

# 亚抑菌浓度哌拉西林/他唑巴坦对大肠埃希菌生物膜形成能力的影响

宋洁<sup>1,2</sup>, 洪海<sup>3</sup>, 冯伟<sup>4</sup>, 熊玮<sup>1△</sup>

(1. 第三军医大学西南医院老年科, 重庆 400038; 2. 第三军医大学西南医院预防保健科, 重庆 400038; 3. 北京总后勤部郑常庄千休所卫生所, 北京 100141; 4. 第三军医大学西南医院药剂科, 重庆 400038)

**[摘要]** **目的** 探讨亚抑菌浓度(亚-MIC)哌拉西林/他唑巴坦对大肠埃希菌生物膜形成能力的影响, 为临床抗感染治疗提供理论依据。**方法** 大肠埃希菌最低抑菌浓度检测采用微量肉汤稀释法, 生物膜形成能力分析采用 96 孔板结晶紫染色法, 黏附能力检测采用菌落平板计数法, 采用泳动运动检测亚-MIC 哌拉西林/他唑巴坦对大肠埃希菌运动性的影响。**结果** 亚-MIC 哌拉西林/他唑巴坦能显著抑制大肠埃希菌生物膜形成能力( $P < 0.05$ )。此外, 亚-MIC 哌拉西林/他唑巴坦不但能显著降低细菌的黏附性而且能使其运动能力减弱。**结论** 亚-MIC 哌拉西林/他唑巴坦可能通过抑制大肠埃希菌的黏附性和运动性而抑制其生物膜形成。

**[关键词]** 大肠杆菌; 哌拉西林; 生物膜; 亚抑菌浓度

**[中图分类号]** R378.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)03-0368-03

## Effect of sub-minimal inhibitory concentration piperacillin/tazobactam on biofilm formation of *Escherichia coli* isolates

SONG Jie<sup>1,2</sup>, HONG Hai<sup>3</sup>, FENG Wei<sup>4</sup>, XIONG Wei<sup>1△</sup>

(1. Department of Geriatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Department of Prevention and Health Care, Southwest Hospital, Third Military

Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Clinic of Zhengchangzhuang Sanatorium for Retired Cadres,

Logistics Department of PLA, Beijing 100141, China; 4. Department of Pharmacy, Southwest Hospital,

Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of sub-minimal inhibitory concentration(sub-MIC) piperacillin/tazobactam on the biofilm formation of *Escherichia coli* to provide the theoretical basis for clinical anti-infection treatment. **Methods** The minimal inhibitory concentration of *E. coli* was detected by broth microdilution method. The biofilm formation ability was analyzed by using the 96-well crystal violet staining method. The bacterial adhesion ability was determined by adopting the flat colony counting method. The effect of sub-MIC piperacillin/tazobactam on the motility of *E. coli* was determined by adopting the swimming movement. **Results** Sub-MIC piperacillin/tazobactam could significantly inhibit the biofilm formation of *E. coli* ( $P < 0.05$ ). In addition, sub-MIC piperacillin/tazobactam not only significantly reduced bacterial adhesion, but also decreased the bacterial motility. **Conclusion** Sub-MIC piperacillin/tazobactam might inhibit the biofilm formation of *E. coli* by inhibiting its adhesion and motility.

**[Key words]** *escherichia coli*; piperacillin; biofilms; sub-minimal inhibitory concentration

抗菌药物是临床抗感染治疗的常用药物。在治疗过程中, 抗菌药物血药浓度会有部分时间低于最低抑菌浓度而处于亚抑菌浓度(sub-minimal inhibitory concentration, 亚-MIC)状态, 这是抗菌药物治疗过程中不可避免的情况。研究表明亚-MIC 抗菌药物能够影响细菌的毒力、生物膜和运动性<sup>[1-3]</sup>。哌拉西林属于半合成的广谱青霉素类抗生素, 可治疗敏感细菌引起的感染。哌拉西林与他唑巴坦联合可用于治疗对哌拉西林耐药而对哌拉西林/他唑巴坦敏感的产 $\beta$ -内酰胺酶细菌引起的中、重度感染。有报道亚-MIC 哌拉西林可以导致大肠埃希菌形态改变而产生丝状体<sup>[4]</sup>, 然而关于亚-MIC 哌拉西林/他唑巴坦对大肠埃希菌生物膜形成能力的影响尚未见报道。因此, 本研究以大肠埃希菌临床菌株为研究对象, 观察亚-MIC 哌拉西林/他唑巴坦对大肠埃希菌生物膜形成、黏附性和运动性的影响, 为临床抗感染治疗提供理论依据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源** 大肠埃希菌临床株(E156-E160)及药敏质控菌株 ATCC25922 保存于第三军医大学西南医院药剂科。

**1.1.2 试剂和仪器** 哌拉西林/他唑巴坦(piperacillin/

tazobactam, PTZ)、结晶紫购自美国 Sigma 公司; MH 培养基购自北京陆桥生物技术有限公司; 血琼脂平板购自重庆庞通公司; 胰蛋白胨、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司; 氯化钠购自升博生物制品公司; 冰醋酸购自重庆川东化工有限公司。Multi-skan 型酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 大肠埃希菌最低抑菌浓度(MIC)的检测** 大肠埃希菌 MIC 检测采用微量肉汤稀释法。大肠埃希菌划线接种于血琼脂平板, 37℃ 孵育 18 h。挑取细菌少许单菌落于 4 mL 无菌生理盐水稀释校正至 0.5 个麦氏比浊单位( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL), 然后再用水解酪蛋白(MH)肉汤稀释 100 倍。PTZ 用 MH 肉汤倍比稀释至 11 个浓度梯度(0.25~256.00  $\mu\text{g/mL}$ )。然后在 96 孔板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  稀释菌液和 100  $\mu\text{L}$  系列浓度 PTZ。96 孔板放入 37℃ 孵箱培养 24 h。细菌 MIC 值为能够抑制细菌生长的最低药物浓度, 结果参照美国临床和实验室标准协会(CLSI, 2014)标准进行判读。

**1.2.2 亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌生物膜形成能力的影响** 生物膜形成能力的检测采用 96 孔板结晶紫染色法<sup>[5]</sup>。大肠埃希菌划线接种于血琼脂平板, 37℃ 恒温培养 18 h。挑取单菌

落于 10 mL LB 肉汤, 37 °C、180 r/min 恒温振荡培养 18 h。过夜培养物用 LB 肉汤稀释 1 000 倍。PTZ 组每孔加入 100 μL 菌液和 100 μL PTZ, 使药物终浓度为 1/4 MIC; 空白对照组每孔加入 100 μL 菌液和 100 μL LB 肉汤。每组设置 3 个复孔, 37 °C 恒温培养 24 h。轻轻吸出孔中的浮游菌, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 2 次, 通风阴凉处倒置晾干。然后在每孔中加入 200 μL 1% 结晶紫溶液, 染色 10 min, 自来水冲洗 3 次, 通风阴凉处再次倒置自然晾干。最后每孔加入 100 μL 30% 冰醋酸溶液, 使用酶标仪在 590 nm 处测定吸光度值。

**1.2.3 亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌黏附性的影响** 黏附能力检测采用菌落平板计数法<sup>[6]</sup>。将大肠埃希菌过夜培养物用 LB 肉汤稀释 1 000 倍。实验分为空白对照组和 PTZ 处理组。PTZ 处理组在激光共聚焦显微镜专用细胞培养皿中加入 1 mL 菌液和 1 mL PTZ, 使其药物终浓度为 1/4 MIC。空白对照组加入 1 mL 菌液和 1 mL LB 培养基。37 °C 培养 4 h 后, 用无菌的 PBS 缓冲液轻轻冲洗 2 次以去除浮游菌。然后在培养皿中加入适量的 PBS 缓冲液超声 10 min, 使黏附细胞脱落下来。最后将细胞悬浮液用无菌生理盐水稀释至适当的倍数后, 取 100 μL 稀释菌液加在 LB 固体培养基上并涂布均匀, 37 °C 培养 24 h 后计算细菌数量。每个标本设置 3 个平行组, 实验重复 3 次。

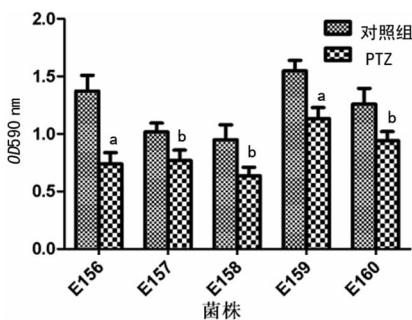
**1.2.4 亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌运动性的影响** 通过泳动运动检测亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌运动性的影响<sup>[7]</sup>。将大肠埃希菌过夜培养物稀释校正至 3 个麦氏比浊单位 ( $9 \times 10^8$  CFU/mL), 取 5 μL 稀释菌液加在不含有和含有 1/4 MIC PTZ 的半固体培养基 (1% 胰蛋白胨, 0.5% 氯化钠, 0.3% 琼脂, pH 7.1~7.3) 表面。37 °C 培养 6 h 后观察细菌菌落直径大小。每个标本设置 3 个平行组, 试验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 PTZ 对大肠埃希菌的 MIC 结果** PTZ 对大肠埃希菌 E156-E160 的 MIC 结果分别为 4、16、128、32、1 μg/mL。由于 1/2 MIC 抗菌药物对细菌生长有影响, 因此, 后续研究均采用 1/4 MIC PTZ 进行实验。

**2.2 亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌生物膜形成能力的影响** 与空白对照组相比, PTZ 能显著降低大肠埃希菌 E156-E160 生物膜的形成能力, 其 *P* 值分别为 0.003、0.022、0.022、0.006 和 0.025, 见图 1。

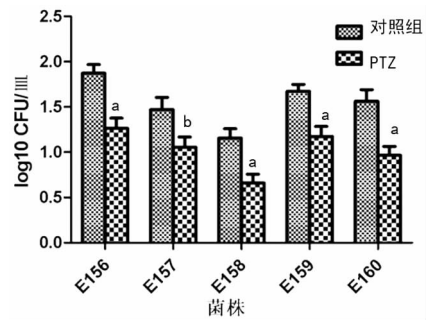


a:  $P < 0.01$ ; b:  $P < 0.05$

图 1 亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌生物膜形成能力的影响

**2.3 亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌黏附性的影响** 与空白对照组相比, 亚-MIC PTZ 对 5 株大肠埃希菌 E156-E160 的黏附性均有显著抑制作用, 其 *P* 值分别为 0.002、0.016、0.004、0.003

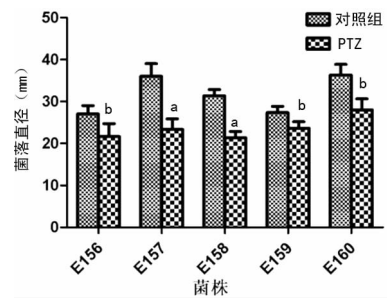
和 0.003。PTZ 处理组大肠埃希菌黏附细胞数减低比例为 28.1%~43.0%, 见图 2。



a:  $P < 0.01$ ; b:  $P < 0.05$

图 2 亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌黏附性的影响

**2.4 亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌运动性的影响** 与空白对照组相比, PTZ 处理组细菌在半固体培养基上的菌落直径明显变小, 其 *P* 值分别为 0.025、0.005、0.001、0.042 和 0.017, 提示 PTZ 能显著降低细菌的运动性, 见图 3。



a:  $P < 0.01$ ; b:  $P < 0.05$

图 3 亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌运动性的影响

**3 讨 论**

大肠埃希菌是临床常见致病菌, 容易在感染过程中形成生物膜, 而生物膜形成是多重耐药大肠埃希菌耐药性获得和传播的重要机制。由于亚-MIC 在临床抗感染过程中是不可避免的, 因此研究亚-MIC 抗菌药物对细菌生物膜形成能力的调控具有重要的临床意义。本研究结果显示亚-MIC PTZ 对大肠埃希菌生物膜形成具有显著的抑制作用。有研究表明亚-MIC PTZ 对铜绿假单胞菌和具核梭杆菌生物膜形成均有抑制作用<sup>[8-9]</sup>, 这与本研究结果相类似。大肠埃希菌生物膜形成的过程包括初始黏附和生物膜的形成, 黏附能力是生物膜形成的重要影响因素<sup>[10-11]</sup>。结果显示亚-MIC PTZ 在抑制生物膜形成的同时可以抑制大肠埃希菌的黏附性, 提示 PTZ 可通过抑制大肠埃希菌的黏附性而抑制其生物膜的形成。

鞭毛是大肠埃希菌的运动器官, 其所介导的运动性在细菌最初的表面黏附和后期生物膜的形成中都具有重要的作用<sup>[12-13]</sup>。有研究表明鞭毛和运动缺陷的铜绿假单胞菌突变株其生物膜形成能力降低<sup>[14]</sup>。WOOD 等<sup>[15]</sup> 研究报道运动性强的大肠埃希菌生物膜形成能力显著高于运动性弱的细菌。HORII 等<sup>[16]</sup> 报道亚-MIC 头孢他啶通过运动性影响铜绿假单胞菌及奇异变形杆菌黏附及生物膜形成。本研究显示亚-MIC PTZ 能够显著抑制大肠埃希菌的泳动运动, 与其他研究报道一致<sup>[17]</sup>, 结果提示亚-MIC PTZ 可能通过抑制细菌运动性来抑制细菌生物膜的形成。本研究表明亚-MIC PTZ 可能通过抑制大肠埃希菌的黏附性和运动性从而抑制其生物膜的形成, 但是其具体机制有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] CRUZ-VILLALÓN G, PÉREZ-GIRALDO C. Effect of alicin on the production of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus epidermidis*[J]. *J Appl Microbiol*, 2011, 110(3):723-728.
- [2] KAPLAN J B, JABBOURI S, SADOVSKAYA I. Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics[J]. *Res Microbiol*, 2011, 162(5):535-541.
- [3] TCHOUAFFI-NANA F, BALLARD T E, CARY C H, et al. Nitazoxanide inhibits biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* by blocking accumulation on surfaces[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(7):2767-2774.
- [4] IIDA K, HIRATA S, NAKAMUTA S, et al. Inhibition of cell division of *Escherichia coli* by a new synthetic penicillin, piperacillin[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1978, 14(2):257-266.
- [5] SHI H Q, SUN F J, CHEN J H, et al. Opposite effects of cefoperazone and ceftazidime on S-ribosylhomocysteine lyase/autoinducer-2 quorum sensing and biofilm formation by an *Escherichia coli* clinical isolate[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5):2334-2340.
- [6] XU Z G, GAO Y, HE J G, et al. Effects of azithromycin on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from catheter-associated urinary tract infection[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(2):569-572.
- [7] ASADISHAD B, HIDALGO G, TUFENKJI N. Pomegranate materials inhibit flagellin gene expression and flagellar-propelled motility of uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 334(2):87-94.
- [8] FONSECA A P, EXTREMINA C, FONSECA A F, et al. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Med Microbiol*, 2004, 53(Pt 9):903-910.
- [9] DE SOUZA FILHO J A, DINIZ C G, BARBOSA N B, et al. Morphological, biochemical, physiological and molecular aspects of the response of *Fusobacterium nucleatum* exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobials[J]. *Anaerobe*, 2012, 18(6):566-575.
- [10] SILVESTRO E M, NAKANO V, ARANA-CHAVEZ V E, et al. Effects of subinhibitory concentrations of clindamycin on the morphological, biochemical and genetic characteristics of *Bacteroides fragilis* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 257(2):189-194.
- [11] VAN DER PLAS M J, JUKEMA G N, WAI S W, et al. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(1):117-122.
- [12] EVANS K L, KANNAN S, LI GANG, et al. Eliminating a set of four penicillin binding proteins triggers the Rcs phosphorelay and Cpx stress responses in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2013, 195(19):4415-4424.
- [13] LEMON K P, HIGGINS D E, KOLTER R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(12):4418-4424.
- [14] O'TOOLE G A, KOLTER R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. *Mol Microbiol*, 1998, 30(2):295-304.
- [15] WOOD T K, GONZÁLEZ BARRIOS A F, HERZBERG M, et al. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(2):361-367.
- [16] HORII T, MORITA M, MURAMATSU H, et al. Effects of mupirocin at subinhibitory concentrations on flagella formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51(5):1175-1179.
- [17] FONSECA A P, SOUSA J C. Effect of antibiotic-induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains under different physiological states[J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 103(5):1828-1837.

(收稿日期:2017-07-03 修回日期:2017-09-10)

(上接第 367 页)

- [14] ARCHAVLIS E, TSELIS N, BIRN G, et al. Survival analysis of HDR brachytherapy versus reoperation versus temozolomide alone: a retrospective cohort analysis of recurrent glioblastoma multiforme [J]. *BMJ Open*, 2013, 3(3):480-485.
- [15] SOUHAMI L, SEIFERHELD W, BRACHMAN D, et al. Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of radiation therapy oncology group 93-05 protocol [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 60(3):853-860.
- [16] BUTOWSKI N A, SNEED P K, CHANG S M. Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(8):1273-1280.
- [17] GUYOTAT J, SIGNORELLI F, FRAPPAZ D, et al. Is reoperation for recurrence of glioblastoma justified? [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(4):899-904.
- [18] SEYSTAHL K, WICK W, WELLER M. Therapeutic options in recurrent glioblastoma—an update [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 99(3):389-408.
- [19] CAMPOS B, OLSEN L R, URUP T, et al. A comprehensive profile of recurrent glioblastoma [J]. *Oncogene*, 2016, 35(45):5819-5825.

(收稿日期:2017-07-13 修回日期:2017-09-20)