

大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验

徐辉¹, 王丽霞², 李生龙², 陈砾桐²

(1. 安徽省宿州市埇桥区动物卫生监督所, 安徽宿州 234000; 2. 安徽华澳生物技术有限公司, 安徽合肥 231131)

摘要 为进一步确诊临床发病鸡的病原, 无菌条件下取肝脏, 进行细菌的分离、培养及鉴定。鉴别培养基培养结果显示, 分离菌株在伊红美蓝培养基上出现带有金属光泽的菌落特征, 在麦康凯培养基显示出粉红色菌落的特征。结果表明, 7只患病鸡均为大肠杆菌感染。然后, 针对分离纯化的菌株进行药敏试验。西药药敏试验结果显示, 硫酸庆大霉素、阿米卡星、硫酸新霉素、安普霉素均为高敏, 阿莫西林耐药, 而盐酸多西环素和恩诺沙星为中敏。中药药敏试验结果显示, 四黄止痢颗粒和杨树花口服液对分离菌株比较敏感。该试验结果可为大肠杆菌病的临床用药提供参考。

关键词 病鸡; 大肠杆菌; 分离与鉴定; 药敏试验; 药物筛选

中图分类号 S858.31 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)19-0084-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.19.023



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Separation, Identification and Drug Sensitivity Test of *Escherichia coli*

XU Hui¹, WANG Li-xia², LI Sheng-long² et al (1. Animal Health Supervision Institute in Yongqiao District of Suzhou City, Suzhou, Anhui 234000; 2. Anhui Huao Biotechnology Co., Ltd., Hefei, Anhui 231131)

Abstract In order to further confirm the pathogen of diseased chicken in the clinic, the liver was collected under aseptic conditions to make the laboratory isolation, culture and identification of bacteria. The results of different culture media showed that the isolated strains showed the colony characteristic of metallic luster on EMB medium, and the MAC medium showed the characteristics of pink colony. The results showed that all seven infected chicken were infected with *Escherichia coli*. The drug sensitivity test results of western medicine showed that the gentamicin sulfate, amikacin, neomycin sulfate, and apramycin were highly sensitive to isolated strains, amoxicillin was tolerant to isolated strains, and doxycycline hydrochloride and enrofloxacin were intermediately sensitive to isolated strains. The sensitive test results of traditional Chinese medicine showed Sihuang Zhili Granules and Yangshuhua Oral Liquid were more sensitive to isolated strains. This experimental results could provide references for the clinical medication of colibacillosis.

Key words Sick chicken; *Escherichia coli*; Separation and identification; Drug sensitivity test; Drug screening

大肠杆菌是微生物界普遍存在的一种微生物, 它主要寄生于人和动物肠道中, 一般分为致病性大肠杆菌和非致病性大肠杆菌, 一般正常的禽类体内都会存在大肠杆菌潜在基因。大肠杆菌能引起禽类多种疾病, 每年对养殖业和畜牧业都会造成巨大的经济损失, 随着养殖场对抗生素的普遍应用, 大肠杆菌不断产生耐药性, 已经成为社会关注的热点之一。大肠杆菌病的主要表现为精神颓废、不能长时间站立、不食或厌食、头部耷拉、呆立或蹲伏不动、肛门周围羽毛沾有绿色或浅黄色稀粪。当鸡体的免疫系统下降或者鸡体的皮肤防御系统遭到破坏, 就会传染给其他鸡群, 导致大肠杆菌的大量繁殖, 从而引发大肠杆菌类似疾病。病鸡排出的细菌, 也会经过空气、粪便、饮水等方式传染给健康鸡群^[1]。大肠杆菌这类疾病还是以预防为主, 在养殖过程中应注意场地的卫生环境, 同时加强养殖场的饲养管理和饮水卫生, 除了对鸡群进行科学的饲养管理、做好日常清洁、消毒等工作外, 合理使用药物也是防治该病的关键。

由于大肠杆菌对多种青霉素、磺胺类、氨基糖苷类都比较敏感^[2], 所以社会广泛使用敏感的抗生素对大肠杆菌来进行治疗, 这些年来由于抗生素的不正当使用, 不仅造成耐药菌株的不断增多和抗生素的极大浪费, 同时延长的治疗时间也给养殖业和畜牧业带来了严重的经济负担, 所以在临床上合理使用抗生素非常有必要, 同时中药制剂在临床上的应用

研究也不断深入, 如果筛选出有效的抗菌组方, 就能减少抗生素给社会带来的负面影响。

目前兽药药物的残留问题也越来越受到人们的关注, 已经成为社会热点问题, 尤其是肉鸡与蛋鸡的药物残留问题一直是国家有关部门严格监察的问题, 鉴于目前养殖场对抗生素的广泛使用, 而蛋鸡在产蛋期患病可用药物较少, 养殖户迫于对疾病的治疗和利益的追求, 会选择一些蛋鸡禁用抗生素来进行治疗, 从而导致动物源性食品质量的不安全, 还有患病动物长期服用抗生素可在体内残留累积药残, 人类食用含抗生素残留的动物产品也会引起过敏反应, 间接致病, 严重时甚至能引起人类的生命安全。尽管抗生素在很大程度上能起到很好的治疗效果, 但长期使用抗生素会使鸡大肠杆菌的耐药菌种不断出现和耐药谱的不断增多^[3], 治疗效果事倍功半, 而中药由于无耐药性^[4], 近年来在治疗禽类大肠杆菌病症中通过兽医工作者的大量试验已经取得显著的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源。在实习期与安徽华澳生物技术有限公司合作的数个养殖场送来数只疑似患有大肠杆菌疾病的病鸡, 其中包括安徽省肥西县、六安市、亳州市、池州青阳县、宿州市等。

1.1.2 临床诊断。对送检病鸡的精神状况、采食饮水情况以及粪便情况进行观察, 主要表现为不食或厌食、精神萎靡不振、头部耷拉呆立或蹲伏不动、肛门周围羽毛沾有绿色或浅黄色稀粪, 不能长时间站立。在无菌条件下对患鸡进行解

作者简介 徐辉(1980—), 男, 安徽宿州人, 兽医师, 从事畜牧兽医技术推广、动物检疫和动物卫生监督执法工作。

收稿日期 2020-07-14

剖,观察病变的器官组织。

1.1.3 试验耗材与仪器。试验所用耗材有解剖剪、接种环、消毒棉签、消毒镊子、酒精灯、灭菌试管、培养皿、牛津杯、移液枪及枪头等;试验所用仪器有分析电子天平、百分电子天平、数控超声波清洗器、高压蒸汽灭菌锅、电热恒温培养箱、电热鼓风干燥箱、旋转蒸发仪、水浴加热锅、水浴恒温振荡器、超净工作台等。

1.1.4 试剂。生理盐水、麦康凯琼脂培养基(MAC)、伊红美蓝琼脂培养基(EMB)、三糖铁琼脂(TSI)、大肠杆菌生化鉴定管、营养琼脂培养基、营养肉汤培养基、革兰氏染液等。

1.1.5 病原菌获取。在实习期间安徽华澳生物技术有限公司各地区技术员从其负责区域养殖场送来数只疑似患有大肠杆菌病的病鸡,经剖检观察病鸡初步诊断是否患有大肠杆菌症状,在无菌环境下取其病变的器官(如肝脏、心脏或分泌物),并将对应的病鸡做好标记,然后将采集的病料及时放于冰箱中冷藏备用。

1.1.6 药品配制。参照 CLSI 标准、兽药国家标准和中华人民共和国兽药典(2015 年版)一部确定各种抗生素母液所用药物原料的有效含量(或单位效价)及溶剂稀释剂方法^[5]。该试验所制母液的理想浓度为 1 024 μg/mL,根据理论母液浓度计算出配制 100 mL 母液所需的原药质量,具体配制方法见表 1^[6],计算公式如下:

母液理想浓度 = $\frac{\text{药物原料质量} \times \text{效价}}{1\,024\,\mu\text{g/mL}} = 100\,\text{mL}$

表 1 抗生素配制

Table 1 The preparation of antibiotics

序号 No.	药物名称 Name of antibiotics	质量 Mass/g	溶剂 Solvent	稀释剂 Diluter
1	阿莫西林	0.107 7	0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸盐缓冲液	0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸盐缓冲液
2	阿米卡星	0.116 4	去离子水	去离子水
3	安普霉素	0.105 6	去离子水	去离子水
4	盐酸多西环素	0.120 5	去离子水	去离子水
5	恩诺沙星	0.103 4	加入 1/2 体积的去离子 水后,逐滴加入 1 mol/L 的 NaOH 直至最终溶解	去离子水
6	硫酸新霉素	0.157 5	去离子水	去离子水
7	硫酸庆大霉素	0.173 6	去离子水	去离子水

鸭浆宁:称取 50 g 样品,加入 10 倍量的水,水浴蒸煮 1 h,在同样条件下提取 3 次,将 3 次所得提取液进行统一抽滤,然后将其旋转蒸发浓缩至 50 mL 待用。

大杆康:称取 30 g 样品加入 100 mL 水,搅拌溶解待用。

杨树花口服液:取安徽华澳生物技术有限公司生产的杨树花口服液,摇匀待用。

四黄止痢颗粒:称取 100 g 样品,加入 100 mL 水,搅拌溶解待用。

在微生物室无菌环境下将配制好的药液分别用无菌注射器吸取后,再装入 0.22 μm 无菌滤头进行过滤,然后将过滤好的药液分装到经高压灭菌的离心管中,按压封紧,用记号笔标记好相应药物,置于-20 ℃冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离与培养。将病料从冰箱取出,用灭菌后的解剖剪刀剪去病料表面被污染的部分,再用消毒过的棉签沾取病变器官内的组织液,分别在麦康凯琼脂培养基和伊红美蓝琼脂培养基上面进行涂抹,形成十字区域,接种完成后于恒温箱 37 ℃培养 18~24 h,观察菌落生长形态。

1.2.2 病原菌的镜检。采用革兰氏染色法对病原菌进行染色镜检,革兰氏染色具体步骤如下。

1.2.2.1 初染。点燃酒精灯,将载玻片用洗瓶先冲洗干净,用吸水纸擦干或自然晾干,再用接种环从伊红美蓝培养基或者麦康凯琼脂培养基挑取单个菌落涂抹于载玻片中心区域,涂抹成薄薄的一层,然后滴加草酸铵结晶紫染液到涂菌部位,染色 2 min 后,用洗瓶冲洗数次。

1.2.2.2 媒染。加碘液,保存 1 min,再倾斜载玻片倾去碘液,最后用洗瓶冲洗至无色。

1.2.2.3 脱色。用吸水纸将载玻片上的水吸干或者自然晾干,然后再用 95%乙醇脱色,持续 30 s 后立即洗去 95%乙醇。

1.2.2.4 复染。将载玻片上的水自然晾干或用吸水纸吸干,再用番红复染色 2 min,水洗,最后用吸水纸吸干。

1.2.2.5 结果观察。将载玻片涂上海柏油,置于显微镜下由低倍切换到高倍镜观察。

1.2.3 病原菌的生化鉴定。选取从麦康凯琼脂培养基上长出的粉红色菌落或者伊红美蓝琼脂培养基上长出的黑色带有金属光泽的菌落接种到三糖铁培养基中恒温 37 ℃培养 18~20 h,检查该菌株对糖的发酵能力、是否产酸产气,如果有相应现象产生,则表明该菌种是大肠杆菌。

1.2.4 大肠杆菌的药敏试验。

1.2.4.1 菌液的制备。用接种环分别挑取 EMB 培养基上的单个紫黑色菌落接种到营养肉汤培养中,在水浴振荡培养箱中 37 ℃恒温培养 8 h 左右,然后用紫外可见分光光度计在波长 600 nm 处测定菌液 OD 值,最好用营养肉汤进行校零。

①吸取 0.5 mL 菌液加入到 9.5 mL 营养肉汤中,混匀后检测 OD_{600 nm} 是否介于 0.08~0.10。②根据测定数值结果,调整原培养液浓度(用营养肉汤稀释原培养液以降低 OD_{600 nm} 值或者延长原培养液的培养时间来升高 OD_{600 nm} 值)。③用于点板的菌液需在上述步骤稀释所得的混合液基础上再稀释 1 000 倍或直接使用原培养液稀释 10 000 倍。

1.2.4.2 药物 MIC 的测定。①无菌 96 孔板第 1 行加入 200 μL 营养肉汤,第 2 行加入 100 μL 营养肉汤+100 μL 制备的菌液,第 3~8 行加入 100 μL 营养肉汤。②第 3~8 行每行第一孔加入一种抗生素母液 100 μL,逐次倍比稀释至第 12 孔,最后从每行第 12 孔弃掉 100 μL。③第 3~8 行每孔加入 100 μL 制备菌液。④制备菌液和抗生素上样完毕后盖好板盖,37 ℃恒温孵育 12~20 h 后观察结果。

结果判读:当第 1 行所有孔无细菌生长、第 2 行所有孔有细菌生长时,第 3~8 行每行最后一清亮孔所对应的药物浓度为该药的 MIC。当出现跳孔现象,若为单一跳孔,记录最高 MIC,若为多处跳孔,则此行无效,不报告该种药物的

MIC。当第 1 行有孔出现细菌生长现象,同样不应该报告该板所检测的各抗菌药物的 MIC。

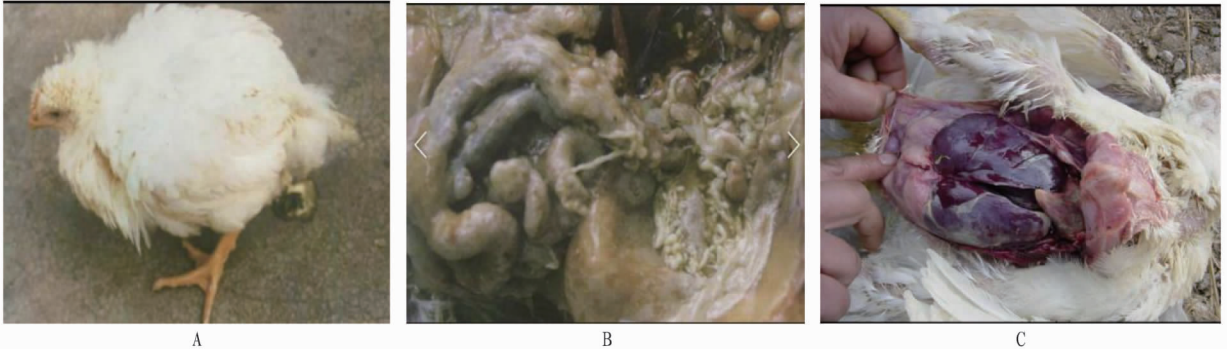
1.2.4.3 牛津杯法检测。在超净工作台中,打开送风,点燃酒精灯,将普通琼脂培养基倒入 7 个培养皿中并铺平,待其完全凝固即可,然后,用消毒过的棉签沾取每株病原菌于培养皿中轻轻涂抹,呈十字区域;然后,用记号笔在培养皿底部分成 5 块区域,每块区域分别标注为鸭浆宁、大杆康、杨树花口服液、四黄止痢颗粒、新霉素(西药对照);用消毒过的镊子往每块培养皿上放上 5 个灭菌的牛津杯,轻轻按压,使其与培养皿表面贴合无空隙^[7],分别加入各试验用药 200 μ L,完

成后将其置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 10~12 h 后再观察结果。

1.2.4.4 药物敏感试验判定标准。中药细菌抑菌圈直径标准判定如下:若抑菌圈直径>20 mm,判为极敏;若抑菌圈直径为 15~20 mm,判为高敏;若抑菌圈直径为 10~14 mm,判为中敏;若抑菌圈直径为 0~10 mm,判为低敏;若抑菌圈直径为 0,判为不敏。

2 结果与分析

2.1 临床诊断结果 对送检病鸡的精神状况、采食饮水情况及粪便情况进行观察,可见病鸡个别头部耷拉、精神萎靡、呆立不动(图 1A);病鸡解剖结果见图 1B、C。



注:A. 呆立无神;B. 肠炎变色腐烂;C. 肝脏肿大

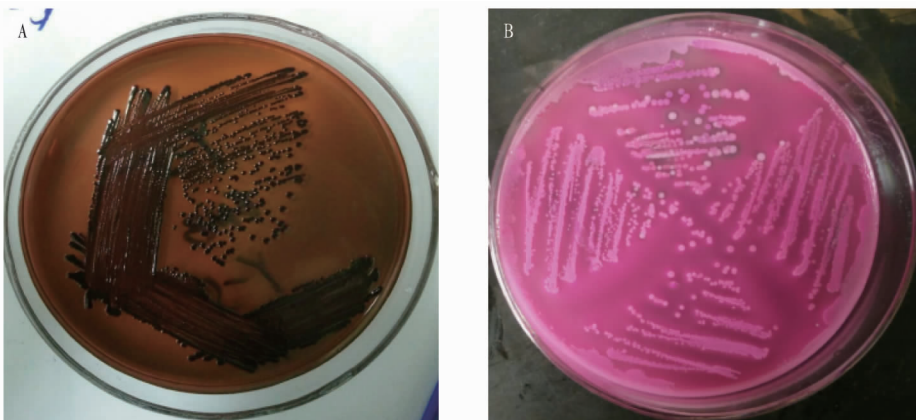
Note: A. Standing listlessly; B. Intestinal discoloration and decay; C. Liver enlargement

图 1 病鸡的临床症状和剖检结果

Fig. 1 The clinical symptoms and microscopic examination results of diseased chicken

2.2 病原菌鉴定结果 经选择性培养基分离培养后,结果发现此病菌接种在普通琼脂培养基上培养 18~24 h,形成圆形、湿润、半透明、隆起的乳白色中等大小菌落;在伊红美蓝培养基上长出黑色稍凸圆形菌落,直径大小约 2~5 mm,菌落边缘整齐且表面光滑湿润,并带有金属光泽(图 2A)^[8];在麦

康凯培养基上长出边缘整齐且表面光滑湿润的粉红色菌落,直径 2~5 mm 圆形凸起(图 2B)^[9];然后,再挑取典型的大肠杆菌单株菌落在营养肉汤培养基上传代培养 2~3 代,使细菌生长稳定,状态良好。最后,经过肉汤培养的病原菌标号分别为 C-1、C-2、C-3、C-4、C-5、C-6、C-7。



注:A. EMB 培养基;B. MAC 培养基

Note: A. EMB culture medium; B. MAC culture medium

图 2 病原菌在 EMB 培养基和 MAC 培养基上的菌落形态

Fig. 2 Colony morphology of pathogen on EMB culture medium and MAC culture medium

2.3 病原菌的镜检结果 经镜检,病原菌革兰氏染色结果为阴性杆菌,如图 3 所示。

2.4 病原菌的生化鉴定结果 通过对病原菌进行三糖铁生化鉴定,结果显示为斜面 and 底层产酸,不产硫化氢,靛基质试

验和甲基红试验结果均呈阳性,VP 试验和西蒙氏柠檬酸盐试验结果均呈阴性,符合大肠杆菌生化特性,表明该病原菌为典型的大肠埃希氏菌。

2.5 微量肉汤稀释法检测 MIC 结果 用灭菌 96 孔板测定



图 3 大肠杆菌镜检结果(1 000×)

Fig.3 Microscopic examination results of *E. coli* (1 000×)

试验分离纯化出的 7 株大肠杆菌,各孔板阴性对照均未见细菌生长,阳性对照的细菌在孔内生长情况良好,各抗菌药

对大肠杆菌的 MIC(最低抑菌浓度)见表 2。由表 2 可知,96 孔板试验结果显示硫酸庆大霉素、阿米卡星、硫酸新霉素和安普霉素对分离的 7 株大肠杆菌的 MIC 值较其他药物更低。

2.6 牛津杯法检测结果 通过牛津杯法检测试验所选中药对 7 株大肠杆菌的药敏性^[10],结果见表 3、4。

由表 3 可知,该试验所用中药对分离的大肠杆菌菌株都有不同程度的敏感性,其中四黄止痢颗粒、杨树花口服液对每株菌种均具有极高的敏感性,与新霉素的敏感度一致;鸭浆宁和大杆康只对某些菌株有很高的敏感性。

从大肠杆菌药物敏感试验结果(表 4)可知,四黄止痢颗粒和杨树花口服液与对照硫酸新霉素的敏感度相同,均为 100%;鸭浆宁和大杆康敏感度低于杨树花口服液、四黄止痢颗粒和硫酸新霉素,分别为 85.7%和 71.4%,由此可见中药组方优先选用杨树花口服液和四黄止痢颗粒。

表 2 微量肉汤稀释法测得各抗菌药物对大肠杆菌的 MIC 值							
Table 2 MIC of each antibacterial drug on <i>E. coli</i> measured by the micro broth dilution method							
分离菌株 Isolated strains	阿莫西林 Amoxicillin	阿米卡星 Amikacin	硫酸庆大霉素 Gentamicin sulfate	盐酸多西环素 Doxycycline hydrochloride	恩诺沙星 Enrofloxacin	硫酸新霉素 Neomycin sulfate	安普霉素 Apramycin
C-1	256	1	0.25	2	0.25	2	0.50
C-2	256	1	0.25	32	0.06	1	0.13
C-3	128	2	1.00	16	8.00	1	2.00
C-4	128	1	0.13	16	8.00	1	1.00
C-5	256	2	0.50	4	16.00	1	16.00
C-6	256	1	16.00	2	0.13	4	8.00
C-7	256	4	0.50	32	64.00	16	64.00

表 3 中药对分离菌株的抑菌圈直径					
Table 3 The inhibition zone diameter of traditional Chinese medicine on isolated strains					
菌株编号 Number of strains	鸭浆宁 Yajiangning	大杆康 Dagankang	杨树花口服液 Yangshuhua Oral Liquid	四黄止痢颗粒 Sihuang Zhili Granules	硫酸新霉素(对照) Neomycin sulfate(control)
C-1	13.27	17.23	24.67	21.44	22.87
C-2	12.71	8.02	23.92	17.18	20.65
C-3	18.89	16.19	24.81	16.34	21.77
C-4	17.15	15.11	25.66	23.49	22.84
C-5	20.34	13.28	27.78	15.71	23.49
C-6	8.76	8.46	25.66	22.45	24.12
C-7	15.51	17.58	23.79	18.33	19.91

表 4 7 株鸡致病性大肠杆菌药物敏感试验结果						
Table 4 Drug sensitivity test results of 7 strains of pathogenic chicken <i>E. coli</i>						
中药名称 Name of Chinese medicine	敏感度判定 Sensitivity judgment				敏感菌株占比 Proportion of sensitive strains %	高敏、极敏感菌株占比 Proportion of highly sensitive strains and extremely sensitive strains//%
	极敏 Extremely sensitive	高敏 Highly sensitive	中敏 Intermediately sensitive	抗药 Tolerant		
四黄止痢颗粒 Sihuang Zhili Granules	3	4	0	0	100	100
大杆康 Dagankang	0	3	2	2	71.4	42.9
杨树花口服液 Yangshuhua Oral Liquid	7	0	0	0	100	100
鸭浆宁 Yajiangning	1	2	3	1	85.7	42.9
硫酸新霉素 Neomycin sulfate	5	2	0	0	100	100

3 讨论

3.1 临床耐药菌产生的原因 大肠杆菌是一种无芽孢的革兰氏阴性菌,常见的肠道感染菌种之一,在正常的鸡体内也

会存在潜在大肠杆菌,当鸡体的皮肤防御系统遭到破坏和免疫系统降低时,鸡群便会遭到感染,再传染给其他鸡群,从而诱发大肠杆菌类疾病。为了能快速控制鸡群疾病,养殖场会

优先使用新一代抗生素或大剂量、大组方进行治疗,长期以往容易导致细菌产生耐药性。近些年,大肠杆菌的耐药率和耐药谱不断增高,而且目前被发现的大肠杆菌的血清型有很多种^[11],很大程度上增加了兽医工作者的工作难度,还间接导致食品安全问题的越来越严重,尤其是蛋鸡和肉鸡携带的耐药基因会通过食物链等方式传给人类^[12],危害食品安全和人类健康。该试验结果显示各种抗菌药物对不同地区的大肠杆菌病原菌的敏感度不一样,产生的原因应该是与各地区的用药史有关,由于检测的病鸡来源于不同地区,所以导致不同地区的大肠杆菌对各种药物的敏感度不一样^[13]。通过药敏试验可选择发病场的敏感药物对患有大肠杆菌病的鸡群进行治疗,能达到较好的治疗效果,也能避免细菌耐药性的产生。

3.2 减少药物残留的方法 随着抗生素的广泛使用,药物的残留导致动物源性的食品安全问题越来越严重,尤其体现在蛋鸡和肉鸡上,它们体内携带的耐药基因和药物残留会通过食物链等方式传给人类,严重危害食品安全和人类健康^[14]。中药组方或单方治疗模式便应运而生,因为中药在目前没有被发现很强的耐药性,相比于抗生素中耐药性其危害可以忽略不计,因为中药组方主要调节机制就是改善机体内的新陈代谢,使之调节到平衡稳态,缺点就是没有抗生素效果来的有效和快速。因此,在减少药物残留方面,在速成的肉鸡前期发病可选用疗效快速的西药组方,同时也要注意

用药剂量和疗程,合理用药。等病情稳定后再改用中药组方进行疗效巩固,应分开该场保健和常用治疗药物。此外,蛋鸡在生长期可选用西药组方,开产后发病的可选用无抗组方,在最大程度上减少药物的残留问题。

参考文献

- [1] 霍清合. 大肠杆菌病多发原因及防治[J]. 家禽科学, 2005(3): 22-23.
- [2] 杨玉荣. 鸡大肠杆菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药性及其感染治疗的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2005.
- [3] 恽时锋, 潘震寰, 郑明珠. 鸡大肠杆菌病研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2008, 30(6): 277-280.
- [4] 苏建青, 褚秀玲, 刘文强, 等. 中草药防治鸡大肠杆菌病的机理和临床应用效果[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(8): 1964-1965, 2003.
- [5] 中国兽药典委员会. 兽药国家标准化学药品、中药卷: 第1册[S]. 北京: 化学工业出版社, 2013: 65, 108.
- [6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2015年版)[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [7] 赵景田. 中药治疗鸡大肠杆菌病[J]. 河南畜牧兽医, 2003, 24(11): 50.
- [8] 彭贵青, 吴斌, 刘梦元. 仔猪致病性大肠杆菌分离鉴定及药敏试验[J]. 养殖与饲料, 2013(5): 29-31.
- [9] 刘萍, 胡世君, 周秀富. 某鸡场大肠杆菌和沙门氏菌病原的分离鉴定及药敏试验[J]. 畜禽业, 2005(7): 40-42.
- [10] 昌莉丽, 李华坤, 刘桂兰. 中西药联用对禽源大肠杆菌的体外抑菌效果研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(16): 5037-5038.
- [11] 阮祥春, 曾明华, 黄媛媛, 等. 安徽省部分地区致病性大肠杆菌耐药性分析[J]. 安徽农业大学学报, 2013, 40(3): 430-433.
- [12] 戴秀美, 常维山. 2012年我国部分地区猪源大肠杆菌耐药性分析[J]. 畜禽业, 2013(1): 50-52.
- [13] 郝智慧, 肖希龙, 邱梅, 等. 不同区域鸡大肠杆菌对抗菌药的耐药性比较[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(1): 84-88.
- [14] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2015.
- [15] 王春丽, 梁宗锁, 李殿荣, 等. 茉莉酸甲酯和水杨酸对丹参幼苗中蔗糖代谢和酚酸类物质积累的影响[J]. 西北植物学报, 2011, 31(7): 1405-1410.
- [16] 陈竞天, 易斌, 陈艾萌, 等. 苗期喷施水杨酸对甜叶菊主要农艺性状和糖苷含量的影响[J]. 西北植物学报, 2019, 39(1): 149-155.
- [17] 张悦, 王义, 蒋世翠, 等. 水杨酸诱导下人参培养物差异表达基因片段的克隆[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(2): 245-250.
- [18] 孟书亦, 马秀杰, 韩梅, 等. 水杨酸对黄芩愈伤组织抗氧化酶活性及黄芩苷含量的影响[J]. 分子植物育种, 2017, 15(10): 4179-4183.
- [19] LIU Y H, LIANG Z S, ZHANG Y J. Induction and *in vitro* alkaloid yield of calluses and protocorm-like bodies (PLBs) from *Pinellia ternate*[J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2010, 46(3): 239-245.
- [20] 李梅, 徐丹旎, 李丽江, 等. 咖啡树咖啡碱合成相关基因研究进展[J]. 热带农业科学, 2018, 38(9): 45-48.
- [21] MALUF M P, DA SILVA C C, DE OLIVEIRA M DE P A, et al. Altered expression of the caffeine synthase gene in a naturally caffeine-free mutant of *Coffea arabica*[J]. Genetics and molecular biology, 2009, 32(4): 802-810.
- [22] 李金, 魏艳丽, 庞磊, 等. 茶树咖啡碱合成途径中 TCS1, TIDH, SAMS 的基因表达量差异及其与咖啡碱含量的相关性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 21-24.
- [23] 邓威威, 金阳, 李旻, 等. 茶树咖啡碱合成酶基因原核表达、及其抗体制备与鉴定[J]. 植物研究, 2015, 35(3): 333-339.

(上接第 50 页)