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant TetA. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 3883~3890.
- Roberts MC. 2003. Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis*, **36**, 462~467.
- Schmidt A S, Bruun M S, Dalsgaard I et al. 2001. Incidence, distribution and spread of tetracycline resistance determinants and integron associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 5675~5682.
- Shlaes DM, Gerdling DN, John JF et al. 1997. Society for Healthcare Epidemiology for America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance. Guidelines for the Prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infection Control and Hosp Epidemiol*, **18**, 275~291.
- Sørensen M. 1979. Occurrence and distribution of antibiotic resistant *E. coli* strains in faeces from young pigs and calves in Denmark. *Nord Vet Med*, **31**, 25~34.

- Sorum H, L'Abée-Lund TM. 2002. Antibiotic resistance in food-related bacteria - a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *Int J Food Microbiol*, **78**: 43 ~ 56
- Thayumanavan T, Vivekanandhan G, Savithamani K et al. 2003. Incidence of haemolysin-positive and drug resistant *Aeromonas hydrophila* in freshly caught finfish and prawn collected from major commercial fishes of coastal South India. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **36**: 41 ~ 45
- US Congress. Office of Technology Assessment. 1995. Impacts of antibiotic resistant bacteria. OTA-H-629. Washington, DC: U. S. Government Printing Office. 6 ~ 8
- Wise R, Hart T, Caus O et al. 1998. Antimicrobial resistance is a major threat to public health. *Br Med J*, **317**: 609 ~ 610.
- Wong H C, Liu S H, Ku L W et al. 2000. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *J Food Prot*, **63**: 900 ~ 906
- Yoon M H, Huh M D, Kim E et al. 2003. Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multidrug resistant strains isolated from aquatic environments. *Aquaculture*, **217**: 11 ~ 21

Hamfulness of Bacterial Antibiotic Resistance from Maricultural Environments

DANG Hongyue¹ SONG Lisheng¹ ZHANG Zhina²

(¹ Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(² Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT

Antibiotics have been the key chemotherapeutic agents used in maricultural settings to achieve either prophylaxis or therapy. During the last 10 years, the world-wide frequent outbreak of maricultural animal diseases caused by microbes has resulted in extensive and intensive use and misuse of antibiotics. As a harmful side effect, antibiotic resistant bacteria, especially those with multi-drug resistance, are abundant and persistent in marine environments, causing even higher level of difficulty and failure in aquacultural disease control and treatment. Furthermore, via the food chain, interactions of land and ocean, and human maritime activities, antibiotic resistance can be transferred to and spread in healthy marine and terrestrial environments, putting human health and wellbeing at great risk. Thus, maricultural environments as a cause, reservoir and dissemination source of antibiotic resistance, call for our immediate attention and investment of research efforts.