

3种天然产物联合抗生素对肺炎克雷伯氏菌的协同抗菌作用

陈金玉, 刘单阳, 蓝蔚青, 赵勇, 潘迎捷, 孙晓红

Synergistic antibacterial effects of three natural products combined with antibiotics on *Klebsiella pneumoniae*

CHEN Jinyu, LIU Danyang, LAN Weiqing, ZHAO Yong, PAN Yingjie, SUN Xiaohong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210303335>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

噬菌体在水产品安全控制中的应用研究进展

Research progress on the bacteriophage in safety control of aquatic products

上海海洋大学学报. 2021, 30(1): 197 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200703110>

蟹源弗氏柠檬酸杆菌拮抗菌PNB3的分离鉴定与安全性分析

Isolation, identification and safety analysis of antagonistic strain PNB3 against crab-pathogenic *Citrobacter freundii*

上海海洋大学学报. 2021, 30(4): 653 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200402988>

罗红霉素对中国圆田螺ERND酶活性的影响

The effect of Roxithromycin on the Activity of ERND in *Cipangopaludina chinensis*

上海海洋大学学报. 2017, 26(3): 400 <https://doi.org/10.12024/jsou.20160701822>

一株黄金鲫鱼源蜡状芽孢杆菌的筛选、鉴定及耐性研究

Isolation, identification and probiotic properties of a *Bacillus cereus* strain from Golden crucian carp

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 883 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-331>

乳酸链球菌素与乳酸对维氏气单胞菌的协同抑制和损伤作用

Synergistic inhibition and damage effects of nisin and lactic acid against pathogen *Aeromonas veronii*

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 830 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-301>

文章编号: 1674-5566(2022)02-0586-08

DOI:10.12024/jsou.20210303335

3 种天然产物联合抗生素对肺炎克雷伯氏菌的协同抗菌作用

陈金玉¹, 刘单阳¹, 蓝蔚青^{1,2}, 赵勇^{1,2,3}, 潘迎捷^{1,2,3}, 孙晓红^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 食品学院,上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心,上海 201306; 3. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室,上海 201306)

摘要:为筛选出联合抗生素对肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)具有协同抗菌作用的天然产物,采用药敏纸片法测定肺炎克雷伯氏菌对 8 种抗生素的耐药性,采用微量肉汤稀释法测定抗生素和 3 种天然产物的最小抑菌浓度,应用棋盘法分别测定花青素和咖啡酸与抗生素联用对肺炎克雷伯氏菌的抗菌活性,并通过生长曲线评估咖啡酸与抗生素联用的协同抑菌作用。结果表明:肺炎克雷伯氏菌对 8 种抗生素均耐药,抗生素的 MIC 值为 16 ~ >512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。花青素和咖啡酸具有较好的抗菌活性, MIC 值分别为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1 875 $\mu\text{g}/\text{mL}$,肉桂醛无抗菌作用, MIC >250 $\mu\text{g}/\text{mL}$;花青素与头孢他啶和克林霉素联用对肺炎克雷伯氏菌具有协同抗菌作用,2 种抗生素的 MIC 值降低了 4 倍,咖啡酸与 8 种抗生素存在协同作用,抗生素的 MIC 值降低了 8 ~ >4 096 倍。抗生素与咖啡酸联用的协同抗菌效果优于其与花青素的组合,且咖啡酸与磺胺甲恶唑和氯霉素联合使用能持续抑菌至少 24 h。本研究首次报道了咖啡酸与抗生素联用对多重耐药肺炎克雷伯氏菌具有显著协同抗菌作用,表明联合疗法是消减细菌耐药性的一种有效策略。

关键词:多重耐药性;肺炎克雷伯氏菌;天然产物;抗生素;协同作用

中图分类号: R 965 **文献标志码:** A

随着经济的发展,生活水平的不断提升,人们对食品质量和安全的要求逐渐提高。肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)是一类广泛存在于生鲜蔬菜、奶粉、鱼类和肉类中的食源性致病菌,可引起腹痛、腹泻、呕吐等食物中毒症状以及肺炎、尿路感染、肝脓肿和菌血症等疾病^[1-2]。此外,肺炎克雷伯氏菌感染引起的奶牛乳腺炎会严重降低牛奶的产量和品质,给奶业生产造成了巨大的经济损失^[3]。抗生素是防治奶牛乳腺炎的重要抗菌药物,但是长期和过量使用抗生素会导致肺炎克雷伯氏菌产生多重耐药性(multidrug-resistant, MDR)、抗生素的治疗效果变差,还会导致抗生素在乳品中残留,影响食品安全,对全球人类的生命健康造成了严重的威胁^[4]。在美国,每年因食源性致病菌引起的感染人数为 20 万人,其中肺炎克雷伯氏菌感染人数占 20%^[5]。中国细菌耐药性监测网(CHINET)数据表明,

2005—2020 年肺炎克雷伯氏菌对被称为“最后一道防线”的碳青霉烯类抗生素的耐药水平呈现递增趋势。肺炎克雷伯氏菌对亚胺培南的耐药率从 3.0% 增长至 26.4%,对美罗培南的耐药率从 2.9% 上升至 28.0%^[6]。目前,抗生素仍然是治疗肺炎克雷伯氏菌感染的首选药物,然而开发新型抗生素周期长、难度大、成本高,迄今为止,成功研发出新型抗生素这一目标还远未实现。因此,恢复或增强 MDR 肺炎克雷伯氏菌对现有抗生素的敏感性是控制食源性致病菌耐药性持续发展的有效措施。

天然产物具有抗氧化、抗炎、抗菌等生物活性,还具有不易产生耐药性、低毒无残留等优点^[7-8]。研究^[9-10]表明,天然产物与抗生素联合使用是消减食源性致病菌耐药性的有效策略之一,可减少抗菌剂的使用剂量,降低抗生素的残留和潜在的毒副作用,在一定程度上满足了人类对高

收稿日期: 2021-03-17

修回日期: 2021-05-25

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(2019-02-08-00-10-F01149)

作者简介: 陈金玉(1994—),女,硕士研究生,研究方向为食源性致病菌防控。E-mail:jychen_xjy@163.com

通信作者: 孙晓红, E-mail:xhsun@shou.edu.cn

质量、安全的食品追求。MAISURIA 等^[11]报道了蔓越莓原花青素与四环素联合使用能提高 MDR 大肠杆菌对四环素的敏感性。DHARA 等^[12]研究表明肉桂醛与头孢噻肟联合应用能增强 MDR 肺炎克雷伯氏菌对头孢噻肟的敏感性。KEPA 等^[13]研究表明咖啡酸与抗生素(红霉素、克林霉素和头孢西丁)合用可增强 MDR 金黄色葡萄球菌对抗生素的敏感性。由此可知,联合疗法在提高多重耐药菌对抗生素的敏感性方面具有广阔的应用前景。

因此,本研究检测了肺炎克雷伯氏菌对 8 大类共 8 种抗生素的耐药性,探究了 3 种天然产物(花青素、咖啡酸和肉桂醛)与抗生素联合使用对肺炎克雷伯氏菌的协同抗菌作用,并筛选出能增强多重耐药肺炎克雷伯氏菌对抗生素敏感性的天然产物,为天然产物在消减肺炎克雷伯氏菌耐药性的应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试验材料

蓝莓购自杭州市余杭区仙宅村蓝莓种植基地,贮存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱;咖啡酸(纯度 $> 98\%$)、肉桂醛(纯度 $> 99\%$)购自上海 Adamas 有限公司。

1.1.2 菌株

肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae* 305)(ST405 序列型, *fimH*⁺, *mrkD*⁺, *wabG*⁺, *entB*⁺)分离自上海某奶牛养殖场的生鲜乳中,由本实验室保存;大肠埃希菌(*E. coli* ATCC 25922)购自美国菌种保藏中心,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.1.3 主要试剂

药敏纸片、抗生素粉末,青岛海博生物技术

有限公司;无水甲醇、98% 甲酸、无水乙醇、盐酸、氢氧化钠、乙酸乙酯、冰醋酸、二甲基亚砜(DMSO)、甘油,国药集团化学试剂有限公司;Luria-Bertani 肉汤培养基(LB)、麦康凯琼脂(MAC)、Mueller-Hinton 琼脂培养基(MHA),北京陆桥技术股份有限公司。

1.1.4 主要仪器与设备

电子天平,瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司;恒温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;隔水式恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;Bio-Tek 酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;旋转蒸发仪、电热恒温水浴锅,上海申生科技有限公司;ESCO 生物安全柜,上海生义贸易有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备

取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 甘油管中保存的菌株 *K. pneumoniae* 305 划线于 MAC 平板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养 12 h 后,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养 4 h 至对数期($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.8$)。使用 0.5 号麦氏单位标准比浊管比浊,将菌悬液调整为 0.5 号麦氏浓度,即菌液的浓度为 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL。

1.2.2 抗菌化合物溶液的制备

参考 YANG 等^[14]方法制备花青素。取蓝莓冻干粉加入适量甲醇:水:甲酸 = 85:15:0.5(体积比)提取花青素,然后通过树脂纯化法制备终浓度为 $210\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的花青素原液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。咖啡酸、肉桂醛均溶于无水乙醇中并用水稀释,制成质量浓度分别为 30 mg/mL 和 1 mg/mL 的原液备用。选用动物养殖中常用的 8 大类共 8 种抗生素,并分别使用相应的溶剂对其进行溶解^[15],抗生素名称和浓度见表 1。

表 1 抗生素溶液的质量浓度
Tab.1 Concentration of antibiotic solution

抗生素种类 Class	抗生素名称 Antibiotic	缩写 Abbreviation	溶剂 Solvent	质量浓度 Mass concentration/(mg/mL)
β -内酰胺类 β -Lactams	头孢他啶 Ceftazidime	CAZ	无菌水	10.24
喹诺酮类 Quinolones	环丙沙星 Ciprofloxacin	CIP	冰醋酸	10.24
磺胺类 Folate Pathway Antagonists	磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole	SMZ	二甲基亚砜	10.24
硝基呋喃类 Nitrofurans	呋喃妥因 Nitrofurantoin	NI	二甲基亚砜	10.24
氨基糖苷类 Aminoglycosides	克林霉素 Clindamycin	CC	无菌水	10.24
大环内酯类 Macrolides	阿奇霉素 Azithromycin	AZM	无菌水	10.24
氯霉素类 Phenicol	氯霉素 Chloramphenicol	CHL	无水乙醇	10.24
四环素类 Tetracyclines	四环素 Tetracycline	TET	无水乙醇	10.24

1.2.3 耐药性的测定

参照美国临床与实验室标准研究所 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, M100-S28) 推荐的药敏纸片扩散法检测菌株 *K. pneumoniae* 305 对 8 种抗生素的耐药情况^[16]。取 300 μL 菌悬液 (10^8 CFU/mL) 置于 MHA 平板中央, 用无菌棉拭子均匀涂布 MHA 平板, 静置 3 ~ 5 min 后, 将药敏纸片均匀分置于平板表面, 15 min 内倒置平板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 16 ~ 20 h 后测量抑菌圈直径大小。依据 CLSI 的标准, 测定的抑菌圈直径可以判定为敏感、中介敏感和耐药 3 类, 并使用菌株 *E. coli* ATCC 25922 作为质控菌株。

1.2.4 最小抑菌质量浓度的测定

采用微量肉汤稀释法^[17]测定天然产物和抗生素对菌株 *K. pneumoniae* 305 的最小抑菌浓度 (MIC)。向 96 孔板中加入 100 μL 的 LB 液体培养基, 将 100 μL 的花青素 (210 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、咖啡酸 (30 mg/mL)、肉桂醛 (1 mg/mL) 和抗生素 (1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分别加入到 96 孔板的第一行, 采用两倍稀释法进行连续稀释, 最后一行弃去 100 μL 混合液。取 100 μL 稀释后的菌悬液 (10^6 CFU/mL) 依次加入到每个孔中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后, 用肉眼观察无可见菌生长, 并使用酶标仪测定 OD_{600nm}, 与阴性对照组 OD 值无显著性差异的孔所含最低抗菌化合物浓度即为最小抑菌质量浓度。设置阳性对照 (含有菌悬液的液体培养基) 和阴性对照 (含或不含抗菌化合物的液体培养基)。

1.2.5 天然产物与抗生素联合使用对肺炎克雷伯氏菌抗菌活性的测定

采用棋盘法^[18]测定天然产物与抗生素联合使用对菌株 *K. pneumoniae* 305 的协同作用。向含 LB 液体培养基的 96 孔板中分别加入 0 ~ 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗生素和 0 ~ 1 875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的咖啡酸或 0 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的花青素, 进行一系列的排列组合, 混合均匀。随后在每个孔中加入 100 μL 的菌液 (10^6 CFU/mL), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h。参考 WANG 等^[19]方法, 按照下列公式计算分数抑制浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI) 来评估抗生素和天然产物的组合效应。FICI ≤ 0.5 则抗生素与天然产物具有协同作用; $0.5 < \text{FICI} \leq 4.0$ 则抗生素与

天然产物无相互作用; FICI > 4.0 时则抗生素与天然产物具有拮抗作用^[19]。

$$F_A = M_C / M_A \quad (1)$$

$$F_B = M_C / M_B \quad (2)$$

$$F = F_A + F_B \quad (3)$$

式中: F_A 为抗生素的抑菌分数; F_B 为咖啡酸或者花青素的抑菌分数; F 为分数抑制浓度指数; M_C 为抗生素与咖啡酸混合使用时抗生素或咖啡酸的最小抑菌浓度或者抗生素与花青素混合使用时抗生素或花青素的最小抑菌浓度; M_A 为抗生素单独使用时的最小抑菌浓度; M_B 为咖啡酸或者花青素单独使用时的最小抑菌浓度; A 为抗生素; B 为咖啡酸或者花青素; C 为抗生素与咖啡酸的混合物或抗生素与花青素的混合物。

1.2.6 时间依赖性生长曲线的测定

参考 LU 等^[20]的方法, 通过测定时间依赖性生长曲线评估咖啡酸与抗生素联用对菌株 *K. pneumoniae* 305 的协同抑菌作用。在 LB 液体培养基中分别添加抗生素、咖啡酸和抗生素与咖啡酸的混合液, 设置对照组 (仅含 LB 液体培养基), 总体积均为 2 mL。取 10 μL 对数期的菌悬液 (10^8 CFU/mL) 分别加入到 2 mL 处理组和对照组中, 置于恒温摇床中 (37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min) 培养 24 h。使用酶标仪, 选取不同的时间点 (0、2、4、6、8、12、24 h) 测定 OD_{600nm}, 绘制生长曲线评估抗生素、咖啡酸及它们的组合对菌株 *K. pneumoniae* 305 生长的影响。

1.2.7 数据分析

所有试验重复 3 次, 使用 Graph pad Prism 8.0 软件作图, 采用 SPSS 22.0 软件进行方差分析 (One-Way ANOVA), 结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm \text{SD}$) 表示。

2 结果

2.1 肺炎克雷伯氏菌的耐药谱

采用药敏纸片扩散法检测菌株 *K. pneumoniae* 305 对 8 种抗生素的耐药情况 (图 1)。结果显示, 头孢他啶 (CAZ)、环丙沙星 (CIP)、磺胺甲恶唑 (SMZ)、呋喃妥因 (NI)、克林霉素 (CC)、阿奇霉素 (AZM)、氯霉素 (CHL) 和四环素 (TET) 的抑菌圈直径分别为 (13.5 ± 1.3) mm、(13.5 ± 2.2) mm、(1.5 ± 0.5) mm、(13.2 ± 1.3) mm、(3.0 ± 2.0) mm、(23.5 ± 1.3) mm、($3.2 \pm$

0.8) mm 和(2.8±0.8) mm。结果表明:菌株 *K. pneumoniae* 305 对 8 种抗生素均耐药,是多重耐药菌株。此外,菌株 *K. pneumoniae* 305 对 SMZ、CC、CHL 和 TET 完全耐药,导致这些抗生素的治疗效果不佳。

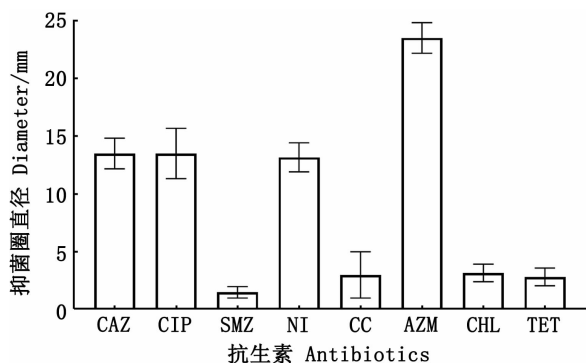


图1 肺炎克雷伯氏菌 305 的耐药谱

Fig. 1 Drug resistance spectrum of *Klebsiella pneumoniae* 305

2.2 抗菌化合物对肺炎克雷伯氏菌的 MIC 值

CIP、NI 和 CC 对菌株 *K. pneumoniae* 305 的 MIC 值分别为 16、128 和 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CAZ、SMZ、AZM、CHL 和 TET 的 MIC 值均高于 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。与药敏纸片法测定的结果一致, CAZ、SMZ、AZM、CHL 和 TET 几乎不具有抗菌活性,即使其在很高的浓度下也无法抑制菌株 *K. pneumoniae* 305 的生长。花青素、咖啡酸和肉桂醛的 MIC 值分别为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 >250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结果表明,在 3 种天然产物中,花青素对菌株 *K. pneumoniae* 305 的抑菌效果最强,咖啡酸次之,肉

桂醛不具备抗菌作用(MIC 值已超出其最大溶解度),见表 2。

2.3 花青素与抗生素联合使用对肺炎克雷伯氏菌的协同抗菌作用

采用棋盘法研究亚抑菌浓度的花青素与抗生素联合使用对菌株 *K. pneumoniae* 305 的协同抗菌作用,结果见表 3。花青素与 CAZ 和 CC 联用的 FICI 值为 0.375 ($\text{FICI} \leq 0.5$),具有协同抗菌作用。花青素能将 CAZ 和 CC 的 MIC 值降低 4 倍,增强了菌株 *K. pneumoniae* 305 对这 2 种抗生素的敏感性。花青素与其他 6 种抗生素联用的 FICI 值为 1.125~3.000 ($0.5 < \text{FICI} \leq 4$),表明花青素与其他 6 种抗生素之间不存在协同作用。

2.4 咖啡酸与抗生素联合使用对肺炎克雷伯氏菌的协同抗菌作用

亚抑菌浓度的咖啡酸与抗生素联合使用对菌株 *K. pneumoniae* 305 的协同抗菌作用结果如表 4 所示。咖啡酸与 8 种抗生素联合使用的 FICI 值为 0.375~0.500 ($\text{FICI} \leq 0.5$),均具有协同抗菌作用。咖啡酸能将 CAZ、SMZ、CC、AZM、CHL 和 TET 的 MIC 值至少降低 4 096 倍,显著提高了菌株 *K. pneumoniae* 305 对这 6 种抗生素的敏感程度。虽然咖啡酸与 CIP 和 NI 之间的协同作用不显著,但也能将这 2 种抗生素的 MIC 值降低 8 倍。结果表明,咖啡酸能显著增强菌株 *K. pneumoniae* 305 对所选用 8 种抗生素的敏感性。咖啡酸与花青素相比与抗生素之间的协同抗菌作用更显著,可大幅度减少抗生素的使用剂量。

表 2 不同抗菌化合物对肺炎克雷伯氏菌 305 的 MIC 值

Tab. 2 MIC values of different antibacterial compounds against *Klebsiella pneumoniae* 305

化合物类别 Class	化合物名称 Antibacterial compounds	最小抑菌质量浓度 MIC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
抗生素 Antibiotics	头孢他啶(CAZ)	>512
	环丙沙星(CIP)	16
	磺胺甲恶唑(SMZ)	>512
	呋喃妥因(NI)	128
	克林霉素(CC)	256
	阿奇霉素(AZM)	>512
	氯霉素(CHL)	>512
	四环素(TET)	>512
天然产物 Natural products	咖啡酸(CA)	1 875
	花青素(ANT)	25
	肉桂醛(CIN)	>250

表 3 花青素与抗生素联合使用对肺炎克雷伯氏菌 305 的协同作用
Tab. 3 Synergistic effect of anthocyanins in combination with antibiotics on *Klebsiella pneumoniae* 305

最佳组合 Chequerboard	浓度 Mass concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抗生素 MIC 降低倍数 Fold reduced of antibiotics	部分抑制浓度指数 FICI	相互作用 Inference
CAZ/ANT	128/3.125	4	0.375	S
CIP/ANT	32/3.125	-	2.125	A
SMZ/ANT	512/3.125	-	1.125	A
NI/ANT	128/25	-	2.000	A
CC/ANT	64/3.125	4	0.375	S
AZM/ANT	512/50	-	3.000	A
CHL/ANT	512/6.25	-	1.250	A
TET/ANT	512/3.125	-	1.125	A

注:CAZ. 头孢他啶; CIP. 环丙沙星; SMZ. 磺胺甲恶唑; NI. 呋喃妥因; CC. 克林霉素; AZM. 阿奇霉素; CHL. 氯霉素; TET. 四环素; ANT. 花青素; S. 协同作用; A. 无相互作用。

Notes: CAZ. Cefotaxime; CIP. Ciprofloxacin; SMZ. Sulfamethoxazole; NI. Nitrofurantoin; CC. Clindamycin; AZM. Azithromycin; CHL. Chloramphenicol; TET. Tetracycline; ANT. Anthocyanin; S. Synergistic; A. Additive.

表 4 咖啡酸与抗生素联合使用对肺炎克雷伯氏菌 305 的协同作用
Tab. 4 Synergistic effect of caffeic acid in combination with antibiotics on *Klebsiella pneumoniae* 305

最佳组合 Chequerboard	浓度 Mass concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抗生素 MIC 降低倍数 Fold reduced of antibiotics	部分抑制浓度指数 FICI	相互作用 Inference
CAZ/CA	<0.125/937.5	>4 096	0.500	S
CIP/CA	2/468.75	8	0.375	S
SMZ/CA	<0.125/937.5	>4 096	0.500	S
NI/CA	16/468.75	8	0.375	S
CC/CA	0.0625/937.5	4 096	0.500	S
AZM/CA	<0.125/937.5	>4 096	0.500	S
CHL/CA	<0.125/937.5	>4 096	0.500	S
TET/CA	<0.125/937.5	>4 096	0.500	S

注:CAZ. 头孢他啶; CIP. 环丙沙星; SMZ. 磺胺甲恶唑; NI. 呋喃妥因; CC. 克林霉素; AZM. 阿奇霉素; CHL. 氯霉素; TET. 四环素; ANT. 花青素; S. 协同作用; A. 无相互作用。

Notes: CAZ. Cefotaxime; CIP. Ciprofloxacin; SMZ. Sulfamethoxazole; NI. Nitrofurantoin; CC. Clindamycin; AZM. Azithromycin; CHL. Chloramphenicol; TET. Tetracycline; ANT. Anthocyanin; S. Synergistic; A. Additive.

2.5 咖啡酸与抗生素联合使用对肺炎克雷伯氏菌生长的影响

亚抑菌浓度的咖啡酸、抗生素以及咖啡酸与抗生素混合液对菌株 *K. pneumoniae* 305 的生长影响结果如图 2 所示。SMZ (1/256 MIC) 和 CHL (1/256 MIC) 处理组的生长曲线与对照组相似,无法抑制菌株 *K. pneumoniae* 305 的生长。用 1/2 MIC 咖啡酸处理的实验组对菌株 *K. pneumoniae* 305 的抑制作用较弱,在前 2 h 可以抑制菌体生长,之后菌体量明显增多。咖啡酸 (1/2 MIC) 与 SMZ (1/256 MIC) 和 CHL (1/256 MIC) 联合使用能显著抑制菌株 *K. pneumoniae* 305 生长,协同抑菌持续 24 h。

3 讨论

牛乳因其营养成分丰富、口感细腻而广受人们的喜爱,但是由于肺炎克雷伯氏菌的存在,奶

牛乳腺炎感染发病率升高,严重影响牛奶的产量和质量,阻碍全球食品产业的发展,威胁人类健康^[21]。如今,为了防治肺炎克雷伯氏菌感染,长期大量使用抗生素加速了肺炎克雷伯氏菌多重耐药性的传播和发展,导致抗生素治疗效果不佳,给乳品产业造成了沉重的经济负担^[22]。肺炎克雷伯氏菌对 8 类抗生素产生了广谱耐药性,且对磺胺类 (SMZ)、氨基糖苷类 (CC)、氯霉素类 (CHL) 和四环素类 (TET) 完全耐药,4 种抗生素的抑菌圈直径为 1.5 ~ 3.2 mm, MIC 值 > 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。蒙正群等^[23]等检测肺炎克雷伯氏菌的耐药性时发现,菌株对 β -内酰胺类、磺胺类和大环内酯类等药物表现出严重耐药,氨苄西林、头孢唑啉和磺胺甲恶唑的抑菌圈直径为 0 ~ 13 mm。肺炎克雷伯氏菌的耐药性日益加重,导致肺炎克雷伯氏菌感染的治愈率急剧降低,此外,耐药性在全球范围内的广泛传播更是令人担忧,因此迫切

需要一种科学有效的方法控制细菌耐药性的发 展。

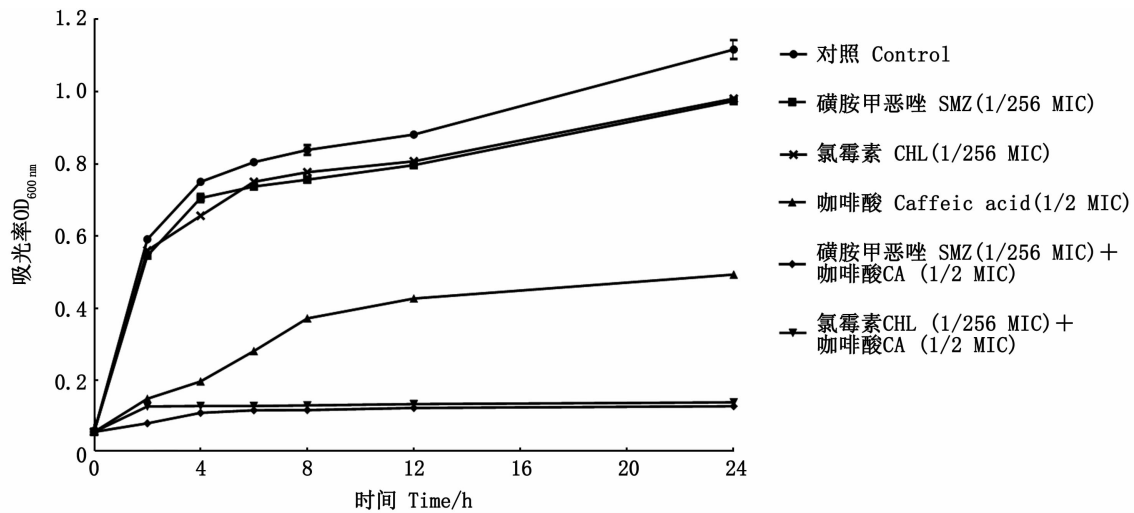


图 2 咖啡酸和抗生素对肺炎克雷伯氏菌 305 生长的影响

Fig. 2 Effects of caffeic acid and antibiotics on the growth of *Klebsiella pneumoniae* 305

天然产物与抗生素联合使用是解决细菌耐药性问题的有效措施。酚类化合物与其他化合物相比具有更广谱的抗菌活性,研究^[24]发现酚类化合物与抗生素联用对 MDR 致病菌具有显著协同抗菌作用,能通过大幅度降低抗菌药物的使用剂量有效增强抗生素的抗菌活性。姜黄素能够提高 MDR 脓肿分枝杆菌对 4 种抗生素(阿米卡星、克拉霉素、环丙沙星和利奈唑胺)的敏感性,并将 4 种抗生素的 MIC 值降低 4 ~ 128 倍^[25]。丁香酚能够增强 MDR 大肠杆菌对 2 种抗生素(头孢噻肟和环丙沙星)的敏感性,将 2 种抗生素的 MIC 值降低 2 ~ 1 024 倍^[26]。本研究中,选用的花青素和咖啡酸都是重要的酚类化合物,能通过降低抗生素的 MIC 值消减肺炎克雷伯氏菌的耐药性。花青素能将 CAZ 和 CC 的 MIC 值减少 4 倍,咖啡酸能将 8 种抗生素的 MIC 值降低 8 ~ > 4 096 倍。VÁZQUEZ-UCHA 等^[27]研究百里香精油与多黏菌素联用对 MDR 肺炎克雷伯氏菌耐药性的消减作用时发现,精油能将多粘菌素的 MIC 值降低 8 ~ 128 倍。抗生素与咖啡酸联用对 MDR 肺炎克雷伯氏菌的协同抗菌效果明显优于其与花青素或百里香精油的组合。这可能是因为咖啡酸作为极性化合物具有亲脂性,能够增强细菌细胞膜通透性,提高抗生素的渗入率,降低 MDR 肺炎克雷伯氏菌的有氧代谢活性,从而显著增强 MDR 肺炎克雷伯氏菌对抗生素的敏感性^[28]。因

此,咖啡酸有被开发为 MDR 肺炎克雷伯氏菌的增敏剂,提高抗生素治疗效果的潜力。

综上所述,联合疗法能有效消减肺炎克雷伯氏菌的耐药性,减少抗生素的使用和残留,在奶牛乳腺炎的防治中具有广阔的应用前景。未来还需深入研究咖啡酸与抗生素联用对多重耐药菌的协同抗菌作用机理,并通过动物实验评价联合疗法的安全性与有效性。

参考文献:

- [1] BOBBADI S, CHINNAM B K, NELAPATI S, et al. Occurrence and genetic diversity of ESBL producing *Klebsiella* species isolated from livestock and livestock products[J]. *Journal of Food Safety*, 2020, 40(1): e12738.
- [2] WU H, WANG M Y, LIU Y Q, et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella* species isolated from chicken broilers [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 232: 95-102.
- [3] 格松. 主要致病菌引发的奶牛乳房炎的防治[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2016, 46(7): 66-67.
GE S. Prevention and treatment of cow mastitis caused by main pathogenic bacteria[J]. *Gansu Animal and Veterinary Sciences*, 2016, 46(7): 66-67.
- [4] GUO Y M, ZHOU H J, QIN L Y, et al. Frequency, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in food samples[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153561.
- [5] LOGAN L K, NGUYEN D C, HUANG F A S, et al. A multi-centered case-case-control study of factors associated with

- Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae infections in children and young adults [J]. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2019, 38(5): 490-495.
- [6] Chinet China Bacterial Resistance Monitoring. Monitoring results of bacterial resistance in China by CHINET in 2020 [EB/OL]. [2020-09-04]. <http://www.chinest.com/Document>.
- [7] 李元政, 胡文忠, 萨仁高娃, 等. 天然植物提取物的抑菌机理及其在果蔬保鲜中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(14): 239-244.
- LI Y Z, HU W Z, SAREN G W, et al. Antimicrobial mechanisms of natural plant extracts and applications in preserving fruits and vegetables [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(14): 239-244.
- [8] KALI A, BHUVANESHWAR D, CHARLES P M V, et al. Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates [J]. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 2016, 7(3): 93-96.
- [9] SANHUEZA L, MELO R, MONTERO R, et al. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172273.
- [10] CHEESMAN M J, ILANKO A, BLONK B, et al. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? [J]. *Pharmacognosy Reviews*, 2017, 11(22): 57-72.
- [11] MAISURIA V B, OKSHEVSKY M, DÉZIEL E, et al. Proanthocyanidin interferes with intrinsic antibiotic resistance mechanisms of gram-negative bacteria [J]. *Advanced Science*, 2019, 6(15): 1802333.
- [12] DHARA L, TRIPATHI A. Cinnamaldehyde: a compound with antimicrobial and synergistic activity against ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic *Enterobacteriaceae* [J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2020, 39(1): 65-73.
- [13] KĘPA M, MIKLASIŃSKA-MAJDANIK M, WOJTYCZKA R D, et al. Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains [J]. *Biomed Research International*, 2018, 2018: 7413504.
- [14] 杨晗, 孙晓红, 吴启华, 等. 野生蓝莓和花青素提取物对高脂饮食小鼠肠道菌群的影响 [J]. *微生物学通报*, 2015, 42(1): 133-141.
- YANG H, SUN X H, WU V C H, et al. Influence of dietary wild blueberry and anthocyanins extract on intestinal microorganisms in high-fat diet-induced mice [J]. *Microbiology China*, 2015, 42(1): 133-141.
- [15] JO A, AHN J. Phenotypic and genotypic characterisation of multiple antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of oxacillin and levofloxacin [J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16: 170.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S28 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-eighth informational supplement [S]. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- [17] GOHIL N, BHATTACHARJEE G, SINGH V. Synergistic bactericidal profiling of prodigiosin extracted from *Serratia marcescens* in combination with antibiotics against pathogenic bacteria [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104508.
- [18] LEE S, AL RAZQAN G S, KWON D H. Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with β -lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Phytomedicine*, 2017, 24: 49-55.
- [19] WANG Q, LV Y M, PANG J, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of D-serine in combination with β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2019, 9(3): 496-504.
- [20] LU X, YANG X Y, LI X, et al. *In vitro* activity of sodium new houttuynonate alone and in combination with oxacillin or netilmicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68053.
- [21] 江静宜. 奶牛乳腺炎病原菌感染模式与乳品质性状的相关性及耐药基因分析 [D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- JIANG J Y. Correlation between infection patterns of dairy cow mastitis pathogens and milk quality traits and analysis of drug resistance genes [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2019.
- [22] LALRUATDIKI A, DUTTA T K, ROYCHOUDHURY P, et al. Extended-spectrum β -lactamases producing multidrug resistance *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Klebsiella pneumoniae* in pig population of Assam and Meghalaya, India [J]. *Veterinary World*, 2018, 11(6): 868-873.
- [23] 蒙正群, 冷依伊, 任梅滢, 等. 一株牛源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定与耐药基因型检测 [J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(4): 534-541.
- MENG Z Q, LENG Y Y, REN M S, et al. Isolation, identification and drug resistance detection of a calf *Klebsiella pneumoniae* strain [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(4): 534-541.
- [24] MIKLASIŃSKA-MAJDANIK M, KĘPA M, WOJTYCZKA R D, et al. Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, 15(10): 2321.
- [25] MARINI E, DI GIULIO M, MAGI G, et al. Curcumin, an antibiotic resistance breaker against a multiresistant clinical isolate of *Mycobacterium abscessus* [J]. *Phytotherapy Research*, 2018, 32(3): 488-495.

- [26] DHARA L, TRIPATHI A. The use of eugenol in combination with cefotaxime and ciprofloxacin to combat ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic *Enterobacteriaceae* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129 (6): 1566-1576.
- [27] VÁZQUEZ-UCHA J C, MARTINEZ-GUTIÁN M, LASARTE-MONTEERRUBIO C, et al. *Syzygium aromaticum* (clove) and *Thymus zygis* (thyme) essential oils increase susceptibility to colistin in the nosocomial pathogens *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 130: 110606.
- [28] LUÍS A, SILVA F, SOUSA S, et al. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of Gallic, caffeic, and chlorogenic acids[J]. *Biofouling*, 2014, 30(1): 69-79.

Synergistic antibacterial effects of three natural products combined with antibiotics on *Klebsiella pneumoniae*

CHEN Jinyu¹, LIU Danyang¹, LAN Weiqing^{1,2}, ZHAO Yong^{1,2,3}, PAN Yingjie^{1,2,3}, SUN Xiaohong^{1,2,3}

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China)

Abstract: This study screened out the natural products that have synergistic antibacterial effects on strain *Klebsiella pneumoniae* when combined with antibiotics. The K-B method was used to determine the drug resistance of strain *K. pneumoniae* to eight types of antibiotics. The broth dilution method was used to determine minimal inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics and three types of natural products. Checkerboard method was used to determine the synergistic antibacterial activities of antibiotics in combination with anthocyanins or caffeic acid against strain *K. pneumoniae*. The synergistic bacteriostatic effect of the combination of caffeic acid (CA) and antibiotics was evaluated by time-dependent killing curve. The results showed that: The strain *K. pneumoniae* was resistant to eight types of antibiotics, and completely resistant to sulfamethoxazole (SMZ), clindamycin, chloramphenicol (CHL) and tetracycline; The MICs of antibiotics ranged from 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to $>512 \mu\text{g}/\text{mL}$; The MICs of anthocyanins and CA were 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1 875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively, which exhibited great antibacterial activities on strain *K. pneumoniae*, and the MIC of cinnamaldehyde was $>250 \mu\text{g}/\text{mL}$, which had no antibacterial effect against strain *K. pneumoniae*, and anthocyanins enhanced the susceptibility of strain *K. pneumoniae* to ceftazidime and CHL by reducing 4-fold of the MICs of two antibiotics; CA synergistically enhanced strain *K. pneumoniae* susceptibility to 8 kinds of antibiotics, and the MICs of antibiotics decreased by 8 ~ $>4\ 096$ times; It is obvious that the synergistic effect of the combination of caffeic acid with antibiotics is better than that of anthocyanins in combination with antibiotics, and furthermore, CA in combination with SMZ or CHL could inhibit bacteria for at least 24 h. This study for the first time reported that the combination of CA with antibiotics had a significant synergistic antibacterial effect on multidrug resistant strain *K. pneumoniae*, and showed that combination therapy was an effective strategy to reduce the drug resistance of pathogens.

Key words: multidrug resistance; *Klebsiella pneumoniae*; natural product; antibiotics; synergistic effect