

引用格式:邵菊芳,龚春生,方婷婷,等. 银杏叶黄酮对大肠杆菌生物膜的抑制作用[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2021, 48(6): 57–63.

SHAO JuFang, GONG ChunSheng, FANG TingTing, et al. Inhibitory effect of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves on *Escherichia coli* biofilms[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2021, 48(6): 57–63.

银杏叶黄酮对大肠杆菌生物膜的抑制作用

邵菊芳 龚春生 方婷婷 王翔宇 陈泽坤 朱红威*

(中国矿业大学 化工学院, 徐州 221116)

摘要:以乙醇为提取溶剂从银杏叶中提取总黄酮,使用 DA201 大孔树脂对其进行纯化;测定了银杏叶黄酮对大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC),并考察了对大肠杆菌生物膜形成和黏附性的影响,使用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)测定了银杏叶黄酮对胞外多糖含量的影响。结果表明,银杏叶黄酮对大肠杆菌的 MIC 为 4 mg/mL;银杏叶黄酮对大肠杆菌生物膜的形成和黏附有抑制作用,其质量浓度为 1 倍 MIC 时,生物膜形成抑制率为 59.09%,黏附性抑制率为 28.99%;其质量浓度在 1 倍 MIC 以上时,对大肠杆菌生物膜多糖的形成有明显的抑制作用。

关键词:银杏叶;黄酮;大肠杆菌;生物膜

中图分类号: R155.5 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2021.06.008

引言

细菌生物膜是由细菌菌群分泌的黏液所形成的保护膜,可以避免或减少菌体受到外界环境的侵害。相对单个、分散、游离细菌的生存状态,生物膜是细菌适应外界环境的一种特殊生存形式。细菌生物膜是导致食源性疾病的主要诱因,可以造成食物变质,引发公共卫生问题^[1-2],因此在食品安全领域备受瞩目^[3]。根据美国全国卫生研究所(NIH)预计,当食品污染事件发生时,问题的来源往往就是生物膜^[4]。1996年因大肠杆菌(*Escherichia coli*) O157 污染导致的日本多所小学集体食物中毒事件,是人们熟知的重大公共卫生事件之一。因此,消除或抑制细菌生物膜对于保障人们的身体健康具有重要意义。

细菌生物膜可以使致病菌的耐药性提高,还能

躲避宿主免疫系统的攻击^[5-6],具有顽固难清除的特点^[7]。目前常用的消毒剂和抗菌剂对致病菌生物膜的清除效果并不明显,且这些消毒剂多为化学物质,对环境不友好。因此,寻找安全有效的消毒剂是食品安全领域亟待解决的问题之一。

近年来,天然植物成分对生物膜的抑制成为研究热点之一。天然植物中活性成分的种类繁多,且具有无毒、安全、环境友好等特点,成为筛选抑制细菌生物膜的优势资源库^[8-13]。药用植物银杏(*Ginkgo biloba*)是我国传统且特有的树种,其中多种活性成分具有抑菌、抗感染的效果,作用靶点多,在治疗细菌感染方面独具优势。吴海霞^[14]研究证明,银杏种仁酚酸对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌均有较强的抑制作用,银杏种仁多糖对枯草芽孢杆菌有较强的抑制作用,银杏种仁蛋白对革兰氏阴性和阳性细菌均有抑制作用。黄小炯等^[15]研究发现银杏果中的抗菌蛋白对大肠杆菌有较强的抑菌效果。赵琪珂^[16]研究表明银杏叶多糖对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、八叠球菌和金黄色葡萄球菌均有不同程度的抑制作用,其中对大肠杆菌的抑制效果最好。邵菊芳^[17]研究发现,当 2.25 mg/mL 银杏细胞黄酮与大肠杆菌作用 10 h 时,对大肠杆菌的抑制率高达 81%。以上研究主要集中在银杏各成分对细菌菌体的抑制方面,而对细菌生物膜影响的研究甚少。因此,为了开发

收稿日期: 2021-08-18

基金项目: 徐州市重点研发计划项目(KC20055);中国矿业大学实验室开放基金项目;中国矿业大学大学生创新创业训练计划

第一作者: 女,1978年生,高级实验师

* 通信联系人

E-mail: zhuhw@cumt.edu.cn

潜在的植物源杀菌消毒剂,本文以乙醇为提取溶剂从银杏叶中提取总黄酮,考察了银杏叶黄酮对大肠杆菌生物膜形成和黏附性的影响,以期为解决食品领域的细菌生物膜污染问题提供参考。

1 实验部分

1.1 实验材料和仪器

1.1.1 实验材料

银杏叶采自中国矿业大学南湖校区校园内银杏树,品种为佛手;大肠杆菌 BL21 菌株、LB 无菌液体培养基、U 型 96 孔板,生工生物工程(上海)股份有限公司;芦丁标准品、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、牛肉膏、酵母膏、蛋白胨、琼脂、结晶紫、冰乙酸、甲醇、氯化钾、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、葡萄糖、3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂、酚酞、盐酸、氢氧化钠,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;DA201 大孔树脂,天津波鸿树脂科技有限公司。

1.1.2 实验仪器

DZF-6050 型真空干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;UV1780 型紫外可见分光光度计,岛津企业管理(中国)有限公司;EL-204 型分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;SCIENTZ-II 型超声波粉碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;RE-52AA 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;PYX-DHS-350 型恒温培养箱、HYL-B 型恒温摇床,太仓市璜泾镇强乐实验设备厂;SW-CJ-2D 型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;2-16P 型高速离心机,德国 Sigma 公司。

1.2 总黄酮标准曲线绘制^[18]

配制质量浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁标准液 100 mL,分别取芦丁标准液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 置于 25 mL 刻度试管中,用 30% (体积分数)乙醇补至 12.5 mL,加入 0.7 mL NaNO₂ 溶液(0.05 g/mL),摇匀,放置 5 min 后加入 0.7 mL Al(NO₃)₃ 溶液(0.1 g/mL),放置 5 min 后加入 5 mL 1 mol/L NaOH 溶液,混匀,用 30% 乙醇稀释至刻度,混匀,静置 10 min。使用紫外可见分光光度计于 510 nm 波长处测定吸光度,以芦丁的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.3 总黄酮的提取纯化

采摘新鲜银杏叶 500 g,于 65 ℃ 烘干至恒重,研磨成粉末,过 60 目筛(筛孔尺寸为 0.25 mm)备用^[19]。称取银杏叶粉末 10 g,以 150 mL 75% (体积

分数)乙醇为提取溶剂,超声波破碎处理,于 30 ℃ 振荡 2 s、间歇 1 s,处理 20 min。置于 65 ℃ 的恒温水浴中 1 h,过滤,将滤渣重新加入 150 mL 75% 乙醇中,加热 3 h,过滤,弃滤渣,合并滤液^[20]。利用 1.2 节绘制的标准曲线计算总黄酮的提取率,计算公式如下。

$$E = \frac{m_0}{m} \times 100\%$$

式中, E 为总黄酮的提取率,%; m_0 为提取液中黄酮的质量,g; m 为银杏叶粉末的质量,g。

使用 DA201 大孔树脂将黄酮初提液纯化^[21],使用旋转蒸发仪将纯化后的黄酮提取液减压浓缩,真空干燥,制得干粉保存备用。

1.4 生物膜的培养^[22]

将活化的大肠杆菌 BL21 接种至 100 mL LB 液体培养基中,于 37 ℃ 以 200 r/min 在恒温摇床中培养 24 h,取对数生长期的细菌稀释 100 倍,以每孔 0.1 mL 加入到 U 型 96 孔板中。每孔菌液中加入 0.1 mL LB 培养基,混匀,以每孔 0.2 mL 的 LB 培养基为对照,在恒温培养箱中于 37 ℃ 恒温培养。

1.5 生物膜生长曲线测定

吸去菌液,用磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.4)洗板 3 次,吸去洗液后晾干。加入甲醇固定 20 min,吸去液体后晾干。将 0.05 mL 结晶紫染色液(0.01 g/mL)加入孔板,轻摇使染色均匀。静置 5 min,用去离子水冲洗孔板,晾干。吸取 0.2 mL 33% (体积分数,下同)冰乙酸加入孔板,待生物膜完全溶解,加入到 25 mL 刻度试管中,用 33% 冰乙酸补至 5 mL。使用紫外可见分光光度计在 600 nm 处测量不同培养时间的溶液的吸光度,以培养时间为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制生物膜生长曲线。

1.6 大肠杆菌抑菌率测定^[23]

将黄酮干粉配制质量浓度为 16、8、4、2、1、0.5、0.25 mg/mL 的 7 个梯度,以水为空白对照。取各浓度的黄酮溶液稀释 1 倍,以每孔 0.1 mL 加入到 U 型 96 孔板中,每个浓度做 3 个平行,共接种 24 孔。将活化培养 24 h 的大肠杆菌菌液稀释 10 万倍,各孔黄酮稀释液中接种 0.1 mL 菌液,于 37 ℃ 在恒温培养箱中培养 24 h。将培养液涂布在牛肉膏蛋白胨培养基上,每组涂布 3 个平板。于 37 ℃ 恒温培养 24 h,对菌落进行计数。没有大肠杆菌生长的平板上对应的银杏叶黄酮浓度为最小抑菌浓度(MIC),按照下式计算对大肠杆菌的抑菌率。

$$R_i = \frac{n_0 - n}{n_0} \times 100\%$$
式中, R_i 为抑菌率, %; n_0 为空白对照的菌落数; n 为实验组的菌落数。

1.7 银杏叶黄酮对生物膜的影响

1.7.1 生物膜的分离

按照 1.4 节的方法接种大肠杆菌, 将质量浓度为 0 (空白对照)、0.5、1、2 倍 MIC 的黄酮溶液稀释 1 倍后取 1 mL 加入到菌液中, 于 37 ℃ 恒温培养 48 h。称量各离心管的质量后, 参照 1.5 节的方法溶解生物膜后, 将各孔板中的菌液分别移入离心管, 于 7800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 测定离心管加沉淀物的质量, 按照下式计算生物膜质量。

$$G_f = G - G_l$$
式中, G_f 为生物膜质量, mg; G 为离心管加沉淀物的质量, mg; G_l 为离心管的质量, mg。

1.7.2 生物膜形成抑制率及黏附性抑制率测定

按 1.4 节的培养方法, 经 0 (空白对照)、0.25、0.5、1 倍 MIC 的银杏叶黄酮处理的大肠杆菌生物膜, 于 37 ℃ 培养 24 h。按 1.7.1 节的方法分离生物膜, 测定生物膜质量, 按照下式计算生物膜形成抑制率。

$$R_f = \frac{G_0 - G_1}{G_0} \times 100\%$$
式中, R_f 为生物膜形成抑制率, %; G_0 为空白对照的生物膜质量, mg; G_1 为银杏叶黄酮抑制后的生物膜质量, mg。

按照 1.5 节的方法将生物膜进行染色洗板, 用 33% 冰乙酸溶解生物膜, 并补至 3 mL。使用紫外可见分光光度计在 600 nm 处测量各样品染色液的吸光度, 按照下式计算生物膜黏附性抑制率。

$$R_a = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$
式中, R_a 为黏附性抑制率, %; A_0 为空白对照的吸光度; A 为实验组的吸光度。

1.7.3 葡萄糖标准曲线绘制^[24]

配制 10 mg/mL 葡萄糖标准液, 分别取 1.6、3.2、4.8、6.4、8、9.6 mL 加入到 25 mL 刻度试管, 加去离子水补至 20 mL, 加入 1.5 mL DNS 试剂后摇匀, 沸水浴加热 5 min。加去离子水补至 25 mL, 混匀。以未加入葡萄糖标准液的样液为空白, 使用紫外可见分光光度计在 540 nm 处测定各管溶液的吸光度。以葡萄糖的质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘

制标准曲线。

1.7.4 胞外多糖的水解、提取及生物膜多糖含量的测定^[25]

于装有生物膜的离心管中加入 0.1 mL 6 mol/L 盐酸及 0.15 mL 去离子水, 吸出样液加入到 25 mL 刻度试管中, 在水浴锅中于 100 ℃ 水解 30 min。在此过程中防止蒸干, 适当加入几滴蒸馏水, 水解后测量其体积。待水解液冷却后, 加入 1 滴酚酞指示剂, 加入 6 mol/L NaOH 溶液中和变色, 得到待测液, 测量其体积。取 0.4 mL 待测液, 加入 0.3 mL DNS 试剂, 在沸水浴中加热 5 min, 取出后加入去离子水补至 5 mL, 混匀, 得到测定液。以不加生物膜的离心管为空白, 使用紫外可见分光光度计在 540 nm 处测定吸光度, 利用葡萄糖标准曲线, 按照下式计算胞外多糖含量。

$$C = \frac{5A_0VM}{0.4 \times 0.9} \times 100\%$$
式中, C 为胞外多糖含量, %; A_0 为空白对照的吸光度; V 为待测液体积, mL; M 为生物膜质量, mg。

2 结果与讨论

2.1 黄酮标准曲线及黄酮含量测定结果

图 1 为芦丁的标准曲线。芦丁的质量浓度 ρ 与吸光度 A 的关系式为: $\rho = 6.1924 - 0.0008$, 决定系数 $R^2 = 0.999$, 表明在 0.008 ~ 0.048 mg/mL 的范围内, 芦丁的质量浓度与吸光度的线性关系良好。参照此标准曲线方程, 可得乙醇提取后提取液中黄酮的质量浓度为 0.15 mg/mL, 计算得到提取率为 1.71%。经 DA201 大孔树脂纯化后, 纯化液中黄酮的质量浓度为 1 mg/mL, 减压浓缩后黄酮的质量浓度可达 4.635 mg/mL, 表明黄酮类化合物经纯化、浓缩, 含量得到了显著的提高。

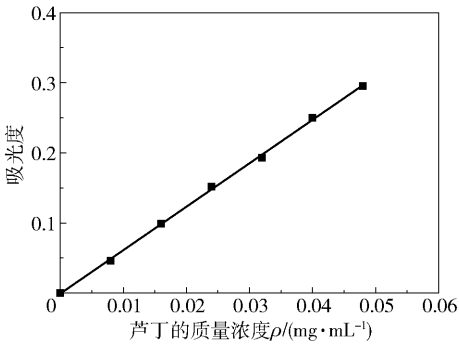


图 1 芦丁的标准曲线

Fig. 1 Standard curve for rutin

2.2 生物膜生长曲线

图2为大肠杆菌生物膜的生长曲线。生物膜的形成过程分为4个时期:黏附初期、黏附期、成熟期和脱落期^[12]。由图2可知,大肠杆菌菌株在37℃培养2h时完成初黏附,4h形成成熟的生物膜,4~8h生物膜脱落,8h之后生物膜开始新的生长周期。在接下来的周期中,由于代谢产物的积累和营养物质的消耗,生物膜的生长变慢,周期变长。根据生长曲线,培养时间为12h时生物膜最强壮,胞外基质最丰富,黏附性最强。

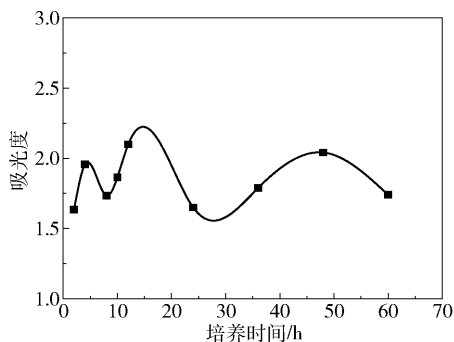


图2 大肠杆菌生物膜的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *E. coli* biofilm

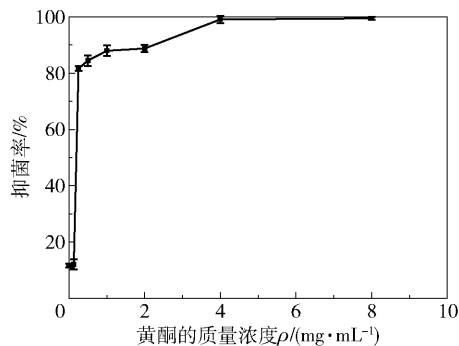
2.3 银杏叶黄酮对大肠杆菌抑菌率的影响

图3为不同质量浓度的银杏叶黄酮对大肠杆菌抑制率的影响。由图3可知,4 mg/mL和8 mg/mL的银杏叶黄酮对大肠杆菌的生长有显著的抑制作用,抑菌率分别为99.59%和99.25%;0.25~2 mg/mL银杏叶黄酮的抑菌率为82.63%~89.42%;0.125 mg/mL银杏叶黄酮的抑菌率与空白对照组无明显差别,抑菌率约为16%。由此得出银杏叶黄酮对大肠杆菌的MIC为4 mg/mL。相对于肉桂(MIC为3.125 mg/mL)、丁香(MIC为6.25 mg/mL)等抑制作用广泛、用量低的植物杀菌剂^[26],银杏叶黄酮对大肠杆菌的抑菌活性为中等水平。

2.4 银杏叶黄酮对生物膜形成量及黏附性的影响

图4为银杏叶黄酮对大肠杆菌生物膜形成量及黏附性的影响。由图4可知,当银杏叶黄酮的质量浓度为0.25倍和0.5倍MIC时,生物膜形成抑制率分别为22.72%和15.91%;质量浓度为1倍MIC时生物膜形成抑制率为59.09%,相比0.25倍和0.5倍MIC组分别提高了36.37%和43.18%。结果表明,银杏叶黄酮的质量浓度为1倍MIC时,对生物膜形成的抑制效果显著。

当银杏叶黄酮的质量浓度为0.25倍和0.5倍



$n=3$,结果以“平均值±标准差”表示,下同。

图3 不同质量浓度的银杏叶黄酮对大肠杆菌抑菌率的影响

Fig. 3 Effect of different mass concentrations of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves on the antibacterial rate of *E. coli*

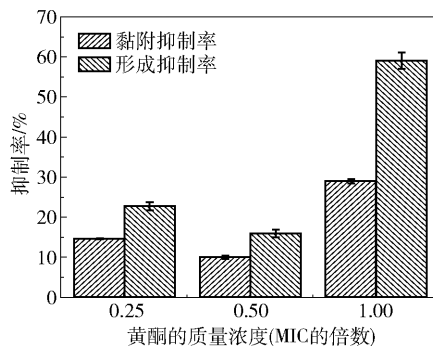


图4 银杏叶黄酮对大肠杆菌生物膜形成量及黏附性的影响

Fig. 4 Effects of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves on the formation and adhesion of *E. coli* biofilms

MIC时,黏附性抑制率分别为14.63%和10.02%;质量浓度为1倍MIC时黏附性抑制率为28.99%,相比0.25倍和0.5倍MIC组分别提高了14.36%和18.97%。结果表明,银杏叶黄酮的质量浓度为1倍MIC时,对生物膜黏附的抑制效果显著。

2.5 葡萄糖标准曲线及银杏叶黄酮对胞外多糖含量的影响

图5为葡萄糖的标准曲线。由图5可得葡萄糖的质量浓度 ρ 与吸光度 A 的关系式为: $\rho = 0.21A - 0.0252$, $R^2 = 0.9981$,表明在0.8~4.8 mg/mL的范围内,葡萄糖的质量浓度与吸光度的线性关系良好。

图6为银杏叶黄酮对大肠杆菌生物膜胞外多糖含量的影响。由图6可知,银杏叶黄酮的质量浓度为1倍和2倍MIC时对生物膜多糖的抑制效果较为明显,在培养24h时,胞外多糖含量相比对照组(0 MIC)分别减少了1.83%和2.12%。银杏

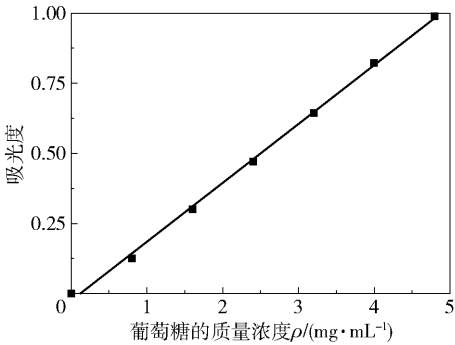


图 5 葡萄糖的标准曲线
Fig.5 Standard curve for glucose

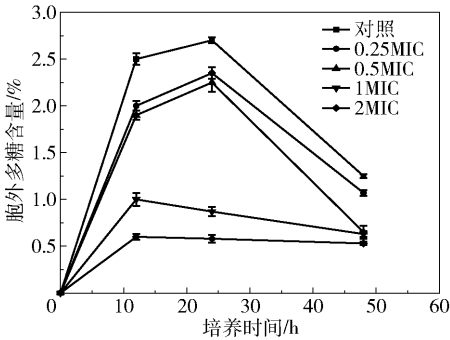


图 6 不同质量浓度的银杏叶黄酮对大肠杆菌生物膜胞外多糖含量的影响

Fig.6 Effect of different mass concentrations of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves on the content of extracellular polysaccharides in *E. coli* biofilms

叶黄酮的质量浓度为 0.25 倍和 0.5 倍 MIC 时,对生物膜多糖合成的抑制效果微弱,在培养 48 h 时胞外多糖含量分别比对照组减少 0.18% 和 0.6%。结果表明,当银杏叶黄酮的质量浓度在 1 倍 MIC 以上时对大肠杆菌生物膜多糖的形成有明显的抑制作用。可以推测,银杏叶黄酮通过抑制胞外聚合物中多糖的分泌,抑制大肠杆菌生物膜的形成及黏附。

3 结论

银杏叶黄酮可抑制大肠杆菌菌体的生长,MIC 为 4 mg/mL;对大肠杆菌生物膜的形成和黏附有抑制作用,银杏叶黄酮的质量浓度为 1 倍 MIC 时,生物膜形成抑制率为 59.09%,黏附性抑制率为 28.99%;银杏叶黄酮的质量浓度在 1 倍 MIC 以上时,对大肠杆菌生物膜多糖的形成有明显的抑制作用。

参考文献:

[1] RANGEL J M, SPARLING P H, CROWE C, et al. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982—2002 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, 11(4): 603—609.

[2] 刘飞, 宋定州, 李键, 等. 产志贺毒素大肠杆菌的流行病学及致病因子的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(1): 187—191.

LIU F, SONG D Z, LI J, et al. Research progress on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* epidemiology and virulence factors[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(1): 187—191. (in Chinese)

[3] 段韵涵, 韩北忠, 杨葆华, 等. 培养条件对金黄色葡萄球菌生物被膜生长的影响[J]. *中国酿造*, 2008(3): 17—20.

DUAN Y H, HAN B Z, YANG B H, et al. Effect of cultivation conditions on growth of *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. *China Brewing*, 2008(3): 17—20. (in Chinese)

[4] CHICUREL M. Bacterial biofilms and infections. Slime-busters[J]. *Nature*, 2000, 408(6810): 284—286.

[5] ALESSANDRIA V, RANTSIOU K, CAVALLERO M C, et al. Effect of atmospheric pressure plasma on *Listeria monocytogenes* attached to abiotic surfaces[J]. *Journal of Food Protection*, 2019, 82(2): 233—237.

[6] FLYNN P B, GILMORE B F. Understanding plasma bio-film interactions for controlling infection and virulence [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2018, 51(26): 263001.

[7] SANDASI M, LEONARD C M, VAN VUUREN S F, et al. Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial bio-films in vitro [J]. *South African Journal of Botany*, 2011, 77: 80—85.

[8] 吴泽钰. 柚皮苷对主要致龋细菌及生物膜作用的实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.

WU Z Y. Experimental study on the effect of naringin on oral major cariogenic bacteria and biofilm[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2020. (in Chinese)

[9] 袁曦玉. 新疆软紫草对主要致龋细菌及生物膜作用的实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.

YUAN X Y. Experimental study on the effect of *Arnebia euchroma* on main cariogenic bacteria and biofilms[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2020. (in Chinese)

[10] HONRAET K, NELIS H J. Use of the modified robbins device and fluorescent staining to screen plant extracts for

- the inhibition of *S. mutans* biofilm formation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64: 217–224.
- [11] WANG Y, LEE S M, DYKES G A. Potential mechanisms for the effects of tea extracts on the attachment, biofilm formation and cell size of *Streptococcus mutans* [J]. Biofouling, 2013, 29(3): 307–318.
- [12] 黄晓敏, 王婧婷, 汪若波, 等. 五倍子水提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(4): 536–539, 543.
HUANG X M, WANG J T, WANG R B, et al. Effects of Gallnut water extract on *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. China Journal of Modern Medicine, 2009, 19(4): 536–539, 543. (in Chinese)
- [13] FURIGA A, ROQUES C, BADET C. Preventive effects of an original combination of grape seed polyphenols with amine fluoride on dental biofilm formation and oxidative damage by oral bacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 116(4): 761–771.
- [14] 吴海霞. 银杏种仁抑菌蛋白及其抑菌机制研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2014.
WU H X. Study on antimicrobial activity and mechanism of protein from *Ginkgo biloba* seeds[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2014. (in Chinese)
- [15] 黄小炯, 区子弁, 王琴. 银杏抗菌蛋白的提取及其抗菌性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(10): 139–141, 145.
HUANG X J, OU Z B, WANG Q. Study on extract of antibacterial protein from *Ginkgo biloba* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(10): 139–141, 145. (in Chinese)
- [16] 赵琪珂. 银杏叶多糖的提取条件优化及抑菌性的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2017.
ZHAO Q K. Optimization of extracting conditions and study on antibacterial activity of polysaccharide from *Ginkgo biloba* [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2017. (in Chinese)
- [17] 邵菊芳. 基于细胞培养的银杏黄酮类化合物的分离鉴定研究[D]. 徐州: 中国矿业大学, 2013.
SHAO J F. Extraction and identification of flavonoids from cultured cell of *Ginkgo biloba* [D]. Xuzhou: China University of Mining and Technology, 2013. (in Chinese)
- [18] 薛志杉, 承伟. 银杏叶黄酮提取工艺的优化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 5751–5752, 5754.
XUE Z B, CHENG W. Optimization of extraction process of flavonoids from *Ginkgo biloba* L. leaf[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(10): 5751–5752, 5754. (in Chinese)
- [19] 胡清文. 银杏内酯的提取分离及药理作用研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.
HU Q W. Study on the extraction, isolation, pharmacological effects of ginkgolide [D]. Jinan: Shandong University, 2012. (in Chinese)
- [20] 李保同. 银杏叶总黄酮的提取纯化及其抗氧化性能研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
LI B T. Study on extraction, purification and antioxidant activity of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016. (in Chinese)
- [21] 刘兰英, 曹有龙, 赵友谊. 枸杞叶黄酮纯化工艺研究[J]. 食品科技, 2009, 34(8): 134–137.
LIU L Y, CAO Y L, ZHAO Y Y. Study on purification technology of total flavonoids in wolfberry leaves [J]. Food Science and Technology, 2009, 34(8): 134–137. (in Chinese)
- [22] 喻华英, 李启峰. 大肠杆菌生物膜的筛选及生长曲线测定[J]. 中国农学通报, 2014, 30(5): 23–27.
YU H Y, LI Q F. Screening biofilm and determination growth biofilm of curve in *Escherichia coli* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(5): 23–27. (in Chinese)
- [23] 靳盼盼, 刘亚文, 邵美丽, 等. 香芹酚对食源粪肠球菌生物膜形成的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(7): 18–26.
JIN P P, LIU Y W, SHAO M L, et al. Inhibition effect of carvacrol to biofilm formation of foodborne *Enterococcus faecalis* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(7): 18–26. (in Chinese)
- [24] 王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 等. DNS 法测定还原糖含量时最适波长的确定[J]. 河南农业科学, 2010(4): 115–118.
WANG J L, NIE G X, LI S Z, et al. Optimal wavelength for determining the content of reducing sugar by DNS method [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2010(4): 115–118. (in Chinese)
- [25] 原素英, 杨尧, 杨丽霞, 等. 离子色谱法检测冻干 AC-Hib 联合疫苗成品中的游离多糖[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(8): 874–881.
YUAN S Y, YANG Y, YANG L X, et al. Determination of free polysaccharides in the AC-Hib conjugate vaccine using high performance anion-exchange chromatography [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2018, 27(8): 874–881. (in Chinese)

[26] 李百健, 曾荣, 黄长干, 等. 植物杀菌剂的筛选[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(10): 28 – 31.

LI B J, ZENG R, HUANG C G, et al. Screening of plant fungicides[J]. Journal of Southwest University (Natural Science), 2010, 32(10): 28 – 31. (in Chinese)

Inhibitory effect of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves on *Escherichia coli* biofilms

SHAO JuFang GONG ChunSheng FANG TingTing WANG XiangYu
CHEN ZeKun ZHU HongWei*

(School of Chemical Engineering and Technology, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, China)

Abstract: The total flavonoids were extracted from *Ginkgo biloba* leaves with ethanol as extraction solvent and purified using DA201 macroporous resin. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the flavonoids against *Escherichia coli* was determined. The effect of the flavonoids on the formation and adhesion of *E. coli* biofilms was also investigated. The effect of the flavonoids on the content of extracellular polysaccharides was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. The results showed that the MIC of the flavonoids against *E. coli* was 4 mg/mL. The flavonoids can inhibit the formation and adhesion of *E. coli* biofilms. When the mass concentration of the flavonoids was the MIC, the biofilm formation inhibition rate was 59.09%, and the adhesion inhibition rate was 28.99%. When the mass concentration of the flavonoids was greater than the MIC, the formation of *E. coli* biofilm polysaccharides was significantly inhibited.

Key words: *Ginkgo biloba* leaves; flavonoids; *Escherichia coli*; biofilms

(责任编辑:于少云)