

赖文韬, 余茂林, 姜中其. 杭州地区牛乳源大肠杆菌的分离鉴定及木糖醇联用抗菌肽对生物被膜形成的干预 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 78-83.

LAI W T, YU M L, JIANG Z Q. Isolation and identification of *Escherichia coli* from cow milk in Hangzhou and intervention of xylitol combined with antimicrobial peptides on biofilm formation [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 78-83.

## 杭州地区牛乳源大肠杆菌的分离鉴定及木糖醇联用抗菌肽对生物被膜形成的干预

赖文韬, 余茂林, 姜中其\*

(浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310058)

**摘要:** 旨在调查杭州地区牛乳源大肠杆菌的流行情况, 并探究木糖醇联用抗菌肽对引起奶牛乳房炎的大肠杆菌生物被膜形成的影响。通过麦康凯选择性培养基分离、革兰染色、生化试验、PCR 方法鉴定牛乳源大肠杆菌, 并采用刚果红平板试验和结晶紫染色法评价大肠杆菌生物被膜形成能力, 选取生物被膜形成能力强的典型菌株, 采用内置载体片法构建生物被膜, 测定木糖醇和抗菌肽联用对大肠杆菌生物被膜的最小抑菌浓度 (MBIC) 和最小杀菌浓度 (MBEC), 最后通过扫描电镜分析木糖醇联用抗菌肽对大肠杆菌生物被膜干预的影响。结果显示: 杭州地区牛乳源大肠杆菌的分离率达 49%, 其中 58.2% 以上能形成生物被膜。当抗菌肽单独使用时, MBIC 和 MBEC 较高; 联用 5% 木糖醇后, MBIC 和 MBEC 明显降低, 表明可以减少抗菌肽的用量。另外, 木糖醇和抗菌肽联用能明显降低生物被膜的形成, 并且 5% 木糖醇能增强抗菌肽 1037 的杀菌作用。本研究表明, 联用木糖醇和抗菌肽可能是一种有效的控制奶牛乳房炎的方法。

**关键词:** 奶牛; 大肠杆菌; 生物被膜; 木糖醇; 抗菌肽; 联合应用

中图分类号: S859.7 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)04-0078-06

## Isolation and identification of *Escherichia coli* from cow milk in Hangzhou and intervention of xylitol combined with antimicrobial peptides on biofilm formation

LAI Wentao, YU Maolin, JIANG Zhongqi\*

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** This study was to investigate the prevalence of bovine milk-derived *Escherichia coli* in the Hangzhou area and to investigate the effect of xylitol combined with antimicrobial peptides on the biofilm formation of *E. coli* causing mastitis in dairy cows. The biofilm formation ability of *E. coli* was evaluated by Congo red plate test and crystalline violet staining. Finally, the effect of xylitol in combination with antimicrobial peptides on *E. coli* biofilm intervention was analyzed by scanning electron microscopy. The results showed that 49% of bovine milk-derived *E. coli* were isolated in the Hangzhou area, of which more than 58.2% were able to form biofilms. When the antimicrobial peptide was used alone, its MBIC and MBEC were higher. However, when combined with 5% xylitol, its MBIC and MBEC were significantly lower; and therefore, the dosage of the antimicrobial peptide could be reduced. In addition, the combination of xylitol and antimicrobial peptide significantly reduced the formation of biofilm, and 5% xylitol enhanced the bactericidal effect of antimicrobial peptide 1037. In conclusion, the combination of xylitol and antimicrobial peptides might be an effective method for controlling mastitis in dairy cows.

**Keywords:** dairy cow; *Escherichia coli*; biofilm; xylitol; antimicrobial peptides; combined application

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是一种常见的奶牛乳房炎病原体, 可导致奶牛产奶量减少、乳品质下降以及提高淘汰率、死亡率。该菌主要的毒力因子脂多糖 (LPS) 可以引发内毒素休克和免疫反应, 促进炎

症因子的表达并影响抗菌药物的功效<sup>[1]</sup>。此外, 大肠杆菌通过形成生物被膜 (BBF) 加强了对宿主免疫系统 and 抗菌药物的耐受性<sup>[2]</sup>。因此, 研究新的治疗办法十分必要。

木糖醇是一种天然的五碳糖醇, 具有许多优良的特性, 包括能够替代蔗糖作为天然的甜味剂以及防止龋齿等<sup>[3]</sup>。在畜牧业中, 木糖醇可用于治疗奶牛酮病<sup>[4-5]</sup>, 促进免疫应激状态下肉鸡生长<sup>[6-7]</sup>等。有研究显示, 木糖醇能够抑制许多病原菌的生长和附着,

收稿日期: 2023-04-10; 修回日期: 2024-02-20

基金项目: 浙江省科技厅基金公益项目 (LGN21C180004)

第一作者: 赖文韬, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 姜中其, 博士, 副教授, 研究方向为兽医药理学,

E-mail: zqjiang@zju.edu.cn.

如大肠杆菌、链球菌、金黄色葡萄球菌和沙门菌等<sup>[8]</sup>，不仅能干预生物被膜的形成，而且也能破坏已经成熟的生物被膜<sup>[9]</sup>。抗菌肽 (AMPs) 是一种小分子多肽类生物活性物质，是宿主先天性免疫防御系统的重要组成部分。抗菌肽带正电荷，能够与 LPS 静电结合并破坏细胞膜的完整性。研究表明，某些抗菌肽具有抗生物被膜的特性，能够破坏生物被膜并防止其形成。抗菌肽带正电荷，能够与脂多糖静电结合并破坏细胞膜的完整性<sup>[10]</sup>。通过比较一系列具有抗 BBF 活性的 AMPs，筛选出抗菌肽 1037 (KRFRIRVRV)，研究表明，其抗 BBF 活性最强，在低浓度 (1/2 MIC) 下，能使 BBF 形成减少 78%<sup>[11]</sup>。

本试验分析木糖醇联用抗菌肽 1037 对大肠杆菌生物被膜最小抑菌浓度 (MBIC) 和最小杀菌浓度 (MBEC) 的影响，并进一步探究 2 种药物联合应用对大肠杆菌生物被膜的作用。研究结果可为临床治疗大肠杆菌引起的奶牛乳房炎及耐药性的控制提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与试剂

木糖醇 (USP grade, 批号: XB0997), 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 抗菌肽 1037 (氨基酸序列为: KRFRIRVRV, 通过标准固相方法合成, 反相高效液相层析检测纯度均为 99% 以上), 吉尔生化生物科技有限公司; 血琼脂平板、刚果红、结晶紫, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Luria-Bertani (LB) 肉汤培养基、Nutrient Broth (NB) 琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基、肠杆菌科细菌生化试验管, 杭州滨河微生物试剂有限公司; 乙醇、戊二醛、钼酸, 国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 主要仪器设备

卡尔加里生物被膜发生装置, 光景生物科技 (苏州) 有限公司; 聚氯乙烯 (PVC) 薄片, 迎佳橡胶绝缘材料厂; ZEISS Gemini SEM 300 场发射扫描电子显微镜, 卡尔蔡司 (上海) 管理有限公司; Hitachi HCP-2 型临界点干燥仪, 日本日立公司。

### 1.3 菌株分离鉴定

采集杭州地区近江、富伦、正兴等 6 个规模较大的奶牛场奶样共 200 份, 划线接种于血琼脂平板, 37 °C 培养 24 h, 再挑取单菌落至麦康凯平板, 37 °C 培养 24 h; 挑取麦康凯平板上的单菌落革兰染色后镜检, 同时进行生化试验。之后采用 PCR 法鉴定大肠杆菌, 根据文献报道的 PCR 引物<sup>[12]</sup>, 引物序列为 F: 5'-ATCAACCGAGATTCCCCAGT-3', R: 5'-TCAC-TATCGGTCAGTCAGGAG-3', 扩增目标条带 232 bp,

引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

### 1.4 药液配制

取抗菌肽溶于无菌去离子水, 配制成 4 098  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的储备液; 取木糖醇溶于 LB 肉汤, 配制成 5% 的储备液, 121 °C 高温高压灭菌后冷却备用。

### 1.5 菌悬液制备

将大肠杆菌接种于 LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养 12 h, 调整浓度为 0.5 个麦氏浊度, 作为生物被膜待接种菌悬液备用。

### 1.6 生物被膜形成能力的测定

#### 1.6.1 刚果红 (CRA) 定性检测

将菌悬液划线接种于刚果红琼脂平板 37 °C 培养 24 h, 置室温 72 h, 观察菌落的颜色和形态。粗糙、干燥、水晶样的黑色菌落判定为被膜阳性菌株; 红色光滑型菌落为生物被膜阴性菌株。

#### 1.6.2 结晶紫 (SQAA) 半定量检测

将菌悬液加入卡尔加里生物被膜发生装置平板的孔中, 以 LB 肉汤为阴性对照, 37 °C 培养 48 h; 将平板中液体移除, 无菌生理盐水充分漂洗除去浮游菌, 室温干燥后用 95% 乙醇固定 5 min; 再用 1% 结晶紫染色 5 min; 用灭菌生理盐水漂洗除去剩余的染液; 再用 35% 乙醇脱色 30 min, 释放钉柱板上生物被膜中的结晶紫; 测定 570 nm 波长处的吸光值。重复 3 次, OD 值取 3 组平均值。OD<sub>570 nm</sub>  $\geq 0.1$  的为生物被膜阳性菌株, OD<sub>570 nm</sub>  $< 0.1$  的为生物被膜阴性菌株。

### 1.7 MBIC 的测定

选择 CRA 与 SQAA 检测中均呈现生物被膜阳性的大肠杆菌临床分离株 ZX-45, 参考虞惠贞<sup>[9]</sup>的方法, 进行 MBIC、MBEC 的测定以及药物干预生物被膜试验。

①取生物被膜待接种菌液, 200  $\mu\text{L}$ /孔加入 MBEC 发生装置板的 96 孔里, 共加入 2 排, 盖上钉柱盖, 37 °C 静置培养 24 h, 培养生物被膜; ②弃去培养液, 用无菌生理盐水小心冲洗钉柱盖的钉子, 除去浮游菌; ③另取 1 块新的 MBEC 发生装置板, 第 1 排每孔加入 100  $\mu\text{L}$  无菌 LB 培养基, 取 100  $\mu\text{L}$  抗菌肽加入第 1 孔, 混合均匀后, 连续 2 倍倍比稀释至第 12 孔, 使每孔抗菌肽浓度为 1~2 048  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 第 2 排孔加入 100  $\mu\text{L}$  无菌 5% 木糖醇-LB 培养基, 取 100  $\mu\text{L}$  抗菌肽同法稀释, 使每孔抗菌肽浓度为 1~2 048  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; ④将冲洗好的钉柱盖盖到加有药品的 MBEC 发生装置板上, 37 °C 静置培养 24 h; ⑤肉眼观察 MBEC 发生装置板, 培养液澄清无菌生长的孔最低稀释度药物浓度为 MBIC。

## 1.8 MBEC 的测定

从 MBEC 板上表现澄清未长菌的孔里, 每孔吸取 100  $\mu\text{L}$  培养液涂于 NB 琼脂培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 平板菌落数小于 5 的最低稀释度作为 MBEC。

## 1.9 木糖醇和抗菌肽对成熟大肠杆菌干预的扫描电镜观察

### 1.9.1 生物被膜的培养

①取 12 孔细胞培养板, 放入 PVC; ②取 3 mL 大肠杆菌菌悬液加入 4 孔, 另外 1 孔加入 3 mL 无菌 LB 液体培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h; ③另取 1 块新的 12 孔细胞培养板, 分别向对应孔里加入 3 mL 无菌液体 LB 培养基, 3 mL 5% 木糖醇-LB 培养基, 3 mL 抗菌肽-LB 培养基 (浓度为 MBIC), 3 mL 抗菌肽-5% 木糖醇 LB 培养基 (浓度为 MBIC); ④将步骤②中培养的 PVC 薄片用无菌镊子取出, 生理盐水冲洗正反面, 然后正面朝上, 放入步骤③中加有新培养基的 12 孔细胞培养板里, 将步骤②中加无菌液体培养基作对照培养的 PVC 板放入步骤③的无菌液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 培养 24 h。

### 1.9.2 扫描电镜观察的前处理

取 1 块新的 96 孔板, 每孔加入 3 mL 2.5% 戊二醛; 取出 PVC 薄片, 正面朝上, 放入戊二醛里, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 过夜固定; 按扫描电镜要求进行处理后, 在 Hitachi HCP-2 型临界点干燥仪中进行干燥、镀膜, 最后在 ZEISS Gemini SEM 300 场发射扫描电子显微镜观察。

## 2 结果

### 2.1 细菌分离鉴定

从 200 份乳房炎奶样中共分离出 303 株细菌, 经麦康凯培养基选择性培养、革兰染色、生化试验以及 PCR, 鉴定出大肠杆菌 98 株。麦康凯培养基上分离出的菌落边缘整体成圆形、粉红色 (图 1); 革兰染色镜检呈两端钝圆、散在或成对存在、红色的革兰阴性直短杆菌 (图 2); 生化试验结果见表 1, 除尿素、苯丙氨酸、枸橼酸盐及硫化氢呈阴性外, 其余均呈阳性, 符合大肠杆菌生化特性; PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳见图 3, 阳性对照和所有临床分离株均扩增出 232 bp 的目标条带, 而阴性对照未见任何条带。

### 2.2 大肠杆菌生物被膜形成能力的测定

大肠杆菌生物被膜形成能力测定结果如图 4 所示, 根据刚果红平板观察 (图 5), 98 株临床分离株中, 生物被膜阳性菌株有 57 株, 生物被膜阴性菌株有 41 株。根据  $OD_{570\text{ nm}}$  测定结果, 生物被膜阳性菌株有 67 株, 生物被膜阴性菌株有 31 株。



图 1 分离菌落形态 (麦康凯琼脂平板)

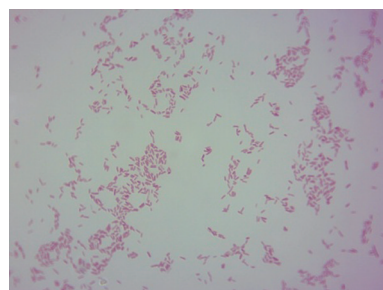
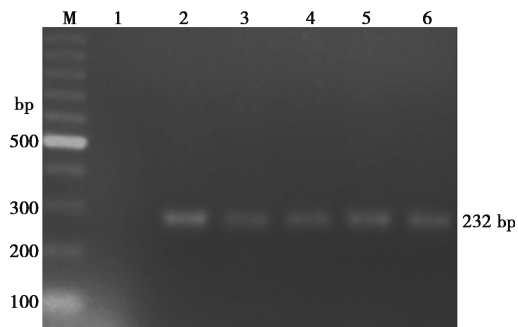


图 2 革兰染色镜检形态 (400 $\times$ )

表 1 分离菌株生化特性鉴定结果

生化项目	结果	生化项目	结果
葡萄糖	+	靛基质	+
木糖	+	尿素	-
山梨醇	+	苯丙氨酸	-
赖氨酸脱羧酶	+	枸橼酸盐	-
鸟氨酸脱羧酶	+	硫化氢	-

注: +表示阳性, -表示阴性。



M. DNA 标准 DL1000; 1. 阴性对照; 2. 阳性对照; 3~6. 分离菌株。

图 3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

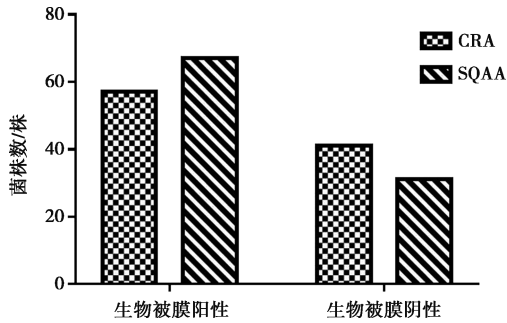
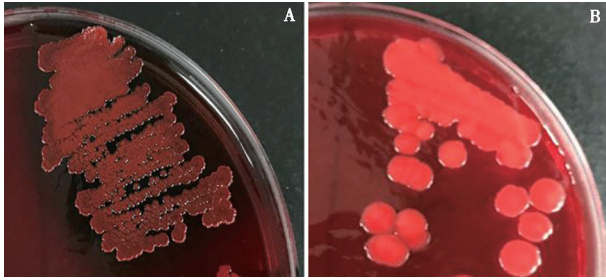


图4 大肠杆菌生物被膜形成能力



A. 生物被膜阳性菌株; B. 生物被膜阴性菌株。

图5 刚果红定性检测结果

### 2.3 木糖醇和抗菌肽对成熟大肠杆菌生物被膜的MBIC和MBEC

抗菌肽 1037 对大肠杆菌分离株 ZX-45 生物被膜的 MBIC 为  $512 \mu\text{g}/\text{mL}$ , MBEC 大于  $2\ 048 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; 抗菌肽-5% 木糖醇对大肠杆菌分离株生物被膜的

MBIC 为  $32 \mu\text{g}/\text{mL}$ , MBEC 为  $512 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

抗菌肽 1037 对大肠杆菌生物被膜单独作用的 MBIC 和 MBEC 相对较高, 但是结合 5% 木糖醇以后, 其 MBIC 和 MBEC 都明显降低。

### 2.4 木糖醇和抗菌肽对成熟大肠杆菌生物被膜干预的扫描电镜观察

通过图 6 的观察可知, 空白对照组中的大肠杆菌数量较多, 且表面覆盖了黏稠的膜状物, 提示其形成了明显的生物被膜。在 5% 木糖醇处理组中, 在低倍镜下可见大肠杆菌数量有轻微减少, 高倍镜下见菌体表面的膜状物较空白对照组稍薄, 菌体间呈现出丝状连接的特点。在抗菌肽处理组中, 细菌数量较空白对照组和 5% 木糖醇处理组明显减少, 且菌体的短杆形态基本正常, 表面没有黏稠的生物被膜覆盖, 菌体间呈现出丝状连接的特点, 甚至可见部分被破坏的菌体。在 5% 木糖醇联用抗菌肽处理组中, 细菌数量较空白对照组和 5% 木糖醇处理组明显减少, 表面没有黏稠的生物被膜覆盖, 丝状连接较抗菌肽处理组明显减少, 菌体变形严重, 呈现出短球状、长杆状、杆状等不同形态, 且可见裂解的菌体碎片。

综上所述可以得出以下结论: 木糖醇和抗菌肽联用能够减少大肠杆菌的数量并破坏生物被膜的形成, 其中抗菌肽能够更有效地抑制大肠杆菌的数量, 并且能够破坏菌体表面的生物被膜。同时, 联用处理还可能导致大肠杆菌菌体的形态变化和菌体碎片的产生。

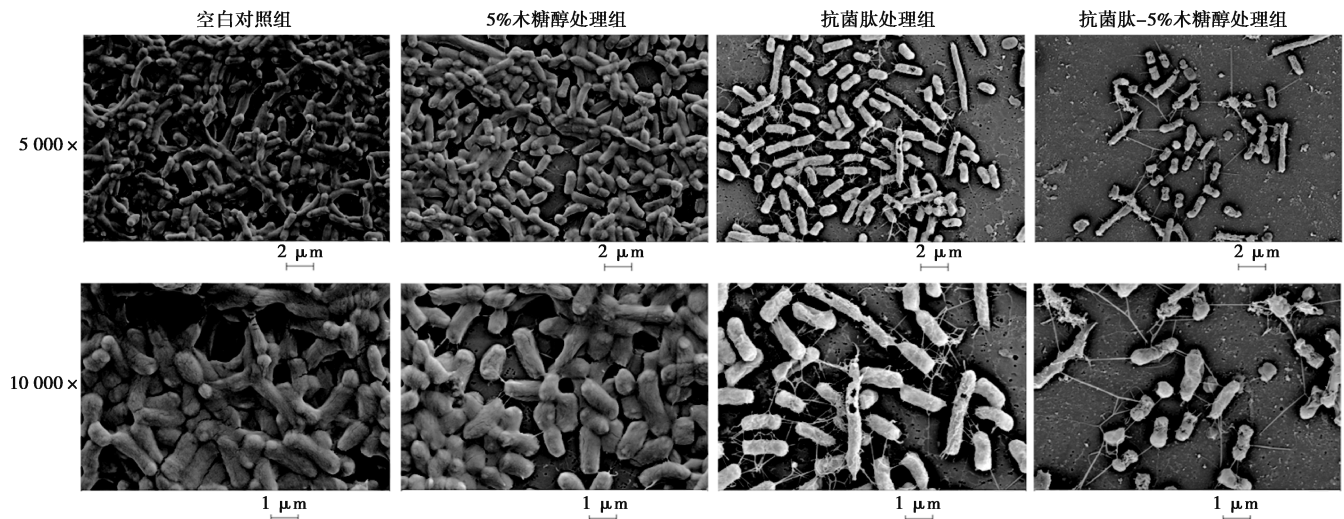


图6 大肠杆菌生物被膜扫描电镜观察

## 3 讨论

大肠杆菌广泛存在于奶牛的体表和环境中, 是引

起奶牛乳房炎的主要环境性致病菌。在早先的研究中, Yu 等<sup>[13]</sup>收集了我国 4 个地区的 750 份来自乳房炎病例的牛源奶样, 大肠杆菌分离率为 11.1%。廖

智慧等<sup>[14]</sup>报道,衡水地区乳源大肠杆菌的分离率为33.3%,而本研究发现杭州地区的乳源大肠杆菌分离率高达49%,高于之前的报道。此外,我们还发现大肠杆菌在杭州地区的奶牛群体中的流行率为32.2%,高于陕西省西安、杨凌、宝鸡和咸阳地区的流行率(15.8%)<sup>[15]</sup>,但低于河北规模化奶牛场的流行率(64.28%)<sup>[16]</sup>。李芬等<sup>[17]</sup>从患乳房炎的牛奶样中分离的35株大肠杆菌发现,BBF阳性率为54.29%,本试验测得临床分离的大肠杆菌中有58.2%为BBF阳性菌株,与该报道结果接近。此次研究对大肠杆菌的流行情况以及BBF形成能力进行了更深入地了解。

近年来,细菌性奶牛乳房炎治疗越来越困难,细菌耐药性的产生是主要原因之一,而BBF形成又为细菌的生存提供了一层保障,为疾病的治疗增加了难度。抗菌肽是宿主先天性免疫防御系统产生的一类抵抗外界病原体感染的小分子多肽类生物活性物质,具有一定的抗菌作用以及抗生物被膜作用<sup>[18-20]</sup>。天然抗菌肽通常是由12~60个氨基酸组成的小分子阳离子多肽<sup>[21]</sup>,Fuente-Núñez等<sup>[11]</sup>发现一系列具有抗BBF活性的抗菌肽,一级结构中均有序列(FRIRVRV),以此为基础合成了仅由9个氨基酸组成的抗菌肽1037(KRFRIRVRV),在保持其抗BBF活性的情况下,尽量减少了肽的大小,研究显示,抗菌肽1037能显著减少革兰阴性(铜绿假单胞菌、洋葱伯克霍尔德菌)和革兰阳性(李斯特菌)细菌BBF形成。本研究表明,抗菌肽1037能明显减少大肠杆菌BBF形成,体现出的抗BBF作用与以上结果相一致,抗菌肽1037与其他具有抗菌特性的药物联用有一定的开发前景。

此外,本研究发现5%木糖醇联用抗菌肽1037在降低大肠杆菌对抗菌肽1037耐药性方面具有协同作用。与单独使用抗菌肽1037相比,联用后的抗菌效果明显增强,菌体的丝状连接更少,菌体严重变形甚至破裂,呈现出短球状、长杆状、杆状等不同形态。虞惠贞<sup>[9]</sup>研究发现,5%木糖醇联用环丙沙星和恩诺沙星后,同样可以显著降低抗菌药物MBIC以及MBEC。有研究指出,木糖醇可以扩散到BBF内部,积累形成一种有毒的非代谢糖醇磷酸,从而抑制细菌生长或者BBF中应激蛋白的产生,表现出明显的抗BBF活性<sup>[22-24]</sup>。由于抗菌肽作用方式与常规抗生素不同,其靶向细菌膜,产生膜不稳定或形成穿膜孔,最终导致细胞破裂<sup>[25]</sup>。因此,在联用抗生素时,抗菌肽1037有可能促进抗生素进入细菌细胞,增强其杀菌效果。如宁亚维等<sup>[26]</sup>研究发现,抗菌肽brevilatin与柠檬酸可通过破坏细胞膜的完整性与降解菌体

DNA以发挥协同抑制大肠杆菌的作用。

总之,本研究发现大肠杆菌在杭州地区奶牛乳房炎病例中分离率和BBF阳性率较高,抗菌肽1037能够明显减少大肠杆菌对生物被膜的形成,而5%木糖醇能够协同增强抗菌肽1037对细菌的杀菌作用并破坏已形成的生物被膜。联用抗菌肽和木糖醇或其他抗生素,有望用于临床上大肠杆菌引起的奶牛乳房炎治疗及生物被膜的清除。此外,抗菌肽1037是否通过破坏细菌细胞膜为木糖醇进入细菌创造了条件,值得进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] ZAATOUT N. An overview on mastitis-associated *Escherichia coli*: pathogenicity, host immunity and the use of alternative therapies [J]. *Microbiol Res*, 2022, 256: 126960.
- [2] SHARMA G, SHARMA S, SHARMA P, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies [J]. *J Appl Microbiol*, 2016, 121 (2): 309-319.
- [3] JANAKIRAM C, KUMAR C V D, JOSEPH J. Xylitol in preventing dental caries: a systematic review and meta-analyses [J]. *J Nat Sci Biol Med*, 2017, 8 (1): 16.
- [4] SAKAI T, HAMAKAWA M, KUBO S. Glucose and xylitol tolerance tests for ketotic and healthy dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 1996, 79 (3): 372-377.
- [5] MIZUTANI H, SAKO T, TOYODA Y, et al. The intravenous xylitol tolerance test in non-lactating cattle [J]. *Vet Res Commun*, 2003, 27: 633-641.
- [6] TAKAHASHI K, KAWAMATA K, AKIBA Y. Effect of xylitol feeding on antibody production and inflammatory responses in broiler chicks [J]. *J Poult Sci*, 2005, 42 (3): 245-253.
- [7] TAKAHASHI K, MASHIKO T, AKIBA Y. Effect of dietary concentration of xylitol on growth in male broiler chicks during immunological stress [J]. *Poult Sci*, 2000, 79 (5): 743-747.
- [8] 刘丽. 木糖醇对动物源常见病原菌的抗菌作用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [9] 虞惠贞. 猪源致病性大肠杆菌生物膜建模及常用抗菌药物和木糖醇对生物膜的体外作用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [10] BROWN K, POON G, BIRKENHEAD D, et al. Host defense peptide LL-37 selectively reduces proinflammatory macrophage responses [J]. *J Immunol*, 2011, 186 (9): 5497-5505.
- [11] FUENTE-NÚÑEZ C D L, KOROLIK A V, BAINS B M, et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56 (5): 2696-2704.
- [12] 张静, 姜中其, 虞惠贞, 等. 腹泻仔猪病原性大肠埃希菌毒力因子分布与耐药性分析 [J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2013, 39 (1): 98-104.
- [13] YU Z N, WANG J, HO H, et al. Prevalence and antimicrobial-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* isolated from raw milk samples from mastitis cases in four regions of China [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 22: 94-101.

- [14] 廖智慧, 陈志军, 李晓, 等. 衡水地区奶牛乳房炎源大肠杆菌分离鉴定、血清型及耐药性分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018 (2): 107-108.
- [15] 赵秋云. 中药对临床型奶牛乳房炎源大肠杆菌的体外抑制及耐药消除研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [16] 刘鑫雅, 李丹阳, 赵利梅, 等. 河北省规模奶牛场夏季乳房炎致病菌感染情况分析 [J]. 中国奶牛, 2017 (7): 43-45.
- [17] 李芬, 范玉堂, 王丽娟, 等. 牛乳源大肠杆菌生物被膜形成及抗生素的作用 [J]. 西北农业学报, 2020, 29 (7): 983-989.
- [18] 张炜, 杭柏林, 司素锦, 等. 抗菌肽 BSN-37 的抑菌活性及其稳定性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46 (1): 287-295.
- [19] 杨磊, 杭柏林, 徐彦召, 等. 牛源抗菌肽 BSN-37 的生物活性 [J]. 中国兽医学报, 2018 (11): 2088-2093.
- [20] SHAMS K R, SHAHBAZZADEH D, HARZANDI N, et al. Kinetic study of antimicrobial peptide, melittin, in simultaneous biofilm degradation and eradication of potent biofilm producing MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolates [J]. *Int J Pept Res Ther*, 2019, 25 (1): 329-338.
- [21] 黎观红, 洪智敏, 贾永杰, 等. 抗菌肽的抗菌作用及其机制 [J]. 动物营养学报, 2011, 23 (4): 546-555.
- [22] ICHIKAWA T, YANO Y, FUJITA Y, et al. The enhancement effect of three sugar alcohols on the fungicidal effect of benzethonium chloride toward *Candida albicans* [J]. *J Dent*, 2008, 36 (11): 965-968.
- [23] ALVES F R F, NEVES M A S, SILVA M G, et al. Antibiofilm and antibacterial activities of farnesol and xylitol as potential endodontic irrigants [J]. *Braz Dent J*, 2013, 24: 224-229.
- [24] GASMI BENAHMED A, GASMI A, ARSHAD M, et al. Health benefits of xylitol [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104: 7225-7237.
- [25] 葛琳, 刘晓志, 高健, 等. 抗菌肽抗菌机制及与抗生素协同作用的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43 (12): 1474-1481.
- [26] 宁亚维, 苏丹, 付浴男, 等. 抗菌肽 brevilaterin 与柠檬酸联用对大肠杆菌的协同抑菌机理 [J]. 食品科学, 2020, 41 (19): 31-37.