

乳酸链球菌素与大黄联合作用对牛源致病性 *Escherichia coli* O₇₈ 的抑菌作用

张燕¹ 敖日格乐^{1*} 王纯洁² 姜晶¹ 赵称赫¹ 曹晓波¹

(1. 内蒙古农业大学 动物科技学院, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古农业大学 兽医学院, 呼和浩特 010018)

摘要 为研究乳酸链球菌素(nisin)和大黄联合药效对牛源致病性大肠杆菌的抑菌作用,通过二倍稀释法测定nisin、大黄、抗生素及联合用药的最小抑菌浓度(MIC);微板法测定各药物MIC剂量下致病性大肠杆菌的生长曲线、碱性磷酸酶(AKP)以及总蛋白含量。结果表明:1)nisin单独使用对*Escherichia coli* O₇₈无抑菌效果;大黄单独使用时MIC为62.5 mg/mL,抗生素的MIC为0.016 mg/mL,nisin和大黄联合使用MIC分别为0.333和10.417 mg/mL。2)大黄和nisin联合药效,能够有效抑制*E. coli* O₇₈的生长,缩短对数期,效果优于大黄组($P < 0.05$),仅次于抗生素组($P < 0.05$)。3)nisin和大黄联合使用对*E. coli* O₇₈的细胞壁和细胞膜有很强的破坏性,导致AKP和菌体总蛋白指数的升高,效果显著优于抗生素、大黄($P < 0.05$)。由此可见,大黄和nisin联合作用*E. coli* O₇₈时,杀菌效果高于抗生素、大黄,抑菌效果高于大黄,但低于抗生素。

关键词 乳酸链球菌素;大黄;联合作用;抑菌机理;*E. coli* O₇₈;最小抑菌浓度

中图分类号 S 852.61+2

文章编号 1007-4333(2016)07-0092-06

文献标志码 A

Study on the antibacterial mechanism of nisin combined with rhubarb on bovine pathogenic *Escherichia coli* O₇₈

ZHANG yan¹, AO-ri-ge-le^{1*}, WANG Chun-jie², JIANG Jing¹, ZHAO Chen-he¹, CAO Xiao-bo¹

(1. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. College of Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract The purpose of this study was to study the antibacterial mechanism of nisin combined with rhubarb on bovine pathogenic *Escherichia coli* O₇₈. Nisin, rhubarb, combination drugs and antibiotic were determined by two times dilution method to measure minimum inhibitory concentration (MIC). The growth curves, AKP and protein contents of MIC dose of the drug were determined by the method of micro plate. The results showed that: 1) Nisin alone has no effect on *E. coli* O₇₈; rhubarb alone MIC was 62.5 mg/mL, antibiotic MIC was 0.016 mg/mL, combination MIC of nisin and rhubarb were 0.333 and 10.417 mg/mL. 2) Rhubarb combined with nisin could effectively inhibit the growth of *E. coli* O₇₈, shortened the logarithmic phase and the effects were better than rhubarb groups ($P < 0.05$), but second only to antibiotic groups ($P < 0.05$). 3) The combination of nisin and rhubarb had strong destructive effects on the cell wall and cell membrane of *E. coli* O₇₈, which led to the increase of AKP and total protein index, and the effects were significantly better than antibiotic groups and rhubarb groups ($P < 0.05$). The combination effect of rhubarb and nisin against *E. coli* O₇₈, the germicidal efficacy was higher than antibiotics and rhubarb; and the antibacterial effect was higher than rhubarb and lower than antibiotic.

Keywords nisin; rhubarb; combination effect; antibacterial mechanism; *Escherichia coli* O₇₈; minimum inhibitory concentration

收稿日期: 2015-09-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060318,31260570); 国家科技支撑项目(2012BAD12B09-3)

第一作者: 张燕, 硕士研究生, E-mail: Corber0710@163.com

通讯作者: 敖日格乐, 教授, 博士生导师, 主要从事牛生产学与产品品质研究, E-mail: aori6009@163.com

乳酸链球菌素(nisin)属乳酸乳球菌乳酸亚种,在发酵过程中通过核糖体合成机制产生的一种多肽抗菌类物质。它作为一种天然、无毒副作用的杀菌物质具有独特的优势,但抑菌作用却存在一定的局限性。据研究表明^[1],nisin的抗菌谱较窄,只对革兰氏阳性菌有杀灭作用,而对革兰氏阴性菌及酵母、霉菌等无效。但有研究证实^[2],nisin经过一些特殊处理后,对沙门杆菌、大肠杆菌等革兰氏阴性菌具有明显的抑菌作用。苏迅^[3]研究表明大黄素与大黄酸是蒽醌类化合物,其抑菌机制是抑制细菌的呼吸,进而影响蛋白质以及核酸的合成过程。常明向等^[4]报道,大黄素对大肠杆菌具有较强的抑菌能力,与此同时降低了大肠杆菌内毒素的释放,并且在临床上对内毒素血症的治疗具有较好的效果。大黄素破坏大肠杆菌的细胞壁以及细胞膜,细胞壁防御机能丧失,细胞膜内的一些大分子物质外泄,细胞膜自身的运输功能发生改变,对信息的跨膜传递产生阻碍作用。目前,由致病性大肠杆菌所引发的各类疾病通常采用抗生素治疗,但是抗生素的滥用会引起动物的免疫力降低和畜产品药物残留量增多等问题^[5]。因此,人们开始寻找绿色环保型新产品,望其替代抗生素。蒙药大黄对革兰氏阴性大肠杆菌体外抑菌效果明显,它的根和茎,具有泻下功效^[6];但长期或大量使用时泻下作用明显,对由致病性大肠杆菌引起的疾病达不到很好的治疗效果。nisin和大黄单独使用,对一些菌群有很好地抑菌效果,而在两者联合用药方面还未见相关报道,本研究通过体外试验研究nisin与大黄两者联合作用效果,弥补二者单独使用时的不足,具有重要的现实意义和经济意义。通过对nisin和大黄联合用药抑菌机理的研究,旨在拓宽nisin抑菌谱,寻找抗生素替代品,开发新型绿色环保型药物;并且减少大黄用量,克服高剂量大黄引起的泻下,降低药物残留,为畜牧工作者治疗由大肠杆菌引起的疾病提供理论指导和科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

受试菌:牛源致病性 *Escherichia coli* O₇₈ 是由内蒙古农业大学动物生产学实验室从奶牛直肠粪样中分离纯化提取。

乳酸链球菌素(nisin):购自北京酷来博科技有限公司,现用现配。

抗生素:头孢拉定,上海现代制药股份有限公司。

大黄药液的制备:称取大黄 50 g 放入过滤袋,置于 500 mL 蒸馏水,室温浸泡过夜,煮沸 1.5 h,过滤药液,滤渣加 250 mL 水,煮沸 1 h 过滤,2 次药液小火浓缩至 50 mL(即药液中所含生药量为 1 g/mL),121 °C 灭菌,4 °C 保存备用^[7]。

TTC(氯化三苯四氮唑)溶液配制:0.01 g TTC,0.04 g 琥珀酸钠,用 2 mL 生理盐水混匀。TTC 购自上海经科化学科技有限公司。

碱性磷酸酶(AKP):购自南京建成生物工程研究所。

1.2 试验仪器

全自动立式电热压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;恒温培养箱(JC-SPJ-480),济南精诚实验仪器有限公司;净化工作台,上海新苗医疗器械制造有限公司;电子分析天平(CP224C),上海奥豪斯仪器有限公司;酶标仪(Synergy HT),上海迭戈生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌液制备

使用前将 4 °C 营养琼脂斜面保存的 *E. coli* O₇₈ 接种于肉汤中,37 °C 培养至对数期 18~24 h,调整指示菌为 1×10^7 cfu/mL。

1.3.2 单独用药 MIC 测定

采用二倍稀释法,将 nisin(10 mg/mL)、大黄(1 g/mL)、抗生素(0.5 mg/mL)用肉汤依次二倍稀释,分别稀释 11 个梯度,加入 96 孔板的前 11 个孔,每孔加入 200 μ L,随后接入对数期大肠杆菌 50 μ L,菌数为 10^7 cfu/mL。第 12 孔加入 200 μ L 肉汤和 50 μ L 纯菌液作为空白对照。37 °C 培养 18 h 后,加入配制好的 TTC 5 μ L,2 h 后观察染色变化,试验组加入染色剂后没有被染为红色的最低药物浓度组,即为该药物的 MIC。

1.3.3 联合用药 MIC 测定

采用微量棋盘法,将乳酸链球菌素(5 mg/mL)和大黄(1 g/mL)分别进行二倍稀释,稀释 8 个浓度,nisin 纵向加入 96 孔板,大黄横向加入 96 孔板,接入对数期大肠杆菌,调整细菌数为 10^7 cfu/mL,37 °C 培养 18 h,加入配制好的 TTC 5 μ L,2 h 后观察染色变化,试验组加入染色剂后没有被染为红色的最低药物浓度组,即为联合用药的 MIC。

1.3.4 nisin 与大黄联合作用对 *E. coli* O₇₈ 生长曲线的影响

用肉汤配制 5 mL MIC 药物,加入 200 μ L

E. coli O₇₈ 菌悬液(约 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL), 设定无药物的纯菌液为空白对照, nisin 和大黄 MIC 为试验组, 大黄 MIC 为阴性对照组, 抗生素 MIC 为阳性对照, 37 °C, 110 r/min 连续培养 24 h, 培养期间每隔 2 h 取样 1 次, 酶标仪测定 OD₆₃₀ 值, 每次重复 3 次, 取平均值绘制生长曲线。

1.3.5 AKP 的测定

吸取等体积的菌液(1×10^7 cfu/mL)和无菌药液(MIC)进行混合, 然后 37 °C, 150 r/min 条件下进行培养, 培养 0、1、2、3、4、5 和 6 h 将菌悬液在 3 500 r/min 条件下离心 10 min, 根据碱性磷酸酶 AKP 试剂盒说明测定 OD₅₂₀ 条件下各个培养液中 AKP 含量, 最终根据 AKP 含量的变化来反映药物对 *E. coli* O₇₈ 细胞壁的影响情况, 每组试验重复 3 次, 取平均值绘制生长曲线。

1.3.6 菌体总蛋白含量的测定

将培养至对数期 *E. coli* O₇₈ ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cfu/mL) 纯菌液加入含有抗生素、大黄、大黄和

nisin 的 MIC 肉汤后, 采用考马斯亮蓝 G-250 法测定 0、3、6 和 9 h 时培养液的蛋白含量, 同时设不含药物的菌体培养液作为空白对照。

1.4 数据统计

应用 Excel 软件对测定数据进行处理和分析; 采用 SAS 9.0 软件对数据进行方差分析, 试验数据用“平均数±标准差”表示, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 MIC 测定结果与分析

由表 1 可知, nisin 和大黄单独使用时, nisin 对 *E. coli* O₇₈ 的没有抑菌效果, 而大黄对 *E. coli* O₇₈ 的 MIC 为 62.5 mg/mL, 抗生素 MIC 为 0.016 mg/mL, 大黄和 nisin 联合使用时, nisin 和大黄的 MIC 分别为 10.417 和 0.333 mg/mL, 添加 nisin 联合用药不仅明显降低了大黄的使用量, 而且提高大黄的抑菌效果。

表 1 各类药物 MIC

Table 1 MIC of different drugs

项目 Item	单独用药 Single-drug groups			联合用药 Combined-drug groups	
	nisin	抗生素 Antibiotics	大黄 Rhubarb	nisin	大黄 Rhubarb
MIC/(mg/mL)	*	0.016	62.500	0.333	10.417

注: “*”表示没有最小抑菌浓度。

Note: “*” represents no minimum inhibitory concentration.

2.2 不同药物对 *E. coli* O₇₈ 生长曲线的影响

以正常大肠杆菌为对照组, 其正常生长曲线呈 S 形。由图 1 可知, 0~2 h 是菌体生长的延滞期, 从 2 h 起菌体开始进入生长的对数期, 8~20 h 大肠杆菌缓慢生长, 20 h 后 *E. coli* O₇₈ 生长进入稳定期。加入 MIC 的药液后, 与空白对照组相比, nisin 组生长曲线未发生明显的变化; 其余用药组均发生明显变化。由表 2 可见, 4 h 时, 大黄组、联合用药组抑菌效果显著高于 nisin 组、空白对照组 ($P < 0.05$), 显著低于抗生素组 ($P < 0.05$)。大黄组与联合用药组开始出现显著性差异是在 14 h ($P < 0.05$)。

由图 1 可见, 抗生素组抑菌能力最强, 在测定时间内各个时期都能抑菌。被 nisin 和大黄作用后的 *E. coli* O₇₈, 0~10 h 缓慢生长, 对数期明显缩短, *E. coli* O₇₈ 生长直接进入稳定期。大黄单独使用组, 只在延滞期有明显抑菌作用, 随着时间延长抑菌效

果低于联合用药组。

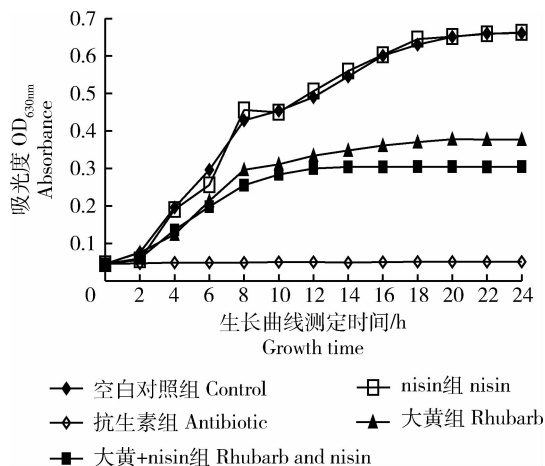


图 1 不同药物对 *E. coli* O₇₈ 生长曲线的影响

Fig. 1 Effects of different drugs on the growth curve of *E. coli* O₇₈

表 2 不同药物对不同时间控制点 *E. coli* O₇₈ 浓度的吸光度影响

Table 2 Effects of different drugs on the absorbance of *E. coli* O₇₈ at different times

项目 Item	细菌生长时间/h Bacterial growth time				
	2	4	6	8	14
空白对照组 Control group	0.076±0.012 A	0.196±0.025 A	0.296±0.024 A	0.428±0.023 A	0.545±0.026 A
nisin 组 Nisin group	0.066±0.009 A	0.190±0.013 A	0.256±0.016 A	0.456±0.010 A	0.560±0.015 A
抗生素组 Antibiotic group	0.047±0.007 B	0.049±0.011 C	0.049±0.009 C	0.049±0.012 C	0.049±0.022 D
大黄组 Rhubarb group	0.075±0.016 A	0.124±0.032 B	0.213±0.012 B	0.296±0.014 B	0.348±0.031 B
大黄+nisin 组 Rhubarb and nisin	0.060±0.004 A	0.136±0.021 B	0.198±0.031 B	0.255±0.026 B	0.304±0.012 C

注：同列大写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

Note: Different capital letters within the same column mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

2.3 不同药物对 *E. coli* O₇₈ 细胞壁的影响

在细胞壁与细胞膜之间存在碱性磷酸酶 (AKP)，在正常情况下该酶不能透过细胞壁渗透到细胞外。但是当细胞壁遇到破坏以后，使其通透性增加，AKP 渗透到胞外，由图 2 可知，nisin 与空白对照组重合，表明 nisin 未对细胞壁造成损害。大黄

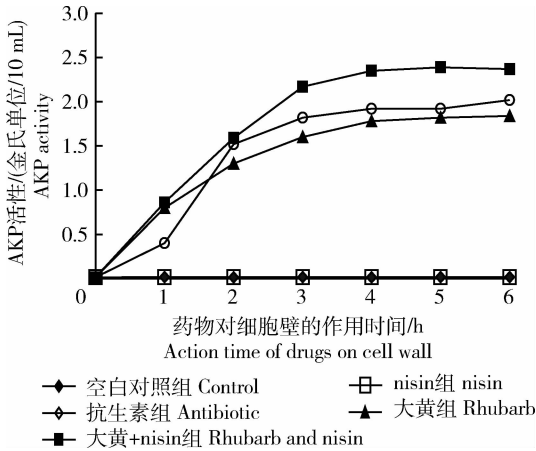


图 2 不同药物对 *E. coli* O₇₈ AKP 含量的影响

Fig. 2 Effects of different drugs on the AKP content of *E. coli* O₇₈

和 nisin 联合用药组，0~4 h 中 AKP 呈现出快速上升的趋势，AKP 含量不断增加，4 h 后趋于稳定；联合用药组 AKP 的含量明显高于大黄对照组与抗生素组。由表 3 可知，1 h 时，除了 nisin 组，其余各组相互之间出现显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.4 不同药物对 *E. coli* O₇₈ 细胞膜的影响

菌体蛋白质等内物质的释放可表明药物对菌体膜完整性的影响。同一时间段内，空白对照组和 nisin 组没有显著性差异 ($P > 0.05$) (表 4)，再次验证 nisin 单独使用对大肠杆菌无抑菌效果；但 0~9 h 内 OD 吸光度略微增大，这可能是因为 *E. coli* O₇₈ 不断繁殖或者某些代谢产物所致影响吸光度。

由表 4 可知，0~6 h，大黄组、抗生素组和联合药物组的 OD 值不断升高，且 6 h 后这 3 组药物之间差异显著 ($P < 0.05$)；6~9 h 各组吸光度略有下降，但各药物组之间对 *E. coli* O₇₈ 的作用差异性显著 ($P < 0.05$)；认为前 6 h 内，3 组药物对 *E. coli* O₇₈ 的细胞膜具有很强的破坏作用；其中大黄和 nisin 的混合使用效果最为明显，其次是抗生素，大黄破坏细胞膜的能力小于前两者。

表 3 不同药物对不同时间控制点 *E. coli* O₇₈ AKP 含量的影响

Table 3 Effects of different drugs on the AKP content of *E. coli* O₇₈ at different times

项目 Item	细菌生长时间/h Bacterial growth time			
	1	2	3	4
空白对照组 Control group	0.015±0.003 A	0.015±0.005 A	0.015±0.004 A	0.015±0.003 A
nisin 组 Nisin group	0.016±0.002 A	0.016±0.004 A	0.016±0.005 A	0.016±0.005 A
抗生素组 Antibiotic group	0.400±0.025 B	1.520±0.025 C	1.820±0.011 C	1.920±0.035 C
大黄组 Rhubarb group	0.800±0.012 C	1.300±0.016 B	1.600±0.015 B	1.780±0.019 B
大黄+nisin 组 Rhubarb and nisin group	0.860±0.021 D	1.590±0.019 D	2.170±0.010 D	2.350±0.012 D

表4 不同药物对 *E. coli* O₇₈ 总蛋白的吸光度 OD₅₉₅ 的影响Table 4 Effects of different drugs on OD₅₉₅ of *E. coli* O₇₈ total protein

项目 Item	细菌生长时间/h Bacterial growth time			
	0	3	6	9
空白对照组 Control group	1.085±0.014 A	1.110±0.006 A	1.153±0.012 A	1.165±0.024 A
nisin 组 Nisin group	1.086±0.022 A	1.109±0.012 A	1.152±0.034 A	1.163±0.021 A
抗生素组 Antibiotic group	1.086±0.016 A	1.203±0.021 B	1.264±0.031 B	1.259±0.015 B
大黄组 Rhubarb group	1.087±0.012 A	1.206±0.014 B	1.232±0.019 C	1.230±0.018 C
大黄+nisin 组 Rhubarb and nisin group	1.087±0.009 A	1.245±0.026 C	1.366±0.015 D	1.354±0.015 D

3 讨论

1)nisin 的生产菌株无毒,专抑制革兰氏阳性菌,特别是细菌芽孢,不能抑制革兰氏阴性菌、酵母和霉菌^[8]。这是因为革兰氏阴性菌的细胞壁是其外源物质的透性屏障,本身对清洁剂、去污剂和防腐剂等有很强的阻碍作用,所以一般对 nisin 不敏感,一些螯合剂处理可以改变阴性菌细胞壁通透性,从而使 nisin 产生对革兰氏阴性菌的抑制作用^[9]。Steven 等^[10]报道指出经过一些处理改变革兰氏阴性菌细胞壁的通透性之后革兰氏阴性菌对 nisin 也变得敏感了,同时也可被抑制或杀死。证明了革兰氏阴性菌对乳酸链球菌素的不敏感性主要是细胞壁的作用。nisin 和乳酸联合使用能抑制肉制品中的沙门氏菌和金黄色葡萄球菌^[11]。nisin 与螯合剂(如 EDTA)联合使用,对沙门氏菌具有明显的抑制作用,同时能够有效减少其他 G⁻ 菌的数量。此外,nisin 与磷酸盐、柠檬酸盐合用也能提高其对 G⁻ 菌的抑制能力^[12]。

2)目前,关于大黄对牛源致病性大肠杆菌的体外研究报道较少,杨斯琴等^[7]报道,大黄对牛源致病性大肠杆菌 O₇₈ 的 MIC 为 0.125,本试验与杨斯琴等的研究结果略有不同,原因可能是蒙药大黄的采摘季节、蒸煮时间不同,或大黄干湿程度不同。由于 AKP 酶和蛋白质是生命体中的重要物质,一旦细胞壁和细胞膜完整性遭到破坏,引起 AKP 酶和菌体蛋白的泄漏必定会影响该细菌的生长。大黄素可以破坏革兰氏阴性大肠杆菌的细胞壁,使外膜通透性增加,细胞内部的碱性磷酸酶和蛋白会有不同程度的溢出^[3]。本研究中,通过检测各药物组 AKP 和蛋白的含量发现 AKP 以及蛋白含量均增加,但抗生素组、大黄组和联合用药组增加效果最明显,说明细菌细胞壁和细胞膜的完整性被破坏。药物通过破

坏细胞壁和细胞膜的完整性,使得其通透性增加,细胞内物质外泄,造成菌体不可恢复性损伤,进而发挥杀菌作用。大黄破坏大肠杆菌的细胞壁和细胞膜后,nisin 才能透过细胞壁发挥出对致病性大肠杆菌的抑菌性;二者联合使用对大肠杆菌的作用明显大于大黄单独的作用,联合作用使大肠杆菌细胞膜形成了微孔,使对 nisin 不敏感的革兰氏阴性菌变得敏感^[13]。nisin 和大黄联合用药首先破坏细菌细胞壁,使得细胞壁通透性增加,AKP 渗透到细胞外,从而导致细菌死亡,这与苏迅^[3]研究结果相一致;进而破坏细胞膜,引起菌体蛋白泄漏影响细菌生长,这与吕晓楠^[13]的结果相一致。

3)掌握药物对致病性大肠杆菌的生长规律,可以对细菌的生长繁殖各个阶段进行调整,从而能更为有效地抑制对机体有害的病原菌达到防治疾病的目的。因此,细菌的生长曲线在研究工作和生产实践中都有指导意义^[14]。经过 nisin 和大黄作用后致病性大肠杆菌的生长并未出现在各个时期,表现出明显的抑菌生长作用。nisin 和大黄联合使用比大黄单独使用对 *E. coli* O₇₈ 抑菌性作用明显。大黄组和联合用药组起初无明显差异,但 6 h 后联合用药组抑菌效果优于大黄组,表明大黄先作用于 *E. coli* O₇₈,随后 nisin 才发挥功效,nisin 主要在延滞期和对数期抑制大肠杆菌的生长这与白泽朴^[15]的结果一致。胡亚等^[16]研究了银花泌炎灵片,对大肠埃希氏菌的时间杀菌曲线进行分析得出了银花泌炎灵片通过延迟大肠埃希菌的对数生长期,缩短平台期,加速进入衰退期,破坏了菌体正常的生长周期,从而抑制了细菌的生长繁殖。

4)大黄和 nisin 联合使用时 AKP 和蛋白含量的增加程度较大黄单独使用效果明显。AKP 试验结果表明抗生素和大黄对 *E. coli* O₇₈ 细胞壁的破坏能力不如大黄和 nisin 联合用药的效果,可见抗生素

抑菌能力很强但是杀菌能力不如联合用药。药物对细胞膜的破坏作用能力依次为联合作用>抗生素>大黄>nisin。通过对 nisin 和大黄进行体外试验,虽然取得了很好的前景,弥补了 nisin 抑菌谱的不足,有效减少了大黄的用量,不足之处在于目前还没有体内试验作为支持,但是却为小鼠体内试验提供了参考。

参 考 文 献

- [1] 还连栋,贾士芳,庄增辉,薛禹谷. 乳链菌肽的杀菌作用机制[J]. 中国食品添加剂,1997(4):20
Huan L D, Jia S F, Zhuang Z H, Xue Y G. Mechanism of bactericidal action of NISIN[J]. *Chinese Food Additives*, 1997 (4):20 (in Chinese)
- [2] 李海娜,朱希强,郭学平. 天然防腐剂乳链菌肽复配应用的研究进展[J]. 食品与药品,2010,12(1):51-54
Li H N, Zhu X Q, Guo X P. Progress on application of compound nisin[J]. *Food and Drug*, 2010, 12(1): 51-54 (in Chinese)
- [3] 苏迅. 治疗奶牛乳房炎的抗菌蒙兽药成分及其复方的筛选和抑菌机理的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2014
Su X. Screening of the antibacterial component and its compound from mongolian veterinary herbs medicine which has therapeutic effects on dairy cow mastitis[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [4] 常明向,章晶,陈科力. 黄连,赤芍及大黄对大肠杆菌内毒素释放的影响[J]. 中成药,2007,29(5):752-753
Chang M X, Zhang J, Chen K L. Effect of *Rhizoma coptidis*, *Radix paeoniae rubra* and rhubarb on *Escherichia coli* endotoxin release[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2007, 29(5):752-753 (in Chinese)
- [5] 王俊丽,张要齐,孙雪峰,张新蕾,陈静,张妍,张玲. 18种中药对猪大肠杆菌的体外抑菌活性的测定方法比较[J]. 安徽农业科学,2012,40(26):12947-12948
Wang J L, Zhang Y Q, Sun X F, Zhang X L, Chen J, Zhang Y, Zhang L. Study on the in vitro bacteriostatic test of 18 traditional chinese herbs against swine *E coli* [J]. *Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40 (26): 12947-12948 (in Chinese)
- [6] 聂小春. 《中华人民共和国药典》2010年版增修订情况介绍[J]. 医药导报,2010,29(8):975-979
Nie X C. Introduction of the 2010 edition of Pharmacopoeia of the People's Republic of China[J]. *Herald of Medicine*, 2010, 29(8):975-979 (in Chinese)
- [7] 杨斯琴,放日格乐,王纯洁,斯木吉德,包永光. 蒙药对牛源致病性大肠杆菌的体外抑菌效果研究[J]. 中国农业大学学报,2015,20(1):124-128
Yang S Q, AO-ri-ge-le, Wang C J, Si-mu-ji-de, Bao Y G. Antibacterial effects of Mongolian medicines on bovine pathogenic *Escherichia coli* in vitro [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(1):124-128 (in Chinese)
- [8] 吕淑霞,白泽朴,代义,冯江波,黄益. 乳酸链球菌素(nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究[J]. 中国酿造,2008(9):87-91
Lv S X, Bai Z P, Dai Y, Feng J B, Huang Y. Study on antibacterial function and mechanism of Nisin [J]. *China Brewing*, 2008(9):87-91 (in Chinese)
- [9] Masschalck B, Deckers D, Michiels C W. Sensitization of outer-membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobial peptides under high pressure[J]. *Journal of Food Protection*, 2003, 66(8):1360-1367
- [10] Setvens K A, Sheldon B W, Klapes N A. Nisin treatment for inactivation of salmonella species and other gram-negative bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991 (57):3613-3615
- [11] 张春江,罗欣,王海燕. Nisin的特性及在肉制品中的应用[J]. 肉类研究,2002(3):31-33
Zhang C J, Luo X, Wang H Y. Characterization of nisin and its application in meat products[J]. *Meat Research*, 2002(3): 31-33 (in Chinese)
- [12] 陈秀珠,何松,龙力红,还连栋,黄益. 乳链菌肽高产菌株 AL2 的发酵条件研究[J]. 微生物学通报,1995(4):215-218
Chen X Z, He S, Long L H, Huang L D, Huang Y. Studies on fermentation conditions of *Lactococcus lactis* AL2 with high yield of Nisin[J]. *Microbiology Bulletin*, 1995(4):215-218 (in Chinese)
- [13] 吕晓楠. 乳链菌肽与天然提取物复配性能及应用的研究[D]. 天津:河北工业大学,2009
Lv X N. Studies on the antibacterial function and application of plant combined with nisin [D]. Tianjin: Hebei University of Technology, 2009 (in Chinese)
- [14] 李凡,刘晶星,徐志凯. 医学微生物学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008
Li F, Liu J X, Xu Z K. *Medical Microbiology* [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2008 (in Chinese)
- [15] 白泽朴. 乳酸链球菌素产生菌株筛选及其抑菌机理研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2008
Bai Z P. Screening of a nisin-producing strain and studying on its antibacterial mechanism [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2008 (in Chinese)
- [16] 胡亚. 银花泌炎灵片对大肠埃希氏菌的抑菌作用及抑菌机理的初步研究[D]. 长春:吉林大学,2013
Hu Y. Study on the antimicrobial effect and preliminary mechanism of Yinhuamianling tablets against *Escherichia coli* [D]. Changchun: Jilin University, 2013 (in Chinese)