

左春生,李迎晓,徐光科,等. 14 株鸭疫里默氏杆菌的部分生物学特性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(15):221-225.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.15.040

# 14 株鸭疫里默氏杆菌的部分生物学特性分析

左春生,李迎晓,徐光科,李 洵,饶 丹,吴海港,刘锦妮,黄 立,赵 聘,焦凤超

(信阳农林学院/河南省水禽资源开发利用与疫病防控工程技术研究中心,河南信阳 464000)

**摘要:**为了解鸭疫里默氏杆菌的流行情况,对信阳地区疑似鸭疫里默氏杆菌感染病料进行病原分离和鉴定。结果显示,共鉴定到 14 株鸭疫里默氏杆菌,其中血清 1 型、2 型和 10 型菌株依次为 3、4、2 株,未定血清型菌株 5 株;动物致病性试验结果显示,分离菌对雏鸭均具有致病性。对 11 种抗菌药物敏感性检测结果表明,分离菌株对阿米卡星、链霉素和头孢曲松较为敏感,对氟苯尼考、阿莫西林、磺胺异噁唑、多黏菌素 B 和多西环素耐药性较高;生物被膜检测结果表明,14 株菌株中有 8 株为强生物被膜形成株,2 株为弱生物被膜形成株。

**关键词:**鸭疫里默氏杆菌;分离鉴定;血清型;药敏试验;生物被膜

**中图分类号:** S855.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)15-0221-05

鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)可感染鸭、鹅、火鸡等多种禽类,是目前规模化水禽养殖多发的细菌性疾病,常造成严重的经济损失。鸭疫里默氏杆菌主要侵害 2~7 周龄的雏鸭和仔鹅,特征性病变为纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎、关节炎、输卵管炎和脑膜炎等<sup>[1]</sup>。

我国郭玉璞等在 1982 年首次报道北京地区商品鸭发生鸭传染性浆膜炎后<sup>[2]</sup>,其他主要水禽养殖区域陆续报道发现该病。鸭疫里默氏杆菌血清型

众多,至少有 21 个血清型,且各型之间几乎无交叉保护性,已成为危害养鸭生产的主要疾病<sup>[3]</sup>。信阳市是河南省主要的水禽集散地,部分养殖户使用血清 1 型和血清 2 型 RA 灭活疫苗免疫后,预防效果不佳。因此,本研究通过对实验室送检的疑似鸭疫里默氏杆菌感染病料进行细菌分离和血清型鉴定,旨在为河南省信阳市水禽鸭疫里默氏杆菌病的防治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

样品为养殖户送检的发病雏鸭。

### 1.2 主要试剂与试验动物

胰蛋白胨大豆(TSA)琼脂培养基、胰酪胨大豆肉汤(TSB)培养基,购自杭州天和微生物试剂有限公司;即用型 SanPfu PCR 试剂盒、细菌基因组 DNA

收稿日期:2019-09-23

基金项目:河南省科技攻关计划(编号:182102110377、182102110123);信阳农林学院动物检疫科技服务团队项目。

作者简介:左春生(1976—),男,河南信阳人,硕士,副教授,主要从事预防兽医方面的教研工作。E-mail:xyzuoecs@126.com。

通信作者:焦凤超,硕士,副教授,主要从事病原微生物与免疫研究。E-mail:fengchaojiao@163.com。

[J]. 分析测试学报,2001,20(2):55-57.

[9]张治安,陈展宇. 植物生理学实验技术[M]. 长春:吉林大学出版社,2008:111.

[10]彭张林. 综合评价过程中的相关问题及方法研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2015.

[11]洪永辉,陈天增,王如均,等. 金花茶组植物品种选择与评价[J]. 林业勘察设计,2018,38(2):1-7.

[12]Huang L P, Zhang Q R, Zhang Z, et al. Overview of relation between mineral nutrient elements and growth and development of fruit trees[J]. Asian Agricultural Research, 2017, 9(10):75-76, 81.

[13]Wojcik P, Wojcik M. Effects of boron fertilization on 'Conference' pear tree vigor, nutrition, and fruit yield and storability[J]. Plant

and Soil, 2003, 256(2):413-421.

[14]Reed B M, Wada S, Jeanine D, et al. Mineral nutrition influences physiological responses of pear *in vitro* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2013, 49(6):699-709.

[15]位 杰,马建江,陈久红,等. 库尔勒香梨叶片营养成分含量的年变化规律及相关性研究[J]. 河南农业科学, 2020, 49(3):121-128.

[16]华雅洁,胡甜甜,王良桂,等. 不同苗龄楸树叶片营养成分的季节性变化[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(3):49-57.

[17]翟晓巧,曾 辉,刘艳萍,等. 构树不同无性系间叶片营养成分及叶形的变化[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(11):38-39, 52.

快速抽提试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;胎牛血清,购自杭州四季青生物工程材料有限公司;鸭疫里氏杆菌 1 型、2 型菌株和 RA 标准血清由上海兽医研究所胡青海博士惠赠;1 日龄健康非免疫樱桃谷鸭,购自河南华英农业发展股份有限公司,隔离饲养至 15 日龄后用于细菌致病性试验测定。

1.3 细菌学检查

无菌采集病死雏鸭肝脏、脑等病料,划线接种于 TSA 平板,置于烛缸中 37 ℃ 培养 36 ~ 48 h,挑取可疑菌落转接种 TSA 培养基(含 5% 胎牛血清)纯培养后,革兰氏染色和瑞氏染色后检查细菌形态。挑取 TSA 培养基纯化后的单菌落转接种 TSB 培养基(含 5% 胎牛血清)增菌培养后待用。

1.4 生化试验

参照文献[4]方法,取 TSA 培养基上纯化的单菌落接种细菌生化反应管,37 ℃ 培养规定时间后观察并记录结果。

1.5 PCR 鉴定

1.5.1 细菌基因组的提取 挑取单菌落接种 5 mL TSB 培养基,37 ℃、200 r/min 振摇培养过夜。取 500 ~ 1 000 μL 进行细菌基因组提取,操作步骤按照细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒说明书进行。

1.5.2 16S rRNA 基因和 *dan B* 基因 PCR 检测 根据文献[5]方法,设计检测 RA 16S rRNA 基因和 *dan B* 基因的 2 对引物,扩增片段长度分别为 364、627 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物详情见表 1。

表 1 引物信息

目的基因	引物	序列(5'→3')	片段大小 (bp)
16S rRNA	16S - F	ACTTCAGGTACCCCGAGCTT	364
	16S - R	GTGCCGTGAGGTGTTAGGTT	
<i>dan B</i>	<i>danB</i> - F	GCTCGTCCTGCTATGGGTAA	627
	<i>danB</i> - R	AGTGCTGGTTTGTGCTCCTT	

PCR 反应体系 50 μL; 2 × *Taq* Master Mix 25 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL,模板 2 μL,超纯水 19 μL。扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。

PCR 产物用 1.5% 琼脂糖电泳进行检测后,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 分析比对。

1.6 血清型鉴定

参照程安春等的方法<sup>[6]</sup>,将各 RA 分离株菌液和 RA1、RA2、RA10 型标准血清进行平板凝集试验,观察记录结果。

1.7 动物致病性试验

参照任小梅等的方法<sup>[4]</sup>,将鉴定后的 14 株 RA 分离株分别腿部肌肉注射进 15 日龄的樱桃谷鸭或麻鸭,注射剂量为 0.5 mL/羽(约 1 × 10<sup>8</sup> CFU),每组 3 羽,同时设立对照组,腹腔注射 0.5 mL 灭菌生理盐水。攻毒后每天观察并记录各组发病、死亡情况。

1.8 药敏试验

以大肠埃希菌(ATCC 25922)作为质控菌株,参照 CLSI 推荐的药敏试验纸片扩散法测定 14 株供试菌株对 11 种抗菌药物的耐药表型。结果依据 CLSI 标准判定各分离菌株的敏感性,以敏感、中介、耐药 3 种形式记录<sup>[7]</sup>。

1.9 鸭疫里默氏杆菌的生物被膜检测

参照文献的方法<sup>[8]</sup>将 14 株鸭疫里默氏杆菌和大肠杆菌 DH5a 的新鲜菌液(*D*<sub>600 nm</sub> = 1.0)采用 TSB 进行 1 : 100 稀释后,加入 96 孔板,200 μL/孔,每株细菌设 3 个重复,然后置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中静置培养 24 h 后采用结晶紫染色法检测其生物被膜形成情况。最后采用酶标仪检测各孔 *D*<sub>595 nm</sub> 值。生物被膜形成能力的判定标准为 *D*<sub>595 nm</sub> ≤ 0.31 为无生物被膜形成菌株;0.31 < *D*<sub>595 nm</sub> < 1.00 为弱生物被膜形成菌株;*D*<sub>595 nm</sub> ≥ 1.00 为强生物被膜形成菌株。

2 结果与分析

2.1 细菌分离与染色

从 58 份病料中分离出 14 株 RA,分离株在 TSA 培养基上,于烛缸中 37 ℃ 培养 24 ~ 36 h 后,可形成圆形、略微突起、表面光滑的奶油状小菌落(对着光线观察菌落呈现淡蓝色)。革兰氏染色镜检可见散在或少数成对出现的革兰阴性短杆(球杆)菌;瑞氏染色呈两极浓染,符合 RA 的形态特征。

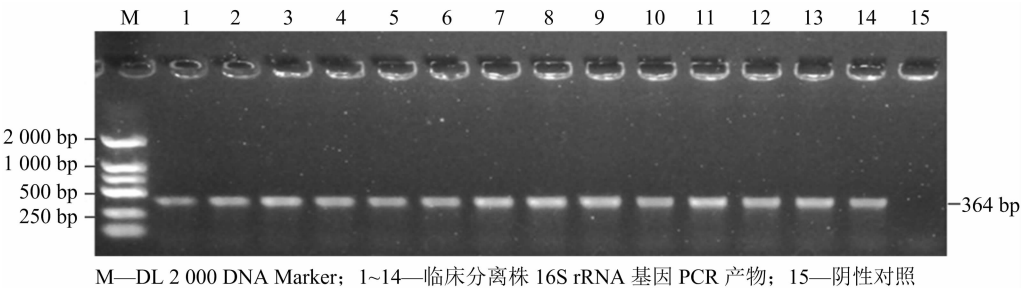
2.2 生化试验结果

14 株 RA 乳糖发酵试验、半乳糖发酵试验、甲基红试验、VP 试验、硫化氢产生试验、硝酸盐还原试验和枸橼酸盐试验均为阴性,不产生硫化氢,氧化酶试验、触酶试验均为阳性,基本符合 RA 的生化特性。

2.3 16S rRNA 基因和 *dan B* 基因 PCR 检测结果

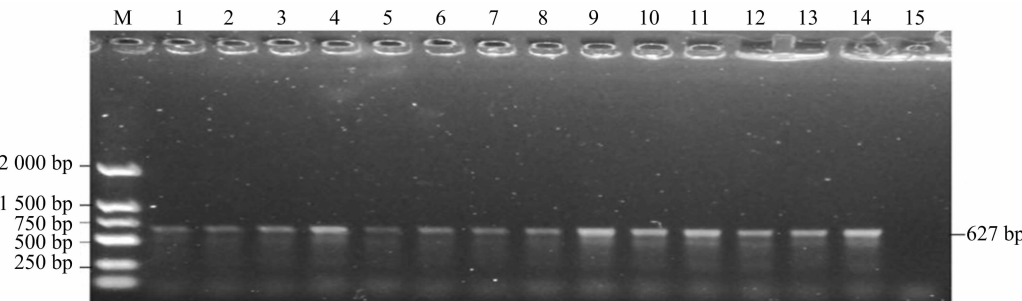
14 株 RA 均能 PCR 扩增出约 364、627 bp 大小的条带,与预期相符(图 1、图 2)。将阳性条带切胶

回收后测序,结果表明,扩增条带的序列与目的基因序列高度一致。



M—DL 2 000 DNA Marker; 1~14—临床分离株 16S rRNA 基因 PCR 产物; 15—阴性对照

图1 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果



M—DL 2 000 DNA Marker; 1~14—临床分离株 *dan B* 基因 PCR 产物; 15—阴性对照

图2 *dan B* 基因 PCR 扩增结果

2.4 血清型鉴定结果

将分离到的 14 株细菌分别与标准阳性血清进

行平板凝集试验。由表 2 可知,血清 1 型菌株 3 株、血清 2 型菌株 4 株、血清 10 型菌株 2 株,其他菌株

表 2 RA 临床分离株的分离与鉴定

菌株	分离部位	血清型	来源	生物被膜	耐药表型
PQY2	脑	1	平桥区	强	阿米卡星、链霉素、氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、磺胺异噁唑、左氧氟沙星、恩诺沙星、多黏菌素 B、头孢曲松、头孢噻肟
PQH5	脑	2	平桥区	强	链霉素、氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、磺胺异噁唑、左氧氟沙星、恩诺沙星、多黏菌素 B
PQJ4	肝脏	未定血清型	平桥区	强	氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、磺胺异噁唑、左氧氟沙星、恩诺沙星、多黏菌素 B、头孢曲松、头孢噻肟
LSG1	肝脏	2	罗山县	强	氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、磺胺异噁唑、左氧氟沙星、多黏菌素 B
LSG4	肝脏	10	罗山县	无	氟苯尼考、阿莫西林、磺胺异噁唑、多黏菌素 B
LSG12	脑	2	罗山县	无	氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、磺胺异噁唑、多黏菌素 B
LSP1	脑	1	罗山县	无	氟苯尼考、阿莫西林
GSP5	脑	未定血清型	光山县	弱	氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、磺胺异噁唑、多黏菌素 B、头孢曲松、头孢噻肟
GSX6	脑	1	光山县	强	链霉素、氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、磺胺异噁唑、左氧氟沙星、恩诺沙星、多黏菌素 B
HCH7	脑	10	潢川县	强	氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、磺胺异噁唑、左氧氟沙星、恩诺沙星、多黏菌素 B
HY1	肝脏	2	潢川县	弱	氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、多黏菌素 B、磺胺异噁唑
HY4	肝脏	未定血清型	潢川县	无	氟苯尼考、阿莫西林
HY8	脑	未定血清型	潢川县	强	链霉素、氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、磺胺异噁唑、左氧氟沙星、恩诺沙星、多黏菌素 B
HB1	脑	未定血清型	淮滨县	强	氟苯尼考、阿莫西林、多西环素、磺胺异噁唑、左氧氟沙星、恩诺沙星、多黏菌素 B

为未定血清型。

2.5 动物致病性试验结果

试验组樱桃谷雏鸭接菌后 18~24 h 出现精神委顿、呆立,逐渐排出白色、黄白色、黄绿色稀粪,2~3 d 后开始出现死亡,并在死亡前表现出阵发性摇头、勾头扭颈等临床症状。剖检死鸭有轻或重的纤维素性心包炎、气囊炎、肝周炎和脑膜炎。对死亡鸭进行细菌分离和 PCR 鉴定,结果能够重新分离鉴定出接种菌。

2.6 14 株鸭疫里默氏杆菌对 11 种抗菌药物的耐药表型

由表 3 可知,14 株鸭疫里默氏杆菌对 11 种抗

菌药物表现出不同程度的耐药,其中对氟苯尼考、阿莫西林、磺胺异噁唑、多黏菌素 B、多西环素耐药率较高,分别为 100% (14/14)、100% (14/14)、85.72% (12/14)、85.72% (12/14) 和 78.58% (11/14);对阿米卡星、链霉素和头孢曲松敏感性较高,分别为 92.86% (13/14)、64.28% (9/14) 和 57.14% (8/14);多数菌株呈现多重耐药现象(表 2)。

2.7 分离株的生物被膜检测

生物被膜检测结果显示,8 株(PQJ4、PQY2、PQH5、LSG1、GSX6、HY8、HB1 和 HCH7)具有强生物被膜形成能力;GSP5 和 HY1 为弱生物被膜形成能力,具体结果见表 2。

表 3 14 株鸭疫里默氏杆菌对 11 种抗菌药物耐药表型统计

抗菌药物	敏感		中介		耐药	
	菌株数(株)	百分比(%)	菌株数(株)	百分比(%)	菌株数(株)	百分比(%)
阿米卡星	13	92.86	0	0	1	7.14
链霉素	9	64.29	1	7.14	4	28.57
多西环素	2	14.29	1	7.14	11	78.58
氟苯尼考	0	0	0	0	14	100
多黏菌素 B	1	7.14	1	7.14	12	85.71
阿莫西林	0	0	0	0	14	100
头孢曲松	8	57.14	3	21.43	3	21.43
头孢噻肟	4	28.57	7	50.00	3	21.43
恩诺沙星	3	21.43	4	28.57	7	50.00
左氧氟沙星	4	28.57	2	14.29	8	57.14
磺胺异噁唑	1	7.14	1	7.14	12	85.71

3 结论与讨论

信阳市水资源丰富,除采用标准化养殖体系的樱桃谷肉鸭养殖龙头——河南华英农业发展股份有限公司外,还有众多小型养殖户和散养户。这些小型养殖户和散养户的鸭(鹅)苗来源比较杂,除本地的孵化场外,其他大多来源于江苏、安徽、四川和广东(狮头鹅)等地,使得信阳地区鸭疫里默氏杆菌血清型分布较为多样,再加上呼肠孤病毒感染的普遍存在<sup>[9-10]</sup>,使得鸭疫里默氏杆菌病的防控形势更加严峻。

鸭疫里默氏杆菌血清型众多,并且存在明显的区域性特征。任晓梅等从广东、山东、江苏等地区疑似鸭疫里默氏杆菌病病料中分离鉴定出 46 株鸭疫里默氏杆菌,其中血清 1 型、2 型、10 型和 15 型菌株依次为 9 株、25 株、1 株和 1 株,未定血清型菌株 10 株<sup>[4]</sup>。云水利等从江苏省某免疫鸭场的病死鸭

中分离到了血清 11 型的鸭疫里默氏杆菌<sup>[11]</sup>。袁小远等 2015—2016 年间从山东及河北等地的商品鸭场病料中共分离出 18 株鸭疫里默氏杆菌,均为血清 1 型 RA<sup>[12]</sup>。本研究分离的 14 株鸭疫里默氏杆菌中血清 1 型菌株 3 株,血清 2 型菌株 4 株,血清 10 型 2 株,其他菌株为未定血清型,这与焦凤超等的早期研究结果部分吻合<sup>[13]</sup>,这也解释了为什么当前信阳地区很多养殖户虽然实施了鸭疫里默氏杆菌病疫苗(主要是血清 1 型和 2 型)的免疫接种,但该病仍频繁发生的原因。

由于鸭疫里默氏杆菌病疫苗免疫预防效果不佳,所以很多养殖户往往采用抗菌药物进行防治,而鸭疫里默氏杆菌又经常和大肠杆菌发生混合感染,这给该菌的分离鉴定带来一定的难度。本研究参考丁云竹等建立的 PCR 方法辅助开展鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定,提高了工作效率<sup>[5]</sup>。另外 Hu 等建立的针对大肠杆菌 *phoA*、沙门菌 *invA*、鸭疫里

默氏杆菌 *dna B* 基因的三重 PCR 方法,其检测下限为  $1 \times 10^3$  CFU/mL<sup>[14]</sup>。Wei 等建立的大肠杆菌、沙门菌、鸭疫里默氏杆菌、巴氏杆菌、多重 PCR 检测方法,其检测下限为 10 pg 基因组 DNA<sup>[15]</sup>。以上这些方法有助于对临床病料中的鸭疫里默氏杆菌进行鉴别检测。

报道表明,RA 对多种抗生素表现出耐药现象<sup>[16]</sup>。荆雅玮等对分离自安徽省的 8 株 RA 菌株药物敏感性检测结果表明,RA 对阿莫西林、头孢他啶和头孢吡啶敏感,对洛美沙星和阿奇霉素、阿米卡星耐药<sup>[17]</sup>。Zhong 等对国内分离的 224 株 RA 进行耐药性检测的结果表明,50% 的分离株对  $\beta$ -内酰胺类抗生素、利福平等多种抗生素耐药,其中有 4 株对 29 种抗生素耐药<sup>[18]</sup>。本次分离的 14 株 RA 对氟苯尼考、阿莫西林、磺胺异噁唑、多黏菌素 B 和多西环素表现出较高的耐药率以及多重耐药现象,但对阿米卡星敏感性较好,为 92.86% (13/14),与上述结果有较大出入,这可能与各地用药习惯有关。调查发现,信阳地区使用抗菌药物防治鸭疫里默氏杆菌病和大肠杆菌病时,主要采用拌料或饮水给药,且常使用氟苯尼考、强力霉素、阿莫西林、多黏菌素 B 和磺胺类等药物,很少用阿米卡星和头孢类药物,这与 14 株 RA 的耐药性检测结果基本相符。

生物膜是一个微生物群落,由细胞外聚合物基质包围的微生物组成。研究报道鸭疫里默氏杆菌形成生物被膜能力可能和该菌在养殖环境中的持续存在和细菌耐药性存在一定的关系<sup>[8,19]</sup>。荆雅玮等分离的 8 株菌株中有 7 株为强生物被膜形成株,且表明强生物被膜形成株 AH-1 对 17 种抗菌药物耐药<sup>[17]</sup>。本研究分离的 14 株 RA 中有 8 株为强生物被膜形成株,并且 8 株均表现出了多种耐药现象,具体的机制有待于进一步研究确定。

综上所述,本研究从 58 份临床送检病料中分离到 14 株疑似鸭疫里默氏杆菌,通过细菌生物学特性和 16S rRNA 基因、*dan B* 基因 PCR 鉴定,确定分离菌株为鸭疫里默氏杆菌,并对其部分生物特性如血清型、耐药表型和生物被膜形成能力进行了鉴定,为河南省信阳市的水禽鸭疫里默氏杆菌病的综合防控提供参考。

#### 参考文献:

[1] 苏敬良,黄瑜,胡薛英. 鸭病学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2016:243-245.

- [2] 郭玉璞,陈德威,范国雄,等. 北京鸭小鸭传染性浆膜炎的调查[J]. 畜牧兽医学报,1982,13(2):35-41.
- [3] 吴彩艳,程淑琴,张建峰,等. 我国鸭疫里默氏杆菌病流行概述[J]. 动物医学进展,2017,38(6):86-90.
- [4] 任晓梅,王小兰,韩文龙,等. 鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 中国动物传染病学报,2018,26(4):47-51.
- [5] 丁云竹,孙冰清,姜盼,等. 鸭疫里默氏杆菌 16S rRNA 和 *dna B* 基因的双重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2017,39(1):50-53.
- [6] 程安春,汪铭书,陈孝跃,等. 我国鸭疫里默氏杆菌血清型调查及新血清型的发现和病原特性[J]. 中国兽医学报,2003,23(4):320-323.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty fourth informational supplement[S]. CLSI documents M100-S24, CLSI,2014.
- [8] Hu Q H, Han X G, Zhou X J, et al. Characterization of biofilm formation by *riemerella anatipestifer* [J]. Vet Microbiol, 2010, 144 (3/4):429-436.
- [9] 黄瑜,苏敬良,施少华,等. 我国鸭呼肠孤病毒感染相关的疫病[J]. 中国兽医杂志,2009,45(7):57-58,92.
- [10] 高绪慧,吴海洋,孙吉谦,等. 山东地区新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定[J]. 中国家禽,2018,40(20):61-63.
- [11] 云水利,杨勇,王小波,等. 11 型鸭疫里默氏杆菌分离鉴定及致病性研究[J]. 中国预防兽医学报,2009,31(8):605-609.
- [12] 袁小远,王友令,王晓丽,等. 2015—2016 年山东、河北地区鸭疫里默氏杆菌流行病学调查[J]. 中国家禽,2017,39(4):70-72.
- [13] 焦凤超,李迎晓,陈宏智,等. 河南省信阳市鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定和血清型分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):166-167.
- [14] Hu Q H, Tu J, Han X G, et al. Development of multiplex PCR assay for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica* simultaneously from ducks [J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 87(1):64-69.
- [15] Wei B, Cha S Y, Kang M, et al. Development and application of a multiplex PCR assay for rapid detection of 4 major bacterial pathogens in ducks [J]. Poultry Science, 2013, 92(5):1164-1170.
- [16] 刘马峰,田琇,程安春. 鸭疫里默氏杆菌毒力及耐药机制研究进展[J]. 微生物学报,2019(7):1222-1231.
- [17] 荆雅玮,陈芳芳,左佳坤,等. 8 株鸭疫里默氏杆菌安徽分离株的生物学特性分析[J]. 中国动物传染病学报,2018,26(2):34-39.
- [18] Zhong C Y, Cheng A C, Wang M S, et al. Antibiotic susceptibility of *riemerella anatipestifer* field isolates [J]. Avian Diseases, 2009, 53 (4):601-607.
- [19] Burmolle M, Webb J S, Rao D, et al. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72 (6):3916-3923.