



新型氟喹诺酮衍生物对水产致病菌及其生物被膜的抑制作用研究

周青青¹, 杨清麟¹, 李月¹, 李艳红¹, 杨大成², 吴正理^{1*}

1 西南大学水产学院 渔业资源环境研究中心 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715

2 西南大学化学化工学院, 重庆 400715

周青青, 杨清麟, 李月, 李艳红, 杨大成, 吴正理. 新型氟喹诺酮衍生物对水产致病菌及其生物被膜的抑制作用研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3041-3053.

ZHOU Qingqing, YANG Qinglin, LI Yue, LI Yanhong, YANG Dacheng, WU Zhengli. Novel fluoroquinolone derivatives inhibit growth and biofilm formation of pathogenic bacteria in aquatic animals[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3041-3053.

摘要: 【目的】细菌的耐药性给动物抗感染和疾病治疗带来了极大的困难和挑战, 生物被膜是导致细菌耐药性的主要原因之一, 本研究检测分析了氯丙酰基克林沙星对 7 株菌株的抗菌活性及其生物被膜形成能力, 以期发现氯丙酰基克林沙星是否具有抗菌活性。【方法】本研究通过打孔法和微量肉汤二倍稀释法进行常规药敏试验以测定最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC), 通过结晶紫染色法检测这 7 株受试菌在药物亚抑菌浓度下的生物被膜形成能力以及生长速率来测定氯丙酰基克林沙星的抑菌能力。【结果】实验结果显示, 氟喹诺酮类衍生物氯丙酰基克林沙星药物对 4 株受试革兰氏阴性菌的 MIC \leq 10 mg/L、MBC \leq 48 mg/L, 对 3 株受试革兰氏阳性菌也呈现敏感状态(MIC \leq 10 mg/L, MBC \leq 10 mg/L)。结晶紫染色法检测发现, 这 7 株受试菌在药物亚抑菌浓度下的生物被膜形成能力以及生长速率显著下降, 说明氯丙酰基克林沙星在亚抑菌浓度即具有良好的抑菌活性。【结论】本研究证明氯丙酰基克林沙星可用作抗菌剂, 并为新型生物被膜抗菌剂或细菌感染治疗药物的开发提供了新的依据。

关键词: 氟喹诺酮类药物; 药敏实验; 最小抑菌浓度(MIC); 最小杀菌浓度(MBC); 生物被膜

资助项目: 重庆市技术创新与应用发展专项(CSTB2022TIAD-ZXX0053); 重庆市自然科学基金(CSTC2021JCYJ-MSXMX1202, CSTB2022NSCQ-MSX0305)

This work was supported by the Chongqing Special Project for Technological Innovation and Application Development (CSTB2022TIAD-ZXX0053) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2021JCYJ-MSXMX1202, CSTB2022NSCQ-MSX0305).

*Corresponding author. E-mail: zh20140202@swu.edu.cn

Received: 2022-11-19; Accepted: 2023-03-17; Published online: 2023-03-23

Novel fluoroquinolone derivatives inhibit growth and biofilm formation of pathogenic bacteria in aquatic animals

ZHOU Qingqing¹, YANG Qinglin¹, LI Yue¹, LI Yanhong¹, YANG Dacheng², WU Zhengli^{1*}

¹ Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education), Fishery Resources and Environment Research Center, College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China

² School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] The antibiotic resistance poses great challenges to the prevention and treatment of bacterial infections in animals, and biofilm formation is one of the main factors inducing the resistance. We determined the effects of chloropropanoyl ciprofloxacin on the growth and biofilm formation of seven strains of bacteria, with a view to finding out whether chloropropanoyl ciprofloxacin has antibacterial activity. **[Methods]** The inhibitory activity of chloropropanoyl ciprofloxacin was determined by routine drug sensitivity test. The perforation method and microbroth twofold dilution method was employed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The biofilm-forming abilities and growth rates of the seven strains exposed to sub-inhibitory concentrations of the drug were examined by crystalline violet staining. **[Results]** The fluoroquinolone derivative chloropropanoyl ciprofloxacin showed the MIC \leq 10 mg/L and MBC \leq 48 mg/L against four Gram-negative strains and was sensitive to three Gram-positive strains (MIC \leq 10 mg/L and MBC \leq 10 mg/L). The biofilm formation and growth of the seven strains were significantly inhibited by chloropropanoyl ciprofloxacin at the sub-inhibitory concentrations, which indicated that chloropropanoyl ciprofloxacin had good antibacterial activity at sub-inhibitory concentrations. **[Conclusion]** Chloropropanoyl ciprofloxacin can be used as an antibacterial agent and provides a basis for the development of new agents or drugs targeting biofilm for the treatment of bacterial infections.

Keywords: fluoroquinolones; drug sensitivity test; minimum inhibitory concentration (MIC); minimum bactericidal concentration (MBC); biofilm

近年来,细菌性疾病的频发造成了大量的鱼类死亡,并给我国水产养殖业带来了严重的经济损失。长期不科学滥用以及过度使用抗生素导致细菌多重耐药的问题日益突出。多重耐药细菌引起的感染难以治疗,耐药情况随着环境不同也随之变化。革兰氏阳性菌耐药现象一直明显,但目前革兰氏阴性菌也出现大量耐药现象^[1]。根据中国抗菌药物检测网(China Antimicrobial Testing Network, CHINET)的数据,2018年以来,临床

分离的耐药株约30%为革兰氏阳性菌(G⁺),70%为革兰氏阴性菌(G⁻)^[1-2]。G⁺引起的广泛感染主要是由葡萄球菌(*Staphylococcus*)引起的,葡萄球菌[如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus squirrels*)]和无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的感染范围广泛,存在环境中不仅可以引起人类脑膜炎和新生儿的脑脓肿败血症^[3],还可以引起奶牛乳房炎、奶牛乳腺炎和鱼类皮肤溃烂、腹水和化脓性疾病

等^[4-5]。G⁺还可以黏附在组织细胞表面形成由胞外多糖黏附分子、蛋白质、磷壁酸和胞外 DNA 等构成的生物被膜(biofilm, BF)结构^[6]。

生物被膜是生物和非生物表面(包括人体组织)上形成的细菌细胞附着性聚集体。生物被膜为病原菌提供了抵抗恶劣生境的生存条件,并有助于病原菌在慢性感染中持续存在,诱导耐药性出现^[7]。根据美国国立卫生研究院报告,细菌性感染的疾病超过一半都与生物被膜形成相关^[8],生物被膜也是致病菌产生耐药性机制的主要原因。致病菌可以在组织器官上黏附形成生物被膜,也可以在液体培养基中聚集形成生物被膜^[9]。具有生物被膜的细菌比浮游细菌具有更强的定殖能力和较低的免疫系统诱导能力,帮助细菌逃避机体的免疫反应以及减弱抗菌药物的渗透^[10],使感染发展成为慢性感染和反复性感染^[9-11]。因此,抑制或消除生物被膜成为预防和治疗细菌性疾病的重要手段。

G⁻由 3 层包膜组成。第一层是外膜,具有保护和独特的特征,常用来区分 G⁺和 G⁻;第二层是肽聚糖细胞壁,决定细胞形状的外骨骼;第三层是内膜,是磷脂双层,负责结构、运输和生物合成功能^[12]。目前认为,外膜主要起到了对氟喹诺酮类、黏菌素等产生耐药性的作用。抗菌药物无法通过变化的外膜到达靶点,从而使外膜改变产生耐药性^[13]。G⁺通常无外膜,因此与 G⁻相比,G⁺对抗菌药物的内在耐药性更低^[13-15]。气单胞菌(*Aeromonas*)是常见的革兰氏阴性致病菌,在食物、动物和水生环境中广泛存在^[16],在渔业生产上主要引起鱼类皮肤坏死、内脏出血等现象,致死率高^[17]。维氏气单胞菌(*Aeromonas vieteri*)的主要毒力因子是外毒素、胞外酶和黏附素,三类毒力因子还能引起多种疾病,例如坏死性筋膜炎、痢疾和败血症等^[18],也是导致尼罗罗非鱼、鲤、鲶等经济鱼类出血性皮肤病和疔

病的病原菌^[19-21]。嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)是条件致病菌,与环境息息相关,会引起人类的心内膜炎和呼吸道感染等^[22]和黄颡鱼、大黄鱼、大口黑鲈^[23]的爆发性菌血症^[24]。嗜麦芽窄食单胞菌的基因组中存在抗生素灭活酶的基因和耐药外排泵,这些都助于该菌对药物产生抗性^[25-27]。迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)在水温高或水质差等条件都可以引起水产动物的发病,可以感染牛蛙、中华鳖和大鲵等重要经济动物^[28-30]。这些菌外膜中的疏水特性或孔蛋白和其他因素导致生物被膜改变,使之产生耐药性^[13]。

对于致病菌,目前在实际生产中经常应用不同的抗菌药物来治疗。但生物被膜对环境适应性很强,抗菌药物长时间作用于生物被膜,会产生交叉耐药和适应性^[31]。鱼病防治已成为目前水产养殖中最棘手的难题之一。氟喹诺酮类抗菌药物(fluoroquinolones, FQs),具有抗菌力强、抗菌谱广^[32]、抑菌效果好、生产成本低和交叉耐药性少等优点^[33],广泛应用于感染性疾病的治疗,产生了非常高的社会效益。但是,FQs 对鱼类病原菌耐药性的产生和细菌生物被膜的抑制作用研究不多或无研究,本文即报道相关的初步研究结果,希望能为该 FQs 衍生物的开发提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 受试菌

本研究用革兰氏阴性菌:维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*);革兰氏阳性菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、无乳链球菌

(*Streptococcus agalactiae*)、松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*)。受试菌由西南大学水产学院渔业资源环境研究中心分离并保存。

1.1.2 氟喹诺酮类药物衍生物(氯丙酰基克林沙星)

本实验所用的喹诺酮类衍生物,暂定名氯丙酰基克林沙星,分为纯品(纯度>98%)和制剂(10%含量,质量分数)2种,由西南大学化学化工学院杨大成实验室提供,已申请中国专利(申请号:202111325076.8),其化学结构见图1。

1.1.3 培养基

LB培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0 g,酵母浸粉 5.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 12.0 g,加蒸馏水至 1 L, pH 值 7.0±0.2。121 °C高压灭菌 15 min。

LB肉汤(g/L):胰蛋白胨 10.0 g,酵母浸粉 5.0 g,氯化钠 5.0 g,加蒸馏水至 1 L, pH 值 7.0±0.1。121 °C高压灭菌 15 min。

1.1.4 主要仪器

恒温生化培养箱(施都凯仪器设备有限公司),紫外可见分光光度计(翱艺仪器设备有限公司),全波长酶标仪(伯乐公司)。超净工作台(苏州净化设备有限公司);恒温摇床(上海知楚仪器有限公司)。

1.2 可溶性抗生素母液制备

准确称取氯丙酰基克林沙星制剂(10%质量分数)0.500 g,加入 50 mL 无菌水中,振荡,均匀溶解后过滤除菌,获得浓度为 1 000 µg/mL 母液,4 °C冰箱保存。

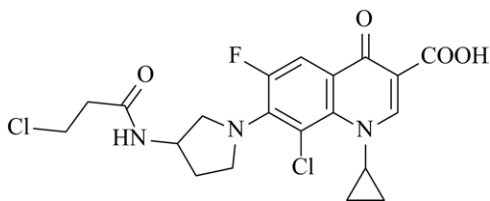


图1 氯丙酰基克林沙星化学结构

Figure 1 Chemical structure of chloropropanoyl clinafloxacin.

1.2.1 菌悬液制备

采用平板划线法,将实验室的菌种接种在LB平板上培养,挑取受试菌单菌落在试管中进行扩大培养。细菌计数后,用液体培养基稀释到合适浓度。本研究中的各菌液浓度均为 $a \times 10^6$ CFU/mL ($1 \leq a \leq 6$)。

1.2.2 药物对菌体外抑菌圈直径的测定

采用平板打孔法测定供试药液的抑菌效果^[34]。首先制备营养琼脂平板,用移液枪吸取 0.1 mL 菌液并均匀涂布在平板上;然后用直径 7 mm 的打孔器打 3 个大小一致的孔洞,分别将孔内加入 40 µL 抗菌药物,将平板放入 4 °C 冰箱中让药液扩 30 min 后移到恒温培养箱中,于 37 °C 培养 16–24 h,观察其结果并测量各孔径周围抑菌圈直径。

结果判定:观察空洞周围有无抑菌圈,用游标卡尺量取其直径(包括空洞直径)大小,采用单因素方差分析药物有效成分对实验受试菌的体外抑菌圈直径,求取 3 次测量结果的平均值,以毫米(mm)为单位记录,结果以 mean±SD 表示。按抑菌圈直径的大小表示极敏(>20 mm)、高敏(15–20 mm)、中敏(10–14 mm)、低敏(<10 mm)和不敏感(0 mm)^[35]。

1.2.3 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定

取氯丙酰基克林沙星母液,根据不同菌液用无菌水稀释后配成对应浓度的药液,采用美国临床实验室标准化委员会(Clinical Laboratory Standardization Committee, NCCLS)推荐的常量稀释法测定该药液的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),观察结果:试管中液体完全清澈,表明无细菌生长;液体浑浊,表明有细菌生长。肉眼观察以无细菌生长试管中的最低药物浓度为 MIC。继续培养 48 h 后,肉眼无细菌生长的试管中取 100 µL 菌液涂平板;30 °C 下培养 24 h,观察结果,以无菌生长或菌

落数 <5 个的药液浓度为该药物的最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC)。每个试验重复 3 次, 每次 3 个平行。

1.2.4 生物被膜抑制试验

将细菌接种于 LB 培养基, 振荡过夜后调整细菌浓度为 0.5 麦氏浓度(10^8 CFU/mL)。向 96 孔板中加入 160 μ L 的 LB 培养基, 再分别加入 20 μ L 的菌液和 20 μ L ($1/4\times$ MIC、 $1/2\times$ MIC 和 $1\times$ MIC)氯丙酰基克林沙星于 96 孔板中, 不加药液的孔为阴性对照, 每组 3 个重复, 30 $^{\circ}$ C 过夜培养后, 用移液枪吸去浮游态菌落, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤 2 次, 弃 PBS, 每孔加入 200 μ L 95%甲醇固定细菌膜, 30 min 后吸去并弃去固定液, 待干燥后, 每个孔加入 200 μ L 0.5%结晶紫, 室温染色 10 min, 用无菌 PBS 洗去染料, 风干后加入 200 μ L 33%冰醋酸释放并结合染料, 5 min 后, 检测各组的 OD_{575} , 根据该值分析生物被膜形成能力。

1.2.5 时间杀伤动力学测定

为探究氯丙酰基克林沙星对测试细菌的功效率, 用 20 μ L 药液($1/4\times$ MIC、 $1/2\times$ MIC 和 $1\times$ MIC)

暴露 180 μ L 的新鲜菌液, 使终浓度为 10^6 CFU/mL。对照培养孔加入普通 LB 液体。在 37 $^{\circ}$ C 培养, 每 2 h 在 600 nm 处连续测量光密度, 进一步绘制 OD_{600} 的平均值与时间的关系以找出功效。

1.2.6 统计学分析

采用 Excel 2010 进行数据初步处理, 实验数据用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析, 对数据进行单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 利用 Duncan's 检验进行多重比较, $P<0.05$ 即认为有显著性差异。使用 GraphPad Prism 9.4 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 氯丙酰基克林沙星的抗菌性能

本研究采用打孔法进行 7 种受试菌敏感性的测定, 结果表明, 氯丙酰基克林沙星对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有显著的抑菌作用(图 2)。对受试菌敏感性区域的直径范围在 20 mm 之内, 应用不同浓度的氯丙酰基克林沙星进行 MBC 和 MIC 的测定。

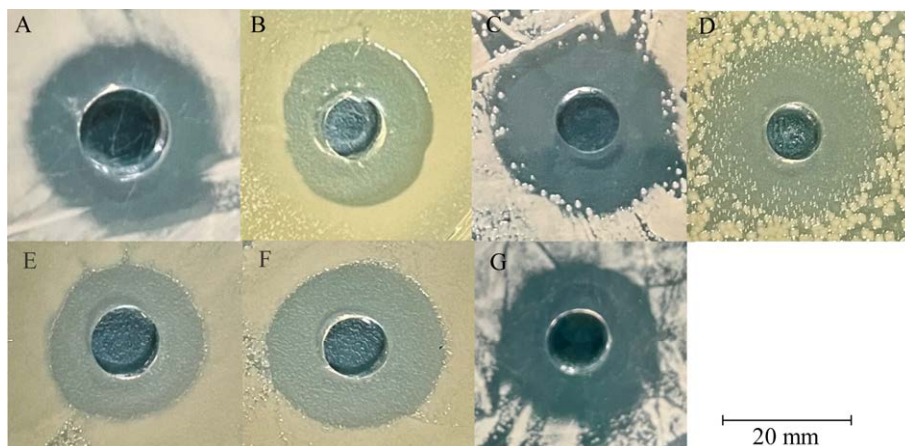


图 2 氯丙酰基克林沙星对革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌菌株的影响

Figure 2 Effect of chloropropanoyl clinafloxacin on Gram-negative and Gram-positive bacterial strains. A: *Aeromonas veronii*. B: *Aeromonas hydrophila*. C: *Stenotrophomonas maltophilia*. D: *Edwardsiella tarda*. E: *Staphylococcus aureus*. F: *Streptococcus agalactiae*. G: *Staphylococcus sciuri*.

现象表明,氯丙酰基克林沙星对受试菌具有很强的抑菌活性。

采用试管二倍稀释法检测药物对受试菌的 MIC 和 MBC。结果显示,维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌、迟缓爱德华氏菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和松鼠葡萄球菌的 MIC 分别为 5、5、5、10、5、5、10 $\mu\text{g/mL}$, MBC 分别为 15、10、5、48、10、5、10 $\mu\text{g/mL}$ (图 5)。

2.4 亚抑菌浓度下氯丙酰基克林沙星抑制 7 种病原菌生物被膜形成

通过结晶紫染色法检测了亚抑菌浓度下氯

丙酰基克林沙星对病原菌生物被膜形成的抑制作用。相比各自菌株的对照组(不加氯丙酰基克林沙星处理的为对照组),结果发现 5 $\mu\text{g/mL}$ 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 的氯丙酰基克林沙星可显著抑制 7 种病原菌的生物被膜形成(图 6)。图 6 显示,维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌、迟缓爱德华氏菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和松鼠葡萄球菌生物被膜数量对照组与 $1/4\times\text{MIC}$ 、 $1/2\times\text{MIC}$ 和 $1\times\text{MIC}$ 组之间存在显著性差异 ($P<0.05$),变化趋势为:对照 $>1/4\times\text{MIC}>1/2\times\text{MIC}>1\times\text{MIC}$ 。

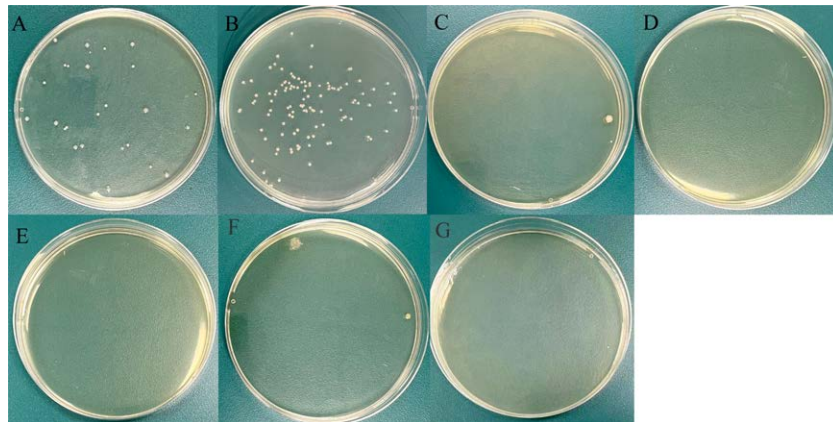


图 4 细菌在药物 MBC 浓度下暴露 48 h 的生长情况

Figure 4 Images of bacteria exposed to drug MBC concentrations for 48 h. A: *A. veronii*. B: *A. hydrophila*. C: *S. maltophilia*. D: *E. tarda*. E: *S. aureus*. F: *S. agalactiae*. G: *S. sciuri*.

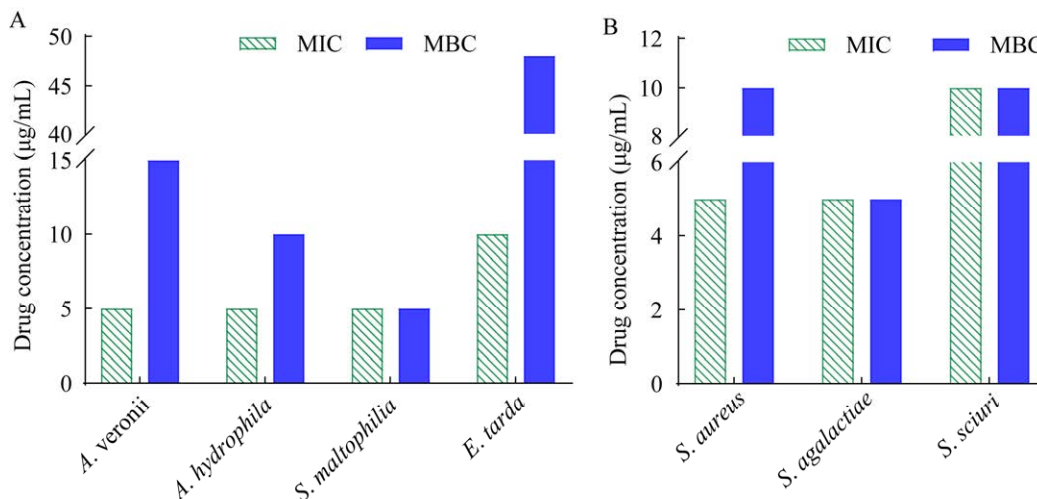


图 5 氯丙酰基克林沙星对受试菌的 MIC 和 MBC

Figure 5 MIC and MBC of chloropropanoyl clinafloxacin on the tested bacteria.

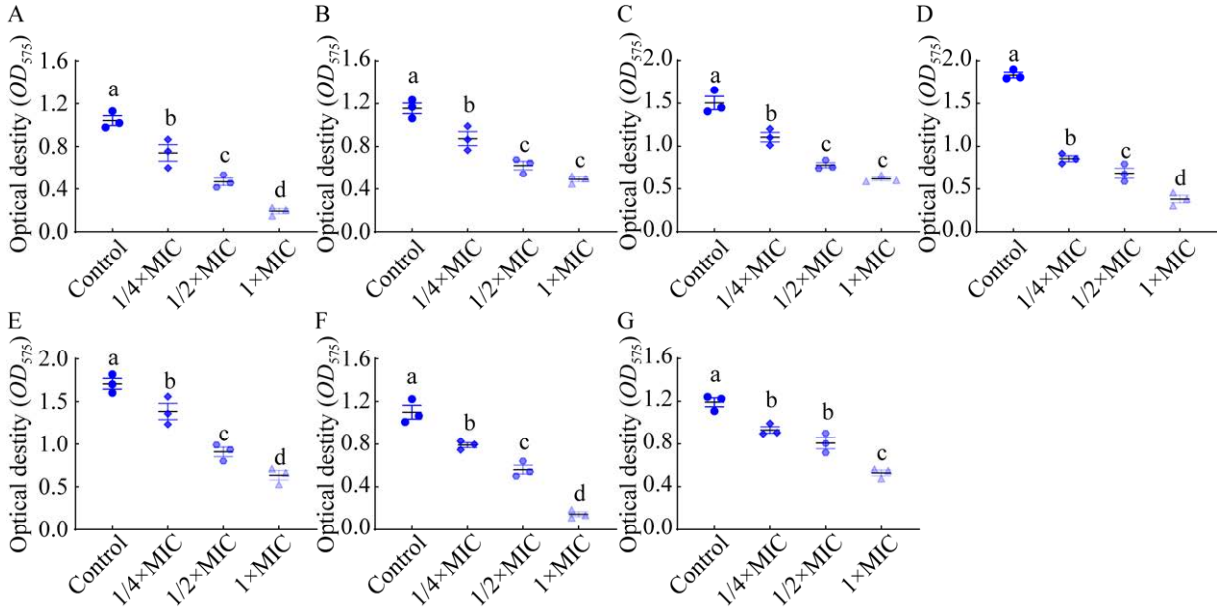


图 6 不同浓度氯丙酰基克林沙星对生物被膜的影响

Figure 6 Effect of different concentrations of chloropropanoyl clinafloxacin on biofilm (mean±SD, $n=3$). Values with different letters (a, b, c, and d) are significantly different ($P<0.05$). A: *A. veronii*. B: *A. hydrophila*. C: *S. maltophilia*. D: *E. tarda*. E: *S. aureus*. F: *S. agalactiae*. G: *S. sciuri*.

2.5 细菌生长抑制

为了探究不同时间的氯丙酰基克林沙星对细菌生长的影响情况,在 1/4×MIC、1/2×MIC 和 1×MIC 氯丙酰基克林沙星浓度处理后,记录细

菌的生长情况。通过时间杀灭动力学可以看出氯丙酰基克林沙星对上述细菌具有剂量依赖性杀菌作用(图 7)。结果表明,不同浓度的氯丙酰基克林沙星对受试菌的生长都表现出抑制作用。

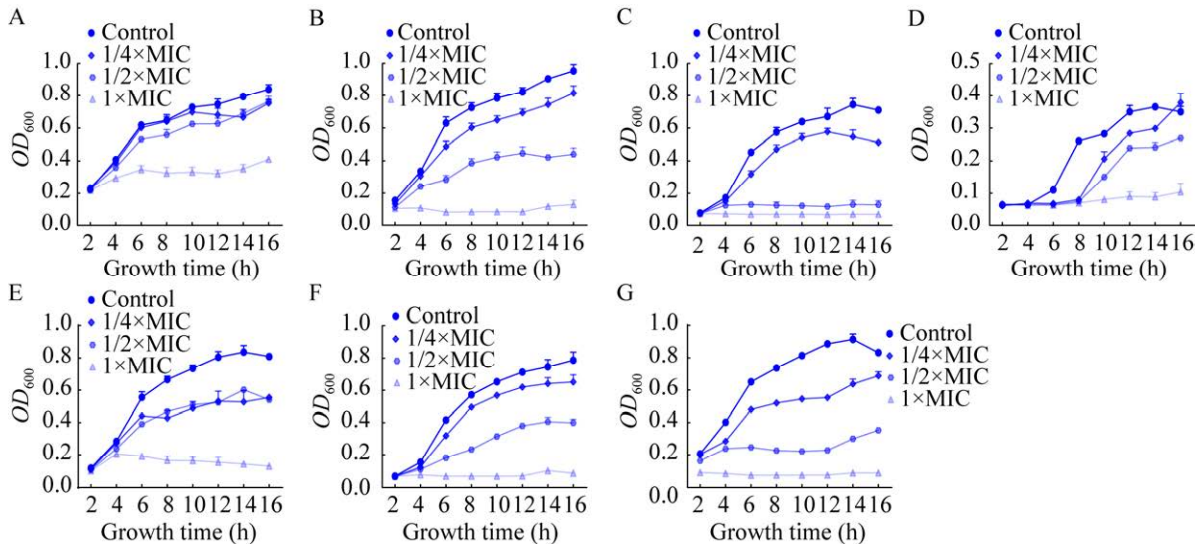


图 7 不同浓度的氯丙酰基克林沙星对细菌生长动力学的影响

Figure 7 Effect of different concentrations of chloropropanoyl clinafloxacin on bacterial growth kinetics (Mean±SD, $n=3$). A: *A. veronii*. B: *A. hydrophila*. C: *S. maltophilia*. D: *E. tarda*. E: *S. aureus*. F: *S. agalactiae*. G: *S. sciuri*. The test organisms were treated with different concentrations (1/4×MIC, 1/2×MIC, and 1×MIC) of chloropropanoyl clinafloxacin. Untreated growth cycles of the test bacteria were used as growth controls. The optical density at 600 nm was measured at regular intervals over a 2 hour period.

3 讨论与结论

近年来, 药物在人体医学和水产动物兽医用药方面发挥着不可取代的作用, 并且应用也越来越广泛^[36]。病原菌的耐药性随着药物广泛应用也日益增加。在实际水产养殖环境中, 酸碱度、氨氮等因素加速了细菌耐药性的产生和传播。早期预防和治疗水产相关细菌疾病最常见的方法就是将抗菌药物添加到水和饲料中^[37], 从而使抗菌药物以亚抑菌浓度存于动物体内^[38]。亚抑菌浓度可以增强细菌生物被膜的形成能力从而造成持续性感染^[39]。Roy 等^[40]的研究发现生物被膜是多种慢性疾病的病因, 但由于耐药性产生很难有效治疗; 并建议新型抗菌药物的研究焦点主要集中在药物结构、作用机制和对病原菌的 MIC、MBC、最小生物被膜抑制浓度等方面。因此, 本研究探究氯丙酰基克林沙星对致病菌的 MIC、MBC、生物被膜形成能力和生长的影响, 可为开发该抗菌药物防止细菌持续性感染提供理论依据。

氯丙酰基克林沙星属于喹诺酮类药物的衍生物, 理论上具有喹诺酮类药物抗菌谱广、药代动力学良好、副作用小和高效等特点。在我国, 喹诺酮类药物, 如恩诺沙星、环丙沙星和左氧氟沙星, 被列为广泛使用的抗菌药物^[41]。在人用、兽用和水产中可用的喹诺酮类药物种类不一, 根据 2022 年《水产养殖规范用药》^[42], 在水产上可以用的喹诺酮类药物仅有恩诺沙星、环丙沙星, 可用品种较少。并且我国的喹诺酮类药物产量和销量巨大, 以恩诺沙星为例, 原料药在 2013–2017 年销量为 5 874 t、可溶性粉 9 075 t、水产用药 6 806 t^[43]。并且在 2003–2004 年水产养殖场检测出对恩诺沙星的耐药菌株达到 44.8%^[44]。近年来, 伴随着我国集约化养殖发展、动物疾病的多样化、水产用药单一性造成了药物

的滥用和耐药现象更明显, 2018 年江苏部分地区气单胞菌对恩诺沙星耐药率达到 62.5%^[45]。我国的《兽药管理条例》也严厉禁止将人用药品用于动物, 以防止超级耐药菌的出现, 威胁人类健康^[46]。因此, 研发新型的水产用药迫在眉睫。克林沙星曾经是广谱抗菌药物中的明星分子, 尤其对革兰氏阳性菌、厌氧菌和支原体都具有良好的治疗能力^[47], 已经完成了人用药物的二期临床研究, 但开发商最终因为其出现严重的光毒性问题未将其上市^[48], 但在国外作为储备药物^[49]。本研究合作者近年来对喹诺酮类药物包括克林沙星进行了较多研究, 获得了许多高活性且稳定的克林沙星衍生物^[49-50], 显示了较好的前景。氯丙酰基克林沙星是以喹诺酮为骨架结构, 以克林沙星为基础结构, 进行酰基化防止自身偶联产生副产物; 引入氯原子来降低或消除毒副作用。前期经过抗菌活性初筛研究氯丙酰基克林沙星的抗菌活性优于克林沙星; 并且研究小鼠急性毒性实验证明克林沙星的 LD_{50} 为 116.60±5 mg/kg, 而氯丙酰基克林沙星 LD_{50} 为 120–170 mg/kg, 毒性低于克林沙星, 水溶性和稳定性也优于克林沙星, 具有很大的开发应用前景^[49-50]。

为了探索氟喹诺酮衍生物的新用途, 本研究探讨了氯丙酰基克林沙星对水产致病菌的抑制作用, 进行了 MIC、MBC 及敏感度的测定。研究发现, 与 4 种革兰氏阴性菌相比, 革兰氏阳性菌更容易受到该药的影响, 并且随着药物浓度的增加对革兰氏阳性菌的影响更加突出。很显然, 7 株受试菌尤其是革兰氏阳性菌对药物都高度敏感, 药物的抑菌效果好, 可能的原因是氯丙酰基克林沙星作为喹诺酮类药物的一员, 抑菌机制依然是结合细菌的拓扑异构酶 II、抑制正常的 DNA 复制, 杀菌效果强^[51]。

生物被膜的产生在生产实践和医药领域都是一个重要的问题。植入物(食品管道或空气管

道)或者饲料中的生物被膜形成可能会引起并发症。并且生物被膜的产生会使疾病更难以治愈^[52]。研究发现肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)在胃肠道、呼吸道和泌尿道容易形成生物被膜进行侵袭性感染造成慢性疾病及免疫力持续低下^[10]。流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的感染复发与慢性化也与它们生物被膜形成能力有关,导致其他细菌的黏附,使感染的过程恶化^[53-54]。水产养殖环境为气单胞菌属的细菌形成生物被膜提供了合适的条件^[55],在鱼中引起败血症、溃疡性感染等,并且生物被膜也可能在鱼类食品加工过程中引起持续的交叉污染,为公众健康构成威胁^[56-57]。因此本研究进一步探究了药物对细菌的生长和生物被膜形成的影响。在药物亚抑菌浓度下检测了受试菌的生长情况,经过药物处理的细菌生长曲线随着时间推移而呈现生长速率缓慢的现象,表明药物能够有效地抑制受试菌的生长和生物被膜形成。进而推测,该药物可以较好地抑制细菌生物被膜屏障,使抑菌物质更好地渗入细菌内部,从而起到杀菌作用。

本研究结果展现了氯丙酰克林沙星对 7 株水产致病菌具有较好的抑制活性,具有开发前景和价值。但氯丙酰克林沙星抗菌的分子机制、药代动力学和药效学等还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] MAGILL SS, EDWARDS JR, BAMBERG W, BELDAVS ZG, DUMYATI G, KAINER MA, LYNFIELD R, MALONEY M, MCALLISTER-HOLLOD L, NADLE J, RAY SM, THOMPSON DL, WILSON LE, FRIDKIN SK, Emerging Infections Program Healthcare-associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2014, 370(13): 1198-1208.
- [2] HU FP, GUO Y, YANG Y, ZHENG YG, WU S, JIANG XF, ZHU DM, WANG F, XU YC, ZHANG XJ, ZHANG ZX, JI P, KANG M, HE C, WANG CQ, HE LY, XU YH, HUANG Y, CHEN ZJ, SUN ZY, et al. China antimicrobial surveillance resistance reported from China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) in 2018[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2019, 38(12): 2275-2281.
- [3] ALHHAZMI A, HURTEAU D, TYRRELL GJ. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016, 54(7): 1774-1781.
- [4] 赵卿, 李金钟, 吴正祥, 相青珍. 松鼠葡萄球菌脑膜炎及菌株的分离与鉴定[J]. *中国人兽共患病杂志*, 1996, 12(5): 54.
ZHAO Q, LI JZ, WU ZX, XIANG QZ. Isolation and identification of staphylococcal meningitis in squirrel and its strains[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 1996, 12(5): 54 (in Chinese).
- [5] 王光锋, 李舫, 朱明恩, 郭闯. 1 株黄颡鱼源松鼠葡萄球菌的分离鉴定及其耐药性分析[J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49(2): 73-78.
WANG GF, LI F, ZHU ME, GUO C. Isolation, identification and drug resistance of one strain *Staphylococcus sciuri* from yellow catfish[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 49(2): 73-78 (in Chinese).
- [6] IDREES M, SAWANT S, KARODIA N, RAHMAN A. *Staphylococcus aureus* biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(14): 7602.
- [7] HOFFMAN LR, D'ARGENIO DA, MACCOSS MJ, ZHANG ZY, JONES RA, MILLER SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation[J]. *Nature*, 2005, 436(7054): 1171-1175.
- [8] COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [9] MOHAMED SH, MOHAMED MSM, KHALIL MS, AZMY M, MABROUK MI. Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(1): 84-95.
- [10] PIPERAKI ET, SYROGIANNOPOULOS GA, TZOUVELEKIS LS, DAIKOS GL. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial

- resistance[J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2017, 36(10): 1002-1005.
- [11] GUILHEN C, MIQUEL S, CHARBONNEL N, JOSEPH L, CARRIER G, FORESTIER C, BALESTRINO D. Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells[J]. Npj Biofilms and Microbiomes, 2019, 5: 25.
- [12] BREIJYEH Z, JUBEH B, KARAMAN R. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(6): 1340.
- [13] MILLER SI. Antibiotic resistance and regulation of the Gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules[J]. mBio, 2016, 7(5): e01541-e01516.
- [14] GUPTA V, DATTA P. Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: antibiotic hybrids[J]. The Indian Journal of Medical Research, 2019, 149(2): 97-106.
- [15] EXNER M, BHATTACHARYA S, CHRISTIANSEN B, GEBEL J, GORONCY-BERMES P, HARTEMANN P, HEEG P, ILSCHNER C, KRAMER A, LARSON E, MERKENS W, MIELKE M, OLTMANN S, ROSS B, ROTTER M, SCHMITHAUSEN RM, SONNTAG HG, TRAUTMANN M. Antibiotic resistance: what is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria?[J]. GMS Hygiene and Infection Control, 2017, 12: Doc05.
- [16] KHOR WC, PUAH SM, KOH TH, TAN JAMA, PUTHUCHEARY SD, CHUA KH. Comparison of clinical isolates of *Aeromonas* from Singapore and Malaysia with regard to molecular identification, virulence, and antimicrobial profiles[J]. Microbial Drug Resistance (Larchmont, N Y), 2018, 24(4): 469-478.
- [17] PESSOA RG, MARQUES DC, LIMA RA, OLIVEIRA MM, LIMA GS, MACIEL de CARVALHO EVM, COELHO LB. Molecular characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas* spp. isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*)[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 147: 104273.
- [18] LIU ZG, LI AY, WANG YP, IQBAL M, ZHENG AF, ZHAO MM, LI ZK, WANG N, WU C, YU DP. Comparative analysis of microbial community structure between healthy and *Aeromonas veronii*-infected Yangtze finless porpoise[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 123.
- [19] ABD-EL-RHMAN AMM. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(3): 454-459.
- [20] FALCO A, FROST P, MIEST J, PIONNIER N, IRNAZAROW I, HOOLE D. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(6): 1051-1057.
- [21] WANG RX, HU XC, LÜ AJ, LIU RR, SUN JF, SUNG YY, SONG YJ. Transcriptome analysis in the skin of *Carassius auratus* challenged with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 94: 510-516.
- [22] BALASUBRAMANIAN R, FOURNIER PE, MENON T. Culture-negative endocarditis caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a report of two cases[J]. Future Microbiology, 2022, 17: 819-822.
- [23] 郁二蒙, 张振男, 夏耘, 谢骏, 王广军, 余德光. 摄食不同饵料的大口黑鲈肠道菌群分析[J]. 水产学报, 2015, 39(1): 118-126.
- YU EM, ZHANG ZN, XIA Y, XIE J, WANG GJ, YU DG. Effects of different diets on intestinal microflora of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(1): 118-126 (in Chinese).
- [24] 杨文飞, 熊展博, 吴旭光, 韩雨希, 王红, 徐中强, 李槿年. 黄颡鱼暴发性出血病病原菌的分离鉴定及其生物膜形成特性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3335-3344.
- YANG WF, XIONG ZB, WU XG, HAN YX, WANG H, XU ZQ, LI JN. Isolation, identification and biofilm forming characteristics of pathogen causing fulminant hemorrhagic disease in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Microbiology China, 2019, 46(12): 3335-3344 (in Chinese).
- [25] OKAZAKI A, AVISON MB. Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(1): 359-360.
- [26] SANCHEZ P, ALONSO A, CAMPANARIO E, ALOS I, MARTINEZ JL. Accumulation and efflux of quinolones by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Revista Espanola de Quimioterapia, 2000, 13(2): 176-181.

- [27] SÁNCHEZ MB, HERNÁNDEZ A, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ JM, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, MARTÍNEZ JL. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants[J]. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 148.
- [28] MOHANTY BR, SAHOO PK. Edwardsiellosis in fish: a brief review[J]. *Journal of Biosciences*, 2007, 32(3): 1331-1344.
- [29] PARK SB, AOKI T, JUNG TS. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish[J]. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 67.
- [30] XU TT, ZHANG XH. *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2014, 431: 129-135.
- [31] SZYBALSKI W, BRYSON V. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics[J]. *Journal of Bacteriology*, 1952, 64(4): 489-499.
- [32] 杨炳烈, 付天灵. 喹诺酮类药的药理作用与临床合理应用分析[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(51): 120.
YANG BL, FU TL. Analysis of pharmacological action and rational clinical application of quinolones[J]. *World Latest Medicine Information*, 2019, 19(51): 120 (in Chinese).
- [33] 常冰雪, 马志, 曲岩, 陆兆新, 吕凤霞, 赵海珍, 张充, 别小妹. 铜绿假单胞菌对不同抗生素交叉耐药性和附属敏感性产生规律的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(5): 940-945.
CHANG BX, MA Z, QU Y, LU ZX, LÜ FX, ZHAO HZ, ZHANG C, BIE XM. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the rule of cross-resistance and collateral sensitivity against different antibiotics[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2019, 42(5): 940-945 (in Chinese).
- [34] 徐海军, 余雪萍, 张圣尧. 市售兽用抗菌药平板打孔法药敏试验的研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(1): 159-162, 262.
XU HJ, YU XP, ZHANG SY. Study on drug sensitivity test of commercial veterinary antibacterial drugs by plate punching method[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(1): 159-162, 262 (in Chinese).
- [35] 吴建忠, 谭洁梅, 刘容珍. 竹丝鸡大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *广东农业科学*, 2009, 36(3): 127-129.
WU JZ, TAN JM, LIU RZ. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Escherichia coli* from shredded bamboo chicken[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2009, 36(3): 127-129 (in Chinese).
- [36] CARBONE M, PENNISI MG, MASUCCI M, de SA, GIANNONE M, FERA MT. Activity and postantibiotic effect of marbofloxacin, enrofloxacin, difloxacin and ciprofloxacin against feline *Bordetella bronchiseptica* isolates[J]. *Veterinary Microbiology*, 2001, 81(1): 79-84.
- [37] PAUKNER S, RIEDL R. Pleuromutilins: potent drugs for resistant bugs-mode of action and resistance[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2017, 7(1): a027110.
- [38] 王嘉怡, 刘宝宝, 张港琛, 李金朋, 毛晨龙, 樊擎莹, 汪洋. 亚抑菌浓度强力霉素或庆大霉素影响猪链球菌生物被膜形成和毒力因子表达的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(5): 494-499.
WANG JY, LIU BB, ZHANG GC, LI JP, MAO CL, FAN QY, WANG Y. Sub-MIC of doxycycline or gentamicin affect *S. suis* biofilm formation and virulence factors expression[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(5): 494-499 (in Chinese).
- [39] SCHILCHER K, ANDREONI F, DENGLER HAUNREITER V, SEIDL K, HASSE B, ZINKERNAGEL AS. Modulation of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix by subinhibitory concentrations of clindamycin[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(10): 5957-5967.
- [40] ROY R, TIWARI M, DONELLI G, TIWARI V. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action[J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 522-554.
- [41] HVISTENDAHL M. Public health. China takes aim at rampant antibiotic resistance[J]. *Science*, 2012, 336(6083): 795.
- [42] 中华人民共和国农业农村部. 水产养殖规范用药[J]. *中国水产*, 2022, 2022(8): 6-7.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of The People's Republic of China. Standardized drug use in aquaculture[J]. *China Fisheries*, 2022, 2022(8): 6-7 (in Chinese).
- [43] 李倩, 张玉洁, 李丹, 王甲, 王鹤佳, 郭晔. 兽用喹诺酮类药物的使用情况及药物残留检测进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(19): 51-54.
LI Q, ZHANG YJ, LI D, WANG J, WANG HJ, GUO Y. Research progress on the use of veterinary quinolones and the detection of drug residue[J]. *Heilongjiang*

- Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(19): 51-54 (in Chinese).
- [44] AVENDAÑO-HERRERA R, NÚÑEZ S, BARJA JL, TORANZO AE. Evolution of drug resistance and minimum inhibitory concentration to enrofloxacin in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated in fish farms[J]. Aquaculture International, 2008, 16(1): 1-11.
- [45] 吴亚锋, 王楠楠, 王晶晶, 方莘, 姚俊宇, 刘肖汉. 2017年和2018年江苏省水生动物气单胞菌分离鉴定及耐药分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(24): 156-162. WU YF, WANG NN, WANG JJ, FANG P, YAO JY, LIU XH. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Aeromonas* from aquatic animals in Jiangsu Province in 2017 and 2018[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(24): 156-162 (in Chinese).
- [46] 中华人民共和国农业农村部. 兽药管理条例[J]. 饲料与畜牧, 2019(1): 18-25. Ministry of Agriculture and Rural Affairs of The People's Republic of China. Regulations on the administration of veterinary drugs[J]. Animal Agriculture, 2019(1): 18-25 (in Chinese).
- [47] WEXLER HM, MOLITORIS E, FINEGOLD SM. *In vitro* activity of grepafloxacin (OPC-17116) against anaerobic bacteria[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1994, 19(2): 129-133.
- [48] 毛浩玉, 游雪甫. 喹诺酮类药物的光毒性研究进展[J]. 国外医学(药学分册), 2004, 31(4): 233-236. MAO HY, YOU XF. Research progress on phototoxicity of quinolones[J]. Foreign Medical Sciences Section on Pharmacy, 2004, 31(4): 233-236 (in Chinese).
- [49] 韩海燕, 陈力, 徐兴然, 范莉, 杨艳, 杨大成. 克林沙星酰胺衍生物的简易合成及其体内外生物活性[J]. 中国科学: 化学, 2011, 41(3): 461-473. HAN HY, CHEN L, XU XR, FAN L, YANG Y, YANG DC. Facile synthesis and *in vitro/vivo* bioactivities of amido derivatives of clinafloxacin[J]. Scientia Sinica Chimica, 2011, 41(3): 461-473 (in Chinese).
- [50] 潘建芳, 孙晓丽, 范莉, 唐雪梅, 罗鹏, 杨大成. L-高丝氨酸连接的双氢青蒿素及氟喹诺酮缀合分子研究[J]. 药学学报, 2020, 55(9): 2157-2169. PAN JF, SUN XL, FAN L, TANG XM, LUO P, YANG DC. Hybrid molecules of dihydroartemisinin with fluoroquinolones linked by L-homoserine have anti-tuberculosis and lipid-lowering effects[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2020, 55(9): 2157-2169 (in Chinese).
- [51] 王文政. 浅谈喹诺酮类抗生素的临床应用[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2020, 7(3): 14. WANG WZ. Clinical application of quinolone antibiotics[J]. Electronic Journal of General Stomatology, 2020, 7(3): 14 (in Chinese).
- [52] RUHAL R, KATARIA R. Biofilm patterns in Gram-positive and Gram-negative bacteria[J]. Microbiological Research, 2021, 251: 126829.
- [53] BUSTOS CP, MARFIL MJ, LANZA NS, GUIDA N. Estudio de la capacidad productora de biofilm en *Streptococcus equi* subsp. *equi*[J]. Revista Veterinaria, 2017, 28(1): 3.
- [54] ROMERO-GONZÁLEZ AT. Biofilm y resistencia antimicrobiana[J]. Revista Archivo Médico de Camagüey, 2020, 24(4): e7175.
- [55] BASSON A, FLEMMING LA, CHENIA HY. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates[J]. Microbial Ecology, 2008, 55(1): 1-14.
- [56] NAGAR V, SINHA V, BANDEKAR JR. Diverse profiles of N-acyl homoserine L-lactones, biofilm, virulence genes and integrons in food-borne *Aeromonas* isolates[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(8): M1861-M1870.
- [57] CHENIA HY, DUMA S. Characterization of virulence, cell surface characteristics and biofilm-forming ability of *Aeromonas* spp. isolates from fish and sea water[J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(3): 339-350.