

# 蒲公英水提物对猪链球菌生物被膜体外干预作用

于文会<sup>1</sup>, 许晶<sup>1</sup>, 魏庆微<sup>1</sup>, 姜晓文<sup>1</sup>, 单安山<sup>2\*</sup>

(1. 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 旨在观察蒲公英水提物对猪链球菌的抑菌作用及其对生物被膜形成的干预作用。通过水提法提取蒲公英的活性成分, 利用高效液相色谱法检测蒲公英水提物中绿原酸的含量。通过微量肉汤稀释法分别测定蒲公英水提物和绿原酸对猪链球菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC); 利用结晶紫染色(CV)和扫描电镜(SEM)检测蒲公英水提物和绿原酸对猪链球菌生物被膜形成的影响。结果表明, 蒲公英水提物中绿原酸含量为  $5.833 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 蒲公英水提物对猪链球菌的 MIC 和 MBC 分别为 62.5 和  $250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 绿原酸对猪链球菌 MIC 和 MBC 分别为 2.5 和  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。扫描电镜观察可见阴性对照组细菌镶嵌于生物被膜中, 细菌周围有厚厚的黏液层, 而蒲公英水提物和绿原酸均能使细菌生物被膜中的细菌数量和生物被膜的形态发生明显变化, 细菌数量明显减少, 未见有黏液成分和胞外基质, 二者对猪链球菌生物被膜的形成均有抑制作用, 均呈剂量依赖性。结果显示, 蒲公英水提物对体外猪链球菌生物被膜形成具有抑制作用, 并呈剂量依赖性; 蒲公英水提物对体外猪链球菌生物被膜形成抑制作用的主要活性成分为绿原酸。

**关键词:** 猪链球菌; 生物被膜; 蒲公英; 绿原酸

中图分类号: S852.611; S853.74

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)10-1875-07

## Dandelion Aqueous Extract Affects Biofilm Formation by *S. suis*

YU Wen-hui<sup>1</sup>, XU Jing<sup>1</sup>, WEI Qing-wei<sup>1</sup>, JIANG Xiao-wen<sup>1</sup>, SHAN An-shan<sup>2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;  
2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The objective of this study was to investigate whether or not *dandelion* aqueous extract combated bacterial growth or affected biofilm formation by *S. suis*. In this study, the chlorogenic acid content of the *dandelion* aqueous extract was detected by high efficiency liquid chromatography (HPLC). Using a microdilution broth method, the MIC or MBC of *dandelion* aqueous extract or chlorogenic acid against *S. suis* was determined. The *S. suis* biofilm was determined by crystal violet staining. The *S. suis* biofilm was also examined by scanning electron microscopy. The results revealed that the chlorogenic acid content of the *dandelion* aqueous extract was  $5.833 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The MIC, MBC of *dandelion* aqueous extract to *S. suis* was 62.5,  $250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. The MIC, MBC of chlorogenic acid to *S. suis* was 2.5,  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. In the negative control, scanning electron microscopy analysis revealed that bacteria were embedded within the biofilms, and the thick slimes revolved around the bacteria. However, the biofilms were significantly affected following growth in the presence of *dandelion* aqueous extract or chlorogenic acid. Moreover, biofilm formation by *S. suis* was dose-dependently decreased by sub-MICs of *dandelion* aqueous extract or chlorogenic acid. Sub-MICs of *dandelion* aqueous extract or chlorogenic acid also diminished bacterial population by *S. suis*. There were no slimes and extracellular

收稿日期: 2015-02-02

基金项目: 黑龙江省博士后基金(LBH-Z11243); 北京市重点实验室开放课题(TCVW-201301)

作者简介: 于文会(1970-), 男, 吉林农安人, 博士, 教授, 主要从事中药抗菌机制研究, E-mail: yuwenhui@neau.edu.cn

\* 通信作者: 单安山, 教授, 博士生导师, E-mail: asshan@neau.edu.cn

matrix components in sub-MICs of *dandelion* aqueous extract or chlorogenic acid treated *s. suis* biofilm. In summary, our study showed that sub-MICs of taraxaci herba aqueous extract significantly decreased biofilm formation by *S. suis*, and one of the active ingredients in *dandelion* aqueous extract was chlorogenic acid.

**Key words:** *Streptococcus suis*; biofilm; *dandelion* aqueous extract; chlorogenic acid

猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*)是一种革兰阳性细菌,不仅引起猪的脑膜炎、关节炎、心内膜炎等一系列疾病,而且感染相关的从业人员,是一种人兽共患病<sup>[1]</sup>。在感染的起始阶段,细菌能否定植在宿主组织,取决于细菌被胞外基质(extracellular matrix)包裹的生物被膜形成与否。形成生物被膜的胞外基质来源于环境和细菌的代谢产物。细菌形成生物被膜有利于细菌的持续性定植,抵抗宿主免疫系统的清除,增强细菌的耐药性,增加细菌和细菌间遗传物质的交换<sup>[2]</sup>。蒲公英(*dandelion*)是一种多年生菊科植物,在我国各地均有分布,来源广泛,价格低廉。蒲公英作为一种药用植物,具有利胆、利尿、抗风湿、抗糖尿病及抗炎特性。蒲公英不同部位的提取物具有不同的药理活性。蒲公英根的水提取物可以缓解酒精诱导的氧化应激反应;蒲公英叶的提取物可以缓解高脂肪食物诱导的非酒精性脂肪肝;蒲公英花的提取物具有抗菌活性<sup>[3]</sup>。然而,蒲公英的全草类提取物干预细菌生物被膜形成的研究,未见国内外文献报道。蒲公英主要抗菌活性成分为绿原酸,且含量较高,具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、免疫调节、降糖等多种作用<sup>[4]</sup>。绿原酸对铜绿假单胞菌生物被膜<sup>[5]</sup>、葡萄球菌生物被膜<sup>[6]</sup>、口腔中多种细菌的生物被膜<sup>[7]</sup>的形成均有抑制作用,但绿原酸对猪链球菌生物被膜形成影响的研究,国内外文献未见报道。为开发蒲公英在防治猪链球菌病的应用,采用蒲公英水提取物对体外猪链球菌生物被膜的形成进行干预,探讨蒲公英抗猪链球菌的机制,为今后蒲公英防治猪链球菌病的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株:猪链球菌分离株,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供并鉴定;蒲公英饮片,购自中国药材集团黑龙江省药材公司;卡尔加里生物被膜培养装置,购自加拿大 Innovotech 有限公司;THB(Todd-Hewitt broth)培养基,购自中国青岛高科园海博生物技术有限公司;绿原酸对照品,购自中国药品生物

制品检定所;乙腈和甲醇为色谱纯。

### 1.2 主要仪器

酶标仪(SN239591,美国 Epoch),扫描电镜(S-3400N,日本),日本岛津 10 AVP 高效液相色谱仪,紫外检测器,CWS30 色谱工作站。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 蒲公英水提取物制备和绿原酸含量检测

称取蒲公英 200 g 于烧杯中,粉碎后加蒸馏水 1.6 L,室温浸泡过夜。煎煮 30 min,12 层纱布过滤,取滤液。再向滤渣内加入蒸馏水 1.2 L 煎煮 30 min,同样用 12 层纱布过滤,合并滤液。滤液以 3 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min,取上清液,用旋转蒸发仪浓缩至 100 mL,再利用真空冷冻干燥机冻干至粉末<sup>[8]</sup>。准确称量蒲公英冻干粉 1 g,用 2 mL 双蒸水溶解,用 0.22 μm 滤膜过滤,保存在-20 °C 备用。

参照中国兽药典蒲公英的鉴定方法<sup>[8]</sup>,以绿原酸作为标准品,高效液相色谱法测得蒲公英水提取物中绿原酸含量。

#### 1.3.2 蒲公英水提取物和绿原酸对猪链球菌最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC)测定

MIC 的测定参照 I. Wiegand 等<sup>[9]</sup>微量肉汤稀释法进行。将猪链球菌菌株接种于 THB 琼脂平板,37 °C 培养过夜。取单个菌落接种于 THB 培养基中,37 °C 培养 12~16 h。比浊法将菌液浓度先调整为 0.5 麦氏菌悬液(1.0 × 10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>),然后用 THB 培养基稀释为约 1.0 × 10<sup>6</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>。依次向无菌 96 孔细胞培养板加入 THB 培养基,除第 1 孔加入 160 μL THB 培养基外,其余每管加入 100 μL THB,在第 1 孔加入蒲公英水提取物 40 μL 混匀,然后吸取 100 μL 至第 2 孔,混匀后再吸取 100 μL 至第 3 孔,如此连续倍比稀释至第 11 孔,并从第 11 孔中吸取 100 μL 弃去,第 12 孔为不含药物的生长对照。然后在每孔内加入上述制备好的菌液 100 μL,使每孔最终菌液浓度约为 5 × 10<sup>5</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>,混匀后盖好,于 37 °C 孵育 24 h。以肉眼观察,无细菌生长的药物最低浓度孔,即为各蒲公英水提取物对 *S. suis* 的 MIC。

从 MIC 终点孔到第 1 孔中分别吸取 50  $\mu\text{L}$  液体接种于 THB 平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱中孵育 24 h。观察结果, 接种平板中未见菌体生长的最低药物浓度为 MBC。

1.3.3 猪链球菌生物膜形成能力测定 参照周永辉等<sup>[10]</sup>方法, 首先将猪链球菌菌株于无菌条件下在 THB 琼脂平板上传代 2 代进行分离, 从 THB 琼脂平板上挑取单个菌落, 接种于无菌 THB 液体试管中, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 18 h 后, 比浊法将菌液浓度先调整为 0.5 麦氏菌悬液 ( $1.0 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 再用 THB 液体培养基稀释, 使菌液浓度约为  $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每孔 200  $\mu\text{L}$  菌液加到卡尔加里装置底部板内, 只含 THB 液体培养基的孔为对照组, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 50  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床上培养 72 h。设置空白对照组 (THB 培养基) 和阳性对照组 (1/2 环丙沙星)。参照 S. Stepanovic 等的方法<sup>[11]</sup> 分别用空白对照组 (THB 培养基)、阳性对照组 (1/2MIC 环丙沙星)、阴性对照组 (猪链球菌菌液) 共同培养 72 h 后染色, 酶标仪 595 nm 处测定 OD 值。判断猪链球菌生物被膜的形成能力。

1.3.4 不同浓度蒲公英水提取物及不同浓度绿原酸对链球菌生物被膜干预作用 将浊度为 0.5 麦氏菌悬液稀释到  $1.0 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 向卡尔加里生物被膜装置每孔中加菌液和蒲公英水提取物共 200  $\mu\text{L}$  (浓度分别为 1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC、1/16MIC、1/32MIC), 另设空白对照孔 (只加培养基) 和阴性对照孔 (只加菌液), 每个样品 5 个重复。37  $^{\circ}\text{C}$ , 50  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床上孵育 72 h, PBS 清洗 2 次, 固定, 染色, 酶标仪 595 nm 处测定 OD 值。

1.3.5 蒲公英水提取物及绿原酸对链球菌生物被膜

干预作用形态学观察 从卡尔加里被膜装置中取出所需观察的桩钉, 并使用灭菌 PBS (pH 7.2) 轻轻洗涤 3 次以去除游离菌。用 pH 7.2 戊二醛在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中固定 1 h。依次用 pH 7.2 PBS 冲洗 2 次, 每次均为 10 min。用 50%、70%、90% 乙醇各脱水一次, 每次 10 min; 再用 100% 乙醇脱水 2 次, 每次 10 min, 最后用 100% 乙醇与叔丁醇 (1:1) 混合液和纯叔丁醇各脱水一次后, 每次 15 min。然后将样品送电镜中心进行扫描电子显微镜下观察。

1.3.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件对相关数据进行统计分析, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计资料的比较采用单因素方差分析 (ANOVA),  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 蒲公英水提取物中绿原酸含量

测定绿原酸标准品和蒲公英水提取物最大吸收峰的波长为 327 nm, 蒲公英水提取物出现最大吸收峰的波长与标准品的波长和时间均一致。经 HPLC 分离检测, 蒲公英水提取物在 5 min 左右检测到的物质为绿原酸 (图 1、图 2)。以绿原酸标准品的系列质量浓度  $x (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$  为横坐标, 峰面积  $y$  为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程:  $y = 70\,223x + 4.7 \times 10^5$ ,  $R^2 = 0.999\,9$ , 结果表明绿原酸进样量在 0.02~0.12  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好。按中华人民共和国兽药典第二部<sup>[8]</sup>方法制备供试品溶液, 进样 20  $\mu\text{L}$ , 在 5 min 时测得其峰面积为 2 099 255, 供试品溶液测得蒲公英水提取物中绿原酸的含量为 5.833  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (图 3)。

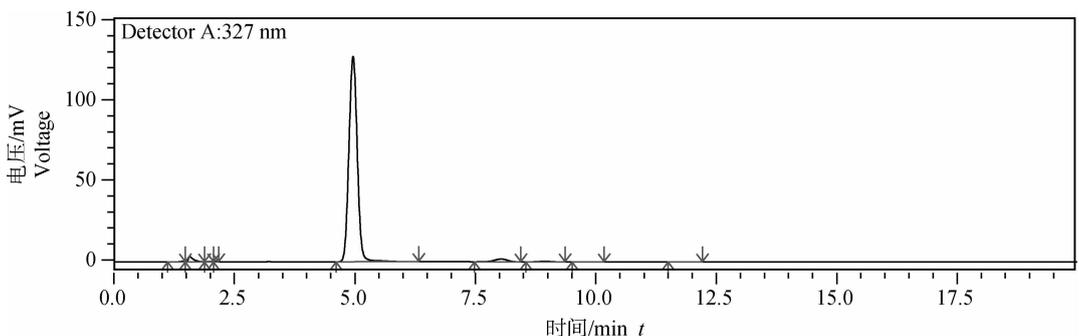


图 1 绿原酸

Fig. 1 Chlorogenic acid

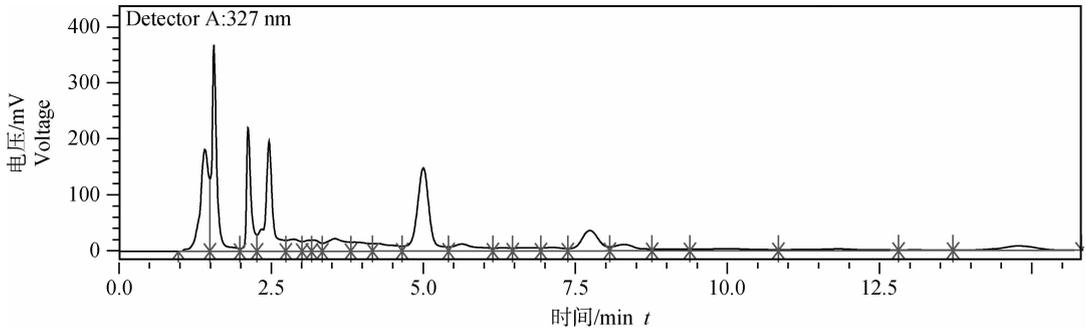


图2 蒲公英水提取物  
Fig.2 Dandelion aqueous extract

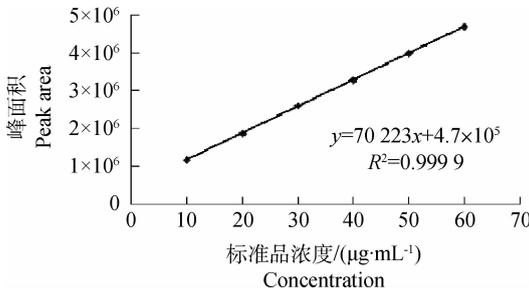


图3 绿原酸标准曲线  
Fig.3 Chlorogenic acid standard curve

2.2 蒲公英水提取物对猪链球菌的 MIC 和 MBC

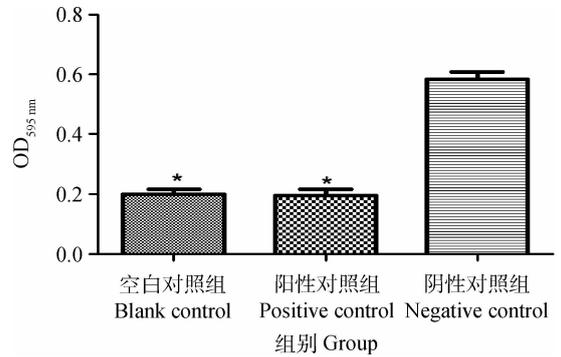
通过微量稀释法测定了蒲公英水提取物对猪链球菌的 MIC 和 MBC 分别为和  $62.5$  和  $250\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。绿原酸对猪链球菌的 MIC 和 MBC 分别为和  $2.5$  和  $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 猪链球菌生物被膜形成能力

空白对照组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.199\ 0\pm 0.017\ 7$ ) 明显低于阴性对照组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.582\ 0\pm 0.025\ 9$ ), 且差异极显著 ( $P<0.01$ )。阳性对照组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.194\ 0\pm 0.020\ 7$ ) 明显低于阴性对照组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值, 差异极显著 ( $P<0.01$ )。猪链球菌形成生物被膜能力较强。试验结果见图 4。

2.4 亚 MIC 对猪链球菌生物被膜的干预作用

2.4.1 蒲公英水提取物亚 MIC 对猪链球菌生物被膜的干预作用  $1/2\text{MIC}$  蒲公英水提取物组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.226\ 8\pm 0.031\ 6$ )、 $1/4\text{MIC}$  蒲公英水提取物组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.262\ 4\pm 0.034\ 4$ )、 $1/8\text{MIC}$  蒲公英水提取物组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.346\ 0\pm 0.040\ 4$ )、 $1/16\text{MIC}$  蒲公英水提取物组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.460\ 0\pm 0.037\ 4$ )、阳性对照组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.194\ 0\pm 0.020\ 7$ ) 均显著低于阴性对照组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.582\ 0\pm 0.025\ 9$ ), 差异极显著 ( $P<0.01$ )。  $1/32\text{MIC}$  蒲公英水提取物组



\*.  $P<0.01$ , 差异极显著, 下图同  
\*.  $P<0.01$ , extremely significant difference. The same as below

图4 猪链球菌生物被膜形成能力 ( $n=5, \bar{x}\pm s$ )  
Fig.4 The ability of biofilm formation of *Streptococcus suis* ( $n=5, \bar{x}\pm s$ )

$\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.568\ 0\pm 0.026\ 8$ ), 低于阴性对照组  $\text{OD}_{595\ \text{nm}}$  值 ( $0.582\ 0\pm 0.025\ 9$ ), 差异显著 ( $P<0.05$ )。蒲公英水提取物对猪链球菌有干预作用, 呈剂量依赖性。试验结果见图 5。

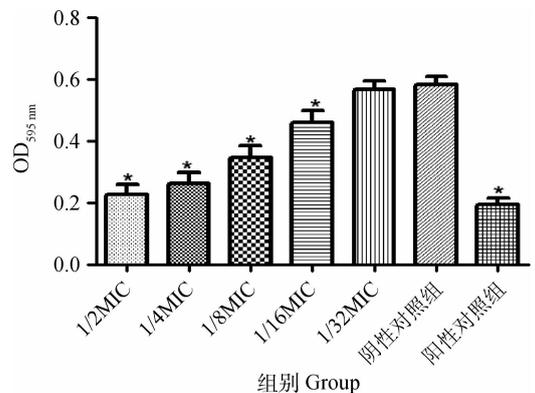


图5 蒲公英水提取物对猪链球菌生物被膜干预作用 ( $n=5, \bar{x}\pm s$ )  
Fig.5 The water extract of dandelion on *Streptococcus suis* biofilm intervention role ( $n=5, \bar{x}\pm s$ )

2.4.2 绿原酸亚 MIC 对猪链球菌生物被膜的干预作用 1/2MIC 绿原酸组  $OD_{595\text{ nm}}$  值( $0.2268 \pm 0.0116$ ), 1/4MIC 绿原酸组  $OD_{595\text{ nm}}$  值( $0.2624 \pm 0.0544$ ), 1/8MIC 绿原酸组  $OD_{595\text{ nm}}$  值( $0.3460 \pm 0.0254$ ), 1/16MIC 绿原酸组  $OD_{595\text{ nm}}$  值( $0.4605 \pm 0.0392$ ), 阳性对照组  $OD_{595\text{ nm}}$  值( $0.1937 \pm 0.0217$ ), 均明显低于阴性对照组  $OD_{595\text{ nm}}$  值( $0.5992 \pm 0.0241$ ), 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。1/32MIC 绿原酸组  $OD_{595\text{ nm}}$  值( $0.5782 \pm 0.0299$ ) 低于阴性对照组  $OD_{595\text{ nm}}$  值( $0.5828 \pm 0.0237$ ), 差异显著 ( $P < 0.05$ )。绿原酸对猪链球菌有干预作用, 呈剂量依赖性。试验结果见图 6。

## 2.5 蒲公英水提取物及绿原酸对猪链球菌干预作用的形态学观察

扫描电镜观察, 阴性对照组细菌镶嵌于生物被膜中, 细菌周围有厚厚的黏液层, 而蒲公英水提取物和绿原酸均能够使细菌生物被膜发生明显变化, 细菌

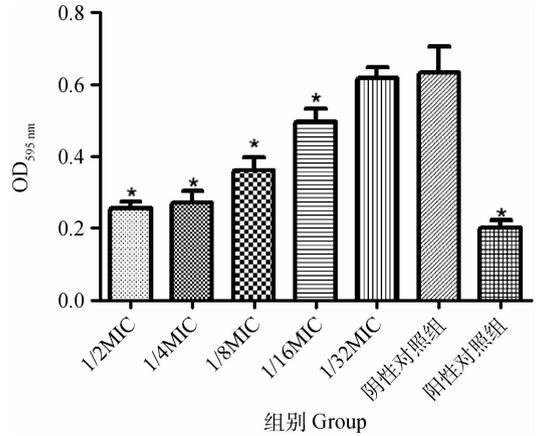


图 6 绿原酸对猪链球菌生物被膜干预作用 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )  
Fig. 6 Chlorogenic acid of *Streptococcus suis* biofilm intervention role ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

数减少, 未见有黏液成分和胞外基质, 蒲公英水提取物和绿原酸的抑制生物被膜形成与剂量相关, 呈剂量的依赖性, 见图 7、8。

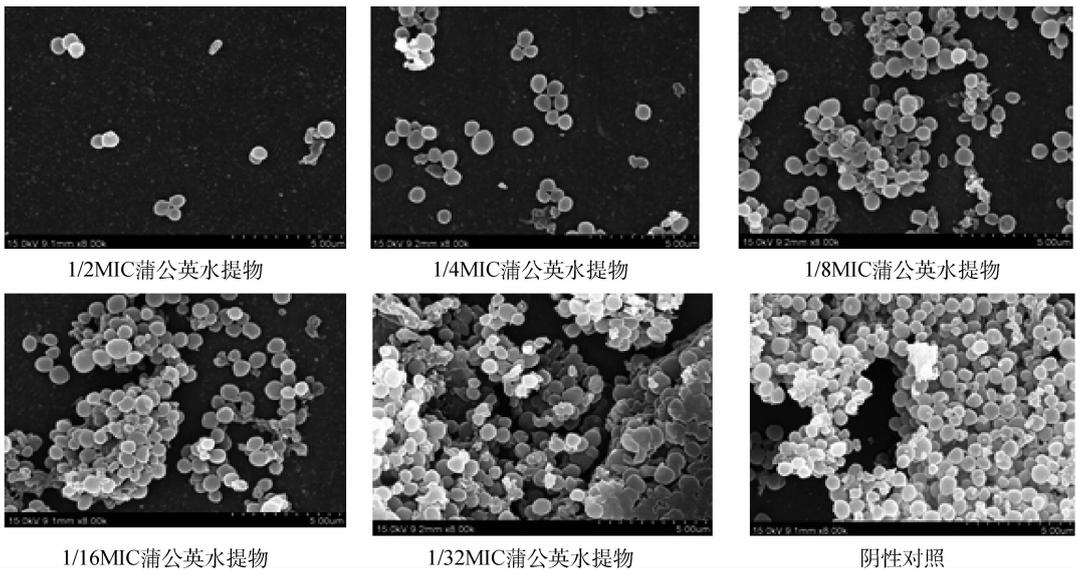


图 7 扫描电镜 ( $8\ 000\times$ ) 下不同浓度蒲公英水提取物对猪链球菌生物被膜的形态学影响

Fig. 7 Different concentrations of aqueous extract of dandelion on biofilm morphology of *Streptococcus suis* were observed under scanning electron microscope ( $8\ 000\times$ )

## 3 讨论

已有报道绿原酸为蒲公英中主要药效活性成分, 含量较高<sup>[12-13]</sup>, 但为了确证蒲公英水提取物中绿原酸的含量, 作者利用高效液相色谱对其进行分析, 结果表明蒲公英水提取物中绿原酸含量为  $5.833\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 含量较高, 这与报道的相一致。为了明

确蒲公英水提取物对猪链球菌抑菌和杀菌作用的主要药效成分是否为绿原酸, 试验分别测定蒲公英水提取物和绿原酸对猪链球菌的最低抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC), 从测得的结果看, 绿原酸的 MIC 和 MBC 均低于蒲公英水提取物的浓度, 而且二者相差数十倍, 表明绿原酸为蒲公英水提取物中抗菌的主要药效成分。

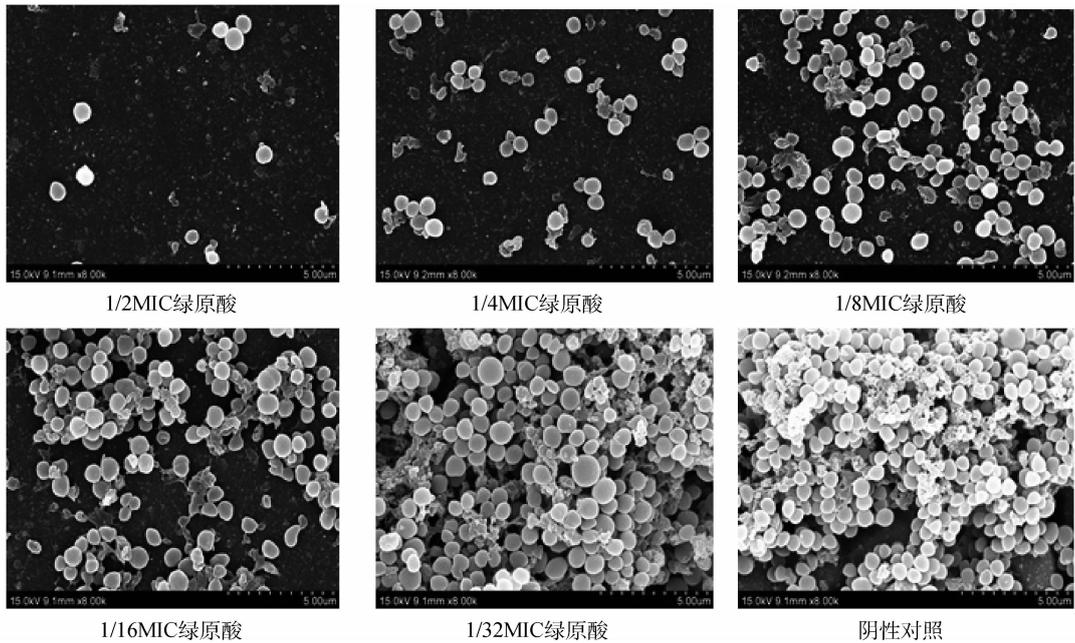


图 8 扫描电镜(8 000×)下不同浓度绿原酸对猪链球菌生物被膜的形态学影响

Fig. 8 Different concentration of chlorogenic acid on the morphology of *Streptococcus suis* biofilm were observed under scanning electron microscope(8 000×)

猪链球菌在体内定植常以生物被膜形式生存,生物被膜可以阻止和抑制巨噬细胞、白细胞、抗体及抗生素进入生物被膜中清除或杀灭细菌,导致链球菌反复感染,难以控制<sup>[14]</sup>。生物被膜一旦形成,膜内细菌比浮游细菌耐药性增加 100~1 000 倍以上,是细菌毒力增强的重要因素。因此,筛选一种能够抑制猪链球菌生物被膜形成药物,是治疗猪链球菌病的关键。已有研究报道绿原酸对铜绿假单胞菌生物被膜<sup>[5]</sup>、葡萄球菌生物被膜<sup>[6]</sup>、口腔中多种细菌的生物被膜<sup>[7]</sup>等均有抑制作用,但绿原酸干预猪链球菌生物被膜形成是否具有抑制作用,国内外文献未见报道。作者采用 1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC、1/16MIC 蒲公英水提取物及 1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC、1/16MIC 绿原酸对猪链球菌生物被膜形成进行干预,结果表明蒲公英水提取物及绿原酸对猪链球菌生物被膜均有明显的抑制作用,并呈剂量依赖性;电镜观察可见阴性对照组细菌镶嵌于生物被膜中,细菌周围有厚厚的黏液层,而蒲公英水提取物和绿原酸均能使细菌生物被膜中的细菌数量和生物被膜的形态发生明显变化,细菌数量明显减少,未见有黏液成分和胞外基质分泌,二者对生物被膜的抑制作用均呈剂量依赖性。

蒲公英水提取物中含有多种成分,本试验只对蒲公英水提取物中的绿原酸进行考察,通过蒲公英水提

物和绿原酸对猪链球菌生物被膜的形成抑制作用进行比较,表明蒲公英水提取物中抑制猪链球菌生物被膜形成的主要活性成分为绿原酸,但蒲公英水提取物中的其他成分对猪链球菌生物被膜形成的抑制作用如何,有待今后进一步研究。

试验结果已经证明蒲公英水提取物对体外猪链球菌生物被膜的形成具有抑制作用,但对猪链球菌病是否具有治疗与预防作用,还有待于今后对猪链球菌病进行临床试验研究。

#### 4 结 论

蒲公英水提取物对体外猪链球菌生物被膜形成具有抑制作用,并呈剂量依赖性;蒲公英水提取物对体外猪链球菌生物被膜形成抑制作用的主要活性成分为绿原酸。

#### 参考文献(References):

- [1] BONIFAIT L, GOTTSCHALK M, GRENIER D. Cell surface characteristics of nontypeable isolates of *Streptococcus suis* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 311(2): 160-166.
- [2] GRENIER D, GRIGNON L, GOTTSCHALK M. Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate [J]. *Vet J*, 2009, 179(2):

- 292-295.
- [3] WANG H B. Cellulase-assisted extraction and antibacterial activity of polysaccharides from the dandelion *Taraxacum officinale*[J]. *Carbohydr Polym*, 2014,103:140-142.
- [4] 吴卫华,康 楨,欧阳冬生,等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(4): 691-694.  
WU W H, KANG Z, OUYANG D S, et al. Progress in the pharmacology of chlorogenic acid [J]. *Natural Products Research and Development*, 2006, 18(4): 691-694. (in Chinese)
- [5] 温红侠,陈一强,朱莲娜,等. 绿原酸对铜绿假单胞菌生物膜干预作用的体外研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(12): 1478-1481.  
WEN H X, CHEN Y Q, ZHU L N, et al. Intervention of chlorogenic acid on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2009, 19(12): 1478-1481. (in Chinese)
- [6] LUÍS Â, SILVA F, SOUSA S, et al. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids[J]. *Biofouling*, 2014, 30(1): 69-79.
- [7] ANTONIO A G, IORIO N L, FARAH A, et al. Effect of coffee canephora aqueous extract on microbial counts in *ex vivo* oral biofilms: a case study[J]. *Planta Med*, 2012, 78(8): 755-760.
- [8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 第2部. 北京: 中国农业出版社, 2010: 295.  
The Chinese veterinary drug standard committee. Veterinary drug standard of the People's Republic of China[M]. Part ii. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 295. (in Chinese)
- [9] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 163-175.
- [10] 周永辉,王淑杰,黄全勇,等. 猪链球菌的分型鉴定及其体外形成生物被膜的研究[J]. *中国兽医杂志*, 2014, 50(12): 3-5.  
ZHOU Y H, WANG S J, HUANG Q Y, et al. Identification of the *Streptococcus suis* and determination of the biofilm formation *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 50(12): 3-5. (in Chinese)
- [11] STEPANOVIC S, VUKOVIC D, DAKIC I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation [J]. *J Microbiol Methods*, 2000, 40(2): 175-179.
- [12] 黄文平,肖光清,宋永贵,等. 不同产地拳参中没食子酸和绿原酸的含量比较[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(1): 207-209.  
HUANG W P, XIAO G Q, SONG Y G, et al. To compare gallic acid and chlorogenic acid in *Polygonum bistorta* L. from different areas[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2015, 26(1): 207-209. (in Chinese)
- [13] AKYUZ E, ŞAHIN H, ISLAMOĞLU F, et al. Evaluation of Phenolic Compounds in *Tilia rubra* Subsp. *caucasica* by HPLC-UV and HPLC-UV-MS/MS[J]. *Int J Food Prop*, 2014, 17(2): 331-343.
- [14] 汪 洋. 猪链球菌生物被膜形成及致病机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 1-10.  
WANG Y. Study on the mechanism of biofilm formation and molecular pathogenesis of *S. suis*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011: 1-10. (in Chinese)

(编辑 白永平)