

霍氏肠杆菌 B4 表面活性剂纯化鉴定及其应用

王权, 王佳音, 朱瀚, 左金玉, 刘东阳, 沈其荣

(南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室/江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心, 南京 210095)

摘要:【目的】优化霍氏肠杆菌 B4 产表面活性剂的液体发酵条件, 结合有机试剂萃取、高效液相色谱技术分离纯化所产表面活性剂, 并利用质谱分析技术鉴定其结构, 进一步研究其促进黄瓜吸收叶面肥的效果, 为新型肥料的研制提供理论依据。【方法】利用正交试验优化霍氏肠杆菌 B4 产表面活性剂的发酵条件, 主要包括碳源、氮源、初始 pH、发酵温度、接种量、转数和发酵时间, 不同处理的评价指标为发酵液的表面张力值, 具有最低表面张力的处理为最佳的发酵条件; 利用有机试剂萃取后旋转蒸发获得表面活性剂的粗提物; 利用高效液相色谱技术, 在柱温 50℃、进样量为 20 μL、流速 0.5 mL·min⁻¹、检测波长为 210 nm 条件下分离纯化表面活性剂, 并结合傅里叶红外光谱技术分析其所含的不同官能团; 在流速 10 μL·min⁻¹、毛细管电压 3.88 kV、锥孔电压为 53 V、离子源温度 100℃、脱溶温度 150℃ 条件下, 利用质心模式进行全扫描, 根据已有的质谱数据鉴定所产表面活性剂的结构; 通过水培和盆栽试验, 验证该表面活性剂提高黄瓜吸收叶面肥的效率。【结果】正交试验结果表明, 在添加 4% (v/v) 甘油、3 g·L⁻¹ 硝酸钠、初始 pH 6.0、6% 接种量、35℃、200 r/min、发酵 96 h 的条件下, 发酵液的表面张力下降到 44.10 mN·m⁻¹, 为最优的发酵优化条件。在该优化条件下, 生物表面活性剂的粗产物产量高达 12.14 g·L⁻¹, 粗产物可使纯水的表面张力值最低降到 34.14 mN·m⁻¹。液相分离结果表明, 经有机试剂萃取粗提的生物表面活性剂在 1.62—2.33 min 处有典型的特征峰, 说明该组分为生物表面活性剂粗提物中的主要成分。傅里叶红外光谱分析结果表明, 纯化的生物表面活性剂中含有-CH₂、-CO 和 C-O 等官能团, 判断其为含碳链的生物表面活性剂。液质联用分析结果表明, m/z 701.54 处为 [M+Na]⁺, m/z 723.74 处为 [M-H+2Na]⁺, 将该生物表面活性剂鉴定为鼠李糖脂, 其结构式为 Rha-Rha-C₁₀-C₁₂。黄瓜水培结果表明, 与只喷清水 (CK) 和只喷氨基酸 (AA) 的处理相比, 添加生物表面活性剂的氨基酸叶面肥处理 (AAB) 的株高分别增加了 79.59% 和 32.90%, 鲜重分别增加了 43.03% 和 23.98%。盆栽试验结果表明, 与 CK 和 AA 处理相比, AAB 处理的植株叶绿素含量分别提高了 11.72% 和 10.69%。【结论】利用正交试验获得了霍氏肠杆菌 B4 产生物表面活性剂最佳液体发酵条件, 在该条件下生物表面活性剂产量达到 2.07 g·L⁻¹, 并将其主要成分鉴定为鼠李糖脂 (Rha-Rha-C₁₀-C₁₂), 该物质可显著提高黄瓜对叶面肥的吸收效率, 具有很好的应用前景。

关键词: 霍氏肠杆菌; 生物表面活性剂; 优化; 叶面肥

Purification and Identification of the Biosurfactant Produced by *Enterobacter Hormaechei* B4 and Its Application

WANG Quan, WANG JiaYin, ZHU Han, ZHUO JinYu, LIU DongYang, SHEN QiRong

(Jiangsu Key Laboratory for Organic Solid Waste Utilization, Nanjing Agricultural University/Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing 210095)

Abstract:【Objective】The objective of this study is to optimize the biosurfactants produced by *Enterobacter hormaechei* B4, to purify the biosurfactants through organic reagent extraction and high performance liquid chromatography, to identify the

收稿日期: 2017-04-05; 接受日期: 2017-07-12

基金项目: 国家“973”计划 (2015CB150506)、江苏省自然科学基金 (BK20150059)

联系方式: 王权, 357138733@qq.com。通信作者刘东阳, Tel: 025-84396853; E-mail: liudongyang@njau.edu.cn

biosurfactants by HPLC-MS, and to evaluate the efficiency of improving foliar fertilizer absorption, which will provide theoretical basis for the development of new fertilizers. 【Method】 The optimization of biosurfactants production by *Enterobacter hormaechei* B4 was carried out by orthogonal experiment, and the major parameters were used in this study, including the carbon resources, nitrogen resources, initial pH, temperature, inoculum amount, revolutions, and incubation time. The evaluation index of different treatments was the surface tension value of the fermented liquid, and the treatment with the lowest surface tension was the optimum experimental group. The crude biosurfactants were extracted by organic reagents and then concentrated by using vacuum rotary evaporation apparatus with water bath at 60 centigrade. Different functional groups contained in the purified biosurfactants were analyzed by Fourier infrared spectrum, which could provide favorable information for analyzing the structure. The purification of the biosurfactants was performed by liquid chromatography methods, and the HPLC conditions are: column temperature of 110 °C, sample size with 20 μL, flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. The identification of the purified biosurfactants was carried out by HPLC-MS, and the condition was as following: flow rate of 10 μL·min⁻¹, the velocity of capillary voltage of 3.88 kV, cone voltage of 53V, ionization temperature of 100 °C, dissolution temperature of 150 °C, under the condition of using full scan mode in the center of mass, and the full scan under centroid model was used to collect the mass spectrometry data, and the biosurfactant structure was identified based on existing mass spectrometric data. In the end, the purified biosurfactant was used to evaluate the efficiency of improving foliar fertilizer absorption by cucumber through hydroponic culture and pot experiments. 【Result】 The results indicated that the optimum condition for biosurfactant production is listed as follow: 4% (v/v) glycerol, 3 g·L⁻¹ sodium nitrate, initial pH 6.0, inoculum of 6%, 35 °C, 200 rpm and 96 h, under which the surface tension value of the fermented liquid decreases to 44.10 mN·m⁻¹ and the production of the crude biosurfactants was 12.14 g·L⁻¹. Meanwhile, the crude biosurfactants extracts could decrease the surface tension value of pure water to 44.10 mN·m⁻¹, and this condition is considered as the optimum fermentation condition. The liquid phase separation results indicate that the crude biosurfactants extracted by organic reagent have typical characteristic peaks at 1.62-2.33 min, which also showed that it is the main component in the crude extract of the biosurfactant, and it also could decrease the surface tension value to 47.00 mN·m⁻¹ at the concentration of 0.10 g·L⁻¹. The FRIR analysis results indicate that the purified biosurfactants contain various functional groups including -CH₂、-CO and C-O, and it is considered as biosurfactants with carbon chains. The HPLC-MS analysis results show that m/z 701.54 is [M+Na]⁺, and m/z 723.74 was [M-H+2Na]⁺, and the biosurfactant is identified as rhamnolipid, and its structure is Rha-Rha-C₁₀-C₁₂. By comparing to the CK (Water) and AA (Amino acids) treatments, the plant height in AAB (Amino acids and biosurfactants) increased by 79.59% and 32.9% and fresh weight increased by 43.03% and 23.98%, respectively. The chlorophyll contents in AAB increase by 11.72% and 10.69%, respectively, by comparing to the CK and AA, in the pot experiment.

【Conclusion】In brief, the condition for the biosurfactants production secreted by *Enterobacter hormaechei* is optimized, under which the production of the crude biosurfactants is 12.14 g·L⁻¹, and the main component of the biosurfactants produced by *Enterobacter hormaechei* is identified as rhamnolipid (Rha-Rha-C₁₀-C₁₂), which can enhance foliar penetration and will have a good application prospect.

Key words: *Enterobacter hormaechei*; biosurfactants; optimization; foliar fertilizer

0 引言

【研究意义】生物表面活性剂是微生物代谢产生的一类结构各异且具有表面活性的物质，根据其生化特性和分子量等参数，通常可以分为糖脂、磷脂和脂肪酸、肽或蛋白、高分子表面活性剂和颗粒表面活性剂等几大类^[1]。表面活性剂都具有改变界面状态的作用，在溶剂中加入很少量时，能够显著降低固、液、气界面间的界面张力，从而产生润湿或者反润湿、乳化或者破乳、分散或者凝聚、起泡或者消泡、以及增溶等一系列作用^[2]。由于日益严重的环境问题，人们将更多的目光投向了生物表面活性剂。因为生物表面活性剂毒性低、易降解，且在强酸、强碱，浓盐，

极限温度下仍具有表面活性^[3-4]。更重要的是其高效性，具有低临界胶束浓度，却能表现出很高的表面活性^[4]。因此生物表面活性剂在石油、采矿、食品、化妆品、造纸、纺织、涂料、节能技术、洗涤保洁、精细化工生产以及陶瓷工业中都有广泛的应用。【前人研究进展】大量的研究表明，生物表面活性剂结构上是一个两性分子，通常含有一个亲水基团和一个疏水基团，疏水部分有很多饱和或不饱和的碳链，亲水部分则是多变的，包括单糖、低糖、多糖、短肽、磷酸基等^[3,5]。获得高纯度生物表面活性剂是研究其特性的必要前提。SHANMUGASUNDARAM 等^[6]采用了 HPLC 的方法从 *Pontibacter korlensis* SBK-47 菌株中纯化出了一种新型的生物表面活性

剂，并结合 MALDI-TOF 和核磁共振的方法将其鉴定为 Pointifatin。TOMASZ 等^[7]从北极的斯瓦尔巴德岛群岛分离获得了一株产生生物表面活性剂的恶臭假单胞菌 BD2，采用乙酸乙酯萃取法提取了所产生生物表面活性剂并结合 UPLC-MS 方法将其鉴定为鼠李糖脂。INÈS 等^[8]利用枯草芽孢杆菌所产的表面活性剂来处理被石油污染的土壤并取得了很好的修复效果，而 JULIANA 等^[9]从圆球形假丝酵母分离纯化到了一种生物表面活性剂，将其应用于重金属污染土壤的修复并取得了较好的效果。【本研究切入点】目前，关于生物表面活性剂的纯化与鉴定的报道比较多，但大多数都来源于芽孢杆菌属及假单胞菌属，而关于霍氏肠杆菌产生生物表面活性剂还鲜有报道；另一方面，关于生物表面活性剂的应用，主要集中在石油污染土壤的修复、重金属污染土壤修复以及水污染处理等领域，而关于生物表面活性剂在促进植物吸收叶面肥方面的研究还鲜有报道。【拟解决的关键问题】本研究通过正交试验优化霍氏肠杆菌 B4 产生生物表面活性剂的条件，提高生物表面活性剂的产量，结合萃取和液相色谱技术获得了纯度较高的生物表面活性剂，利用傅里叶红外扫描和 HPLC-MS 技术，鉴定出了该生物表面活性剂结构。获得霍氏肠杆菌液体发酵产表面活性的最优条件并研究其基本的理化特性，纯化和鉴定出生物表面活性剂主要成分，评估其对作物吸收叶面肥的促进作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 所用菌株 B4 由江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室从大庆油田被石油污染的土壤中筛选获得，并鉴定为霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*)，菌株的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 上的保存号为 KF015738.1。

1.1.2 培养基 试验所用培养基均在 1.05 kg·cm⁻²、灭菌 20 min 后使用，培养基如下。

LB 培养基：酵母提取物 5 g·L⁻¹，氯化钠 10 g·L⁻¹，蛋白胨 10 g·L⁻¹。原始发酵培养基：NaNO₃ 4.0 g·L⁻¹，CaCl₂·H₂O 0.1 g·L⁻¹，Na₂HPO₄·2H₂O 3.0 g·L⁻¹，KH₂PO₄ 3.0 g·L⁻¹，MgSO₄·7H₂O 0.2 g·L⁻¹；酵母提取物 2.0 g·L⁻¹，甘油 3% (v/v)，每升发酵培养基含 2 mL 微量元素溶液；其中微量元素溶液配方：NaMoO₄·2H₂O 0.05 g·L⁻¹，FeCl₃·6H₂O 0.08 g·L⁻¹，ZnSO₄·7H₂O 0.75 g·L⁻¹，CoCl₂·6H₂O 0.08 g·L⁻¹，FeSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹，

CuSO₄·5H₂O 0.075 g·L⁻¹，MnSO₄·H₂O 0.75 g·L⁻¹，H₃BO₃ 0.15 g·L⁻¹^[9]。

1.2 方法

1.2.1 种子液制备 用 250 mL 的三角瓶装 20% 的液体 LB 培养基。将接好种的三角瓶放入摇床上培养，培养条件为 37℃，转数 170 r/min，培养 24 h 左右。

1.2.2 表面活性剂的发酵时间优化及正交优化试验

(1) 发酵时间的优化 用 250 mL 的三角瓶盛装 50 mL 的发酵培养基，接种 5% (v/v) 种子液，分别发酵 24、48、72、96、120 和 144 h，每个处理设 3 次重复，35℃、200 r/min 条件下培养。取样测定发酵液的 pH、OD₆₀₀。培养结束后，取适量发酵液于 50 mL 离心管中，10 000×g、4℃条件下离心 15 min，取上清液测定表面张力值（表面张力值的测定采用铂金板法，在 23℃ 室温下测量），将离心下来的菌体放入 105℃ 的烘箱烘干 24 h 至恒重后，每个处理 3 次重复，测量时取其平均值。

(2) 正交优化试验 采用五因素四水平 L16 (4⁵) 进行正交试验，选择碳源、氮源、初始 pH、发酵温度和接种量作为 5 个因素，选择 2%、3%、4%、5% (v/v) 的甘油作为碳源的 4 个水平，选择 2 g、3 g、4 g、5 g NaNO₃ 作为氮源的 4 个水平，选择 6.0、6.5、7.0、7.5 作为 pH 值的 4 个水平，选择 31℃、35℃、39℃、43℃ 作为温度的 4 个水平，选择 1%、2%、4%、6% (v/v) 作为接种量的 4 个水平。将发酵液的表面张力值作为参考量，每个处理 3 次重复并取其平均值。

1.2.3 生物表面活性剂基本性质测定 取上清液 1 000 mL，分装于称好重量的 8 个组培瓶中，放置在 -80℃ 冰箱预冻 4—5 h 后，转入真空冷冻干燥仪中，冻干后称重。绘制表面张力值随粗生物表面活性剂浓度的关系图，得到所产生生物表面活性剂临界约束浓度下的表面张力值^[11]。

1.2.4 生物表面活性剂的提纯及特性研究 萃取：参照 GHOJAVAND 等^[12]的方法，将上清液用 1 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液调节 pH 至 2.0，再用与发酵液等体积的氯仿和甲醇 2 : 1 (v/v) 混合溶剂萃取，再用发酵液 1/2 体积的混合溶剂萃取。将两次的萃取液混合用旋转蒸发仪在 40℃ 下进行浓缩，得到棕色黏稠固体后将其刮下。

排油圈大小测定按 MORIKAWA 等^[13]的方法作适当的调整：往柴油中滴入几滴尼罗红染色剂并混合均匀。将 0.1 g 的提纯物溶于 50 mL (含 0.01 g 碳酸钠的超纯水作为检测液)，在直径 15 cm 的玻璃平

皿中加入 40 mL 去离子水, 加入 10 μL 柴油使其完全平铺在水面后, 再在中央滴加 1 μL 生物表面活性剂, 并在紫外成像仪下拍照。

1.2.5 傅里叶红外光谱分析 将萃取获得的粗表面活性剂, 利用傅里叶变换红外光谱仪 NEXUS870 (美国 NICOLET) 分析其中含有的功能团, 扫描的分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描波段设置为 400—4 000 cm^{-1} 。

1.2.6 液相分离 液相色谱分离纯化生物表面活性剂按照 LIN 等^[14]的方法进行并做适当的调整。采用高效液相色谱法 (Agilent 1260) 进行分离提纯, 试验所用色谱柱为 Agilent C18 (9.4 mm \times 150 mm, 5 μm)。将萃取过的生物表面活性剂溶于色谱纯甲醇 (天津光复化学试剂公司) 流动相 A 为色谱纯乙腈, 流动相 B 为 0.1% 乙酸水溶液, 流动相 A 梯度增加, 40 min 内从 50% 上升到 100%, 流速 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 50°C, 进样量为 20 μL , 检测波长为 210 nm。

分离过程中收集 2—4 min 分离出来的洗脱液, 进行富集。

1.2.7 液质联用 (HPLC-MS) 生物表面活性剂采用 HABA 等^[15]的方法进行 HPLC-MS 分析, 并稍作修改。将粗生物表面活性剂和液相分离样品采用液质联用仪 (美国 Thermo Scientific, Q-Exactive), 液相部分条件同上, 色谱柱流出组份进入质谱仪的流速为 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。毛细管电压 3.88 kV, 锥孔电压为 53 V, 离子源温度 100°C, 脱溶温度 150°C。全扫描是在质心模式下, 采样周期时间为 1 s 和扫描时间为 0.1 s, m/z 范围 110—1 000。

1.2.8 高效叶面肥的配制 本研究采用的叶面肥由江阴市联业生物科技有限公司提供, 是商品叶面肥的半成品 (未添加表面活性剂), 是由病死家禽及屠宰场下脚料酸水解而制成的氨基酸叶面肥。

将氨基酸水解液稀释成 500 倍后, 再利用 KOH 调 pH 至 7 左右, 一部分氨基酸溶液加入提纯的生物表面活性剂, 进一步研究生物表面活性剂提高植物叶片吸收氨基酸水溶肥的效果。

1.2.9 黄瓜试验

(1) 水培试验 标准浓度霍格兰培养液: 四水硝酸钙 945 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 硝酸钾 506 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 硝酸铵 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 磷酸二氢钾 136 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 七水硫酸镁 493 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 铁盐溶液 2.5 mL, 微量元素 5 mL, pH=6.0。其中, 铁盐溶液: 七水硫酸亚铁 2.78 g, 乙二胺四乙酸二钠 3.73 g, 蒸馏水 500 mL, pH=5.5; 微量元素液: 碘化钾 0.83 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 硼酸 6.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 硫酸锰 22.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 硫酸锌

8.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 钼酸钠 0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 硫酸铜 0.025 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 氯化钴 0.025 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

黄瓜水培试验于 2016 年 8—9 月在南京农业大学资源环境学院人工气候室进行, 选用黄瓜品种为津优 1 号。将种子用去离子水浸泡 3—4 h, 浸泡完之后用 2% 的过氧化氢浸泡 3—4 min 消毒, 并放在网格上使其部分淹没水中放到光照室育苗, 发芽后长到两叶一心进行移苗。用 1/4 的浓度的标准霍格兰配方作为基础液, 两周后换成 1/2 浓度的霍格兰营养液, 采用 1 L 的白色塑料容器。等黄瓜苗长出两片真叶后, 挑选长势相同的黄瓜进行处理, 作 CK (喷洒清水)、AA (喷施稀释 500 倍的氨基酸水解液)、AAB (在 AA 的基础上加上 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生物表面活性剂) 3 个处理, 每个处理作 5 次重复, 每片叶子均反面喷 3 下, 正面喷一下 (预计 0.75 mL 量), 每一周换一次霍格兰营养液, 2016 年 8 月 16 移苗, 9 月 20 号收获。测量不同处理植株的株高、叶片数、鲜重和干重, 鲜重直接用吸水纸擦干根上的液体称量, 干重则将植株放入信封, 并在 105°C 条件下烘至恒重, 称量植株重量。

(2) 盆栽试验 黄瓜盆栽试验于 2016 年 9—10 月在南京农业大学资源环境学院温室进行, 土壤取自江苏省江阴市联业农场的水稻土。土壤 pH、有机碳、铵态氮、硝态氮、总氮、速效磷、速效钾含量均采用常规方法测定^[12]。种子前期处理同水培试验, 利用营养土和蛭石混合作为育苗基质, 长出两叶一心后移苗。

使用 4 kg 规格的塑料盆, 每盆装 4 kg (± 10 g) 供试土样, 每盆添加 1.75 g 硫酸钾、4.00 g 过磷酸钙、1.28 g 尿素作为基肥 (为体现处理差异, 供试土壤选尽量贫瘠的)。喷肥处理同水培试验, 2016 年 9 月 6 日第一次喷施, 处理同 1.2.6.1 的叶面肥处理过程, 2016 年 10 月 14 日收获。分别测量株高、叶绿素两个参数。叶绿素测量采用 SPAD-502 叶绿素仪测量第一片新长成叶, 选取叶片上 5 个点 (去除偏差较大的点), 取平均值。

1.3 数据分析

采用 Excel 2003、SPSS 16.0 软件进行数据分析, 并利用 Excel 2003 作图, $P \leq 0.05$ 时为显著相关。

2 结果

2.1 表面活性剂生产条件优化

分别选取了 pH、发酵液 OD₆₀₀、上清液表面张力值、菌体的干重 4 个参数, 来确定菌株最佳的发酵时

间,结果如表1所示。其中pH在前6天变化都不大,第6天以后pH开始呈下降趋势。发酵上清液的表面张力值在第4天先降至一个最低的值,随后逐渐上升。OD₆₀₀在前5天不断上升,随后逐渐下降;菌体干物重与OD₆₀₀变化呈正相关关系。菌体的干重和OD₆₀₀数值都反映了菌体数量,前2天B₄的干重和OD₆₀₀都快速增加,3d后OD₆₀₀数值增长速率小于干物重。上清液的表面张力值最低出现在第4天,说明在此发酵时间所产的表面活性剂最多,所以最终选择4天为发酵时间。

通过正交试验优化了*E. hormaechei* B4产表面活性剂的条件(因素水平如表2),正交试验结果如表3

所示。在所有组合试验中,组合A₂B₁C₂D₃E₄中的上清液表面张力值降到最低,进一步说明在4%甘油、3g·L⁻¹NaNO₃、初始pH6.0、6%接种量和35℃条件下,*E. hormaechei* B4所产的生物表面活性剂最多。鉴于R_D>R_A>R_C>R_E>R_B,说明碳源的量对表面活性剂的产量影响最大,而pH都选在了中性范围左右所以影响不是很大。温度的K₂<K₃<K₄<K₁,表明温度要处于一定的范围内,低于35℃会导致表面活性剂产量降低。pH的波动较小,不需要特殊讨论。在接种量方面K₄<K₂<K₁<K₃,该结果表明接种量与生物表面活性剂产量并不存在线性关系。

表1 *E. hormaechei* B4产表面活性剂的天数优化

Table 1 Optimization on days of biosurfactant production by *E. hormaechei* B4

项目 Item	时间 Time (d)						
	1	2	3	4	5	6	7
pH	5.48	5.49	5.45	5.43	5.40	5.47	4.93
表面张力值 Surface tension value (mN·m ⁻¹)	55.90±0.26	53.92±0.25	51.11±0.41	49.67±0.09	55.29±0.16	62.4±0.61	56.61±0.12
OD ₆₀₀	0.159	0.292	0.319	0.332	0.352	0.293	0.298
菌体干重 Dry cell weight (g·L ⁻¹)	0.150±0.023	0.313±0.056	0.347±0.016	0.497±0.034	0.506±0.054	0.475±0.043	0.483±0.071

表2 L16(4⁵)正交试验因素水平表

Table 2 Table of factors and levels during the optimization process

水平 Level	温度(A) Temperature (°C)	pH(B)	NaNO ₃ (C) Sodium nitrate (g)	甘油(D) Glycerol (% v/v)	接种量(E) Inoculation (% v/v)
1	31	6.0	2	2	1
2	35	6.5	3	3	2
3	39	7.0	4	4	4
4	43	7.5	5	5	6

2.2 生物表面活性产量及其基本性质

在最优条件下,1L发酵液中粗生物表面活性剂产量可高达12.14 g,表面张力随粗生物表面活性剂浓度的关系如图1所示。在标准测量条件下,纯水的表面张力值为72.25 mN·m⁻¹,粗生物表面活性剂的溶度在达到50 g·L⁻¹时候溶液时达到了最小表面张力值,即生物表面活性剂浓度高于了其临界约束浓度,得到最低表面张力为34.14 mN·m⁻¹,在粗生物表面活性剂浓度为10 mg·L⁻¹时表面张力值就降到47 mN·m⁻¹,充分说明了此表面活性剂的高效性,具有很好的应用前景。

为了进一步研究菌株生成的生物表面活性剂的特性,利用有机试剂萃取法萃取上清液中的生物表面活性剂,萃取结果表明,1L上清液经过萃取后可获得

2.07 g纯度较高的生物表面活性剂,而且固体比较黏稠。排油圈大小可进一步表明该表面活性剂产物具有很好的表面活性,可以形成显著的排油圈。结果表明,1 μL提纯的生物表面活性剂可以获得直径8 cm的排油圈,结果如图2所示,说明提纯的生物表面活性剂具有很强的表面活性。

2.3 液相分离结果

液相分离图谱如图3所示,从液相分离结果可以得出,经过有机试剂萃取过后获得的生物表面活性剂的纯度可观,出峰时间为1.62—2.33 min,说明这一部分为提纯后的生物表面活性剂的主要成分。根据液相色谱分离结果,利用仪器的回收系统回收1.62—2.33 min的液体,用于后续的分析。

表 3 *E. hormaechei* B4 产生物表面活性剂正交试验结果Table 3 The orthogonal experiment results of the biosurfactants production by *E. hormaechei* B4

试验标号 Test number	A	B	C	D	E	表面张力值 Surface tension value (mN·m ⁻¹)
①	1	1	1	1	1	60.78±0.49
②	1	2	2	2	2	60.41±0.56
③	1	3	3	3	3	59.94±0.48
④	1	4	4	4	4	47.24±0.14
⑤	2	1	2	3	4	44.10±0.04
⑥	2	2	1	4	3	50.87±0.42
⑦	2	3	4	1	2	49.41±0.27
⑧	2	4	3	2	1	59.01±0.13
⑨	3	1	3	4	2	54.00±0.64
⑩	3	2	4	3	1	53.03±0.25
⑪	3	3	1	2	4	54.78±0.37
⑫	3	4	2	1	3	60.45±0.68
⑬	4	1	4	2	3	58.91±0.49
⑭	4	2	3	1	4	57.36±0.46
⑮	4	3	2	4	1	54.62±0.64
⑯	4	4	1	3	2	49.24±0.58
均值 K ₁ Mean value K ₁	57.093	54.832	53.480	55.970	56.140	
均值 K ₂ Mean value K ₂	50.847	55.085	53.447	58.225	53.265	
均值 K ₃ Mean value K ₃	52.990	54.250	57.965	50.858	56.510	
均值 K ₄ Mean value K ₄	55.805	52.568	51.813	51.683	50.820	
极差 R Range value R	6.246	2.517	6.125	7.367	5.690	

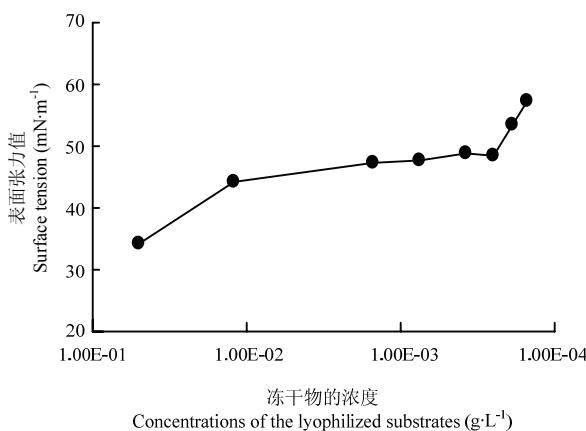


图 1 粗生物表面活性剂浓度与其溶液表面张力的关系

Fig. 1 The relationship between the concentration of crude biosurfactant and surface tension value

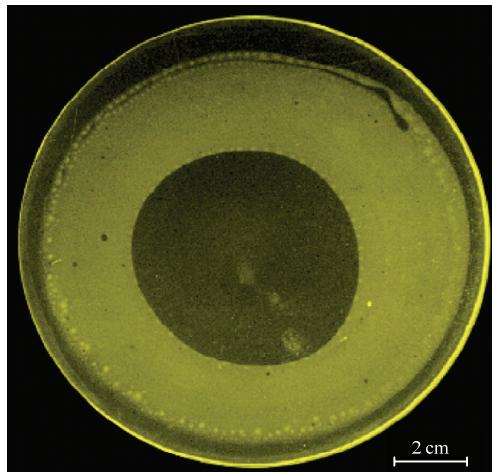


图 2 生物表面活性剂排油圈试验

Fig. 2 The graph of the oil-displaced circle

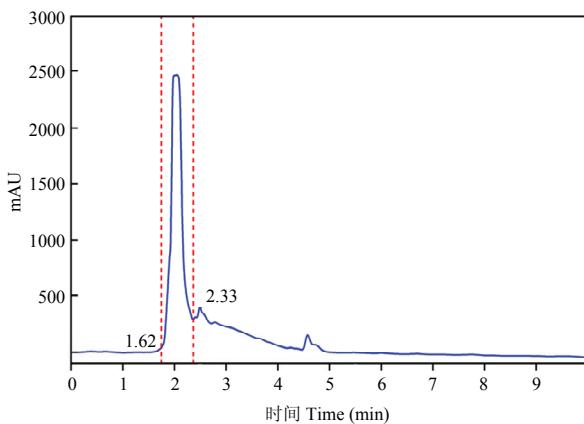


图3 生物表面活性剂液相分离图

Fig. 3 HPLC chromatogram of biosurfactant extracts produced by *E. hormaechei* B4

2.4 红外扫描结果分析

利用傅里叶红外光谱法分析了提纯的生物表面活性剂,结果如图4所示。由图4可知,在波数 1770 cm^{-1} 处有C=C键的伸缩吸收带,这说明在该表面活性剂中含有不饱和碳碳双键;在 2941 cm^{-1} 附近显著为CH₂和CH₃基中C-H键的伸缩振动吸收带;1 045—1 100 cm^{-1} 的伸缩振动明显表示有C-O-C的存在,说明该表面活性剂中存在糖苷键;在 3410.8 cm^{-1} 处的典型特征峰,说明该化合物中存在大量的不饱和氢;在 1384.6 cm^{-1} 处的伸缩振动则表明该表面活性剂中有二甲基的存在。这些都与HEYD^[17]等用红外扫描研究鼠李糖脂性质的结果相一致。

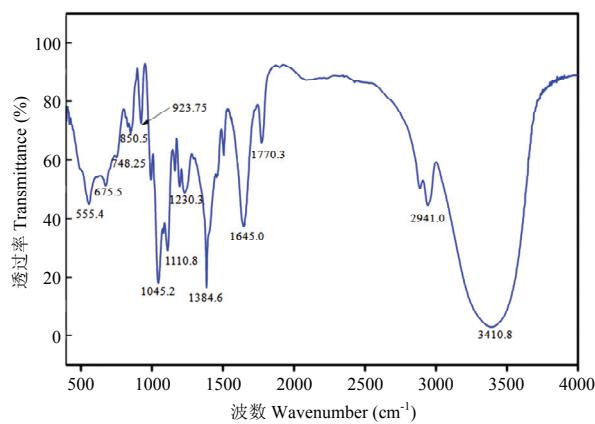


图4 萃取后粗表面活性剂红外扫描图

Fig. 4 FTIR-ATR spectra for biosurfactant extracts produced by *E. hormaechei* B4

2.5 液质联用鉴定结果

E. hormaechei B4粗生物表面活性剂的总离子色谱如图5所示,结果表明在7—9 min时间段有较多的杂峰,这些杂峰可能是一些蛋白质、核酸、类脂寡糖等。有机试剂萃取后用高效液相色谱分离的物质在7.58 min处出峰,故将7.58 min的出峰物质进行质谱分析,分析结果如图6所示,根据其质谱数据的特征峰,推测m/z 701.54为[M+Na]⁺,而m/z 723.74为[M-H+2Na]⁺,根据文献^[18-19]报道的结果,推测该位置结构式为Rha-Rha-C₁₀-C₁₂。在总离子流图中其他没有分离检测出的物质可能是Rha-Rha-C₁₀-C₁₂的一些同系物,有待进一步研究。

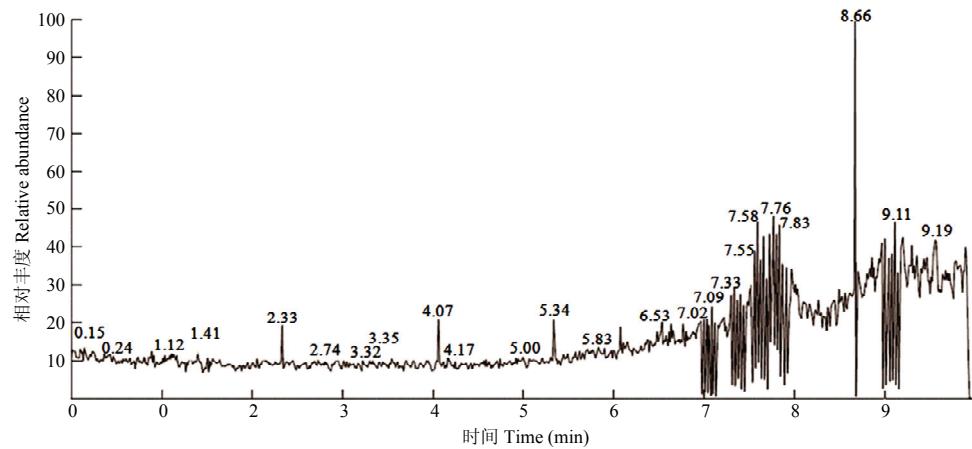


图5 粗生物表面活性剂LCMS总离子流图

Fig. 5 Total ion current diagram of crude biosurfactant

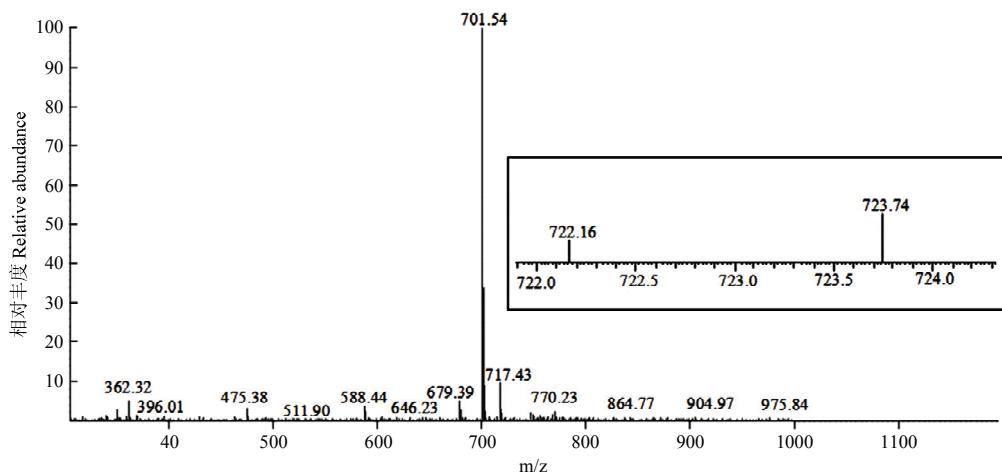


图 6 纯化的生物表面活性剂质谱图

Fig. 6 Analysis result of the purified biosurfactant by HPLC-MS

2.6 黄瓜促生试验结果

2.6.1 水培试验 黄瓜水培试验结果如图7所示, 结果表明AAB处理的株高为 (129 ± 2.74) cm, 而AA处只有 (97.10 ± 8.51) cm, CK则更矮小, 只有 (71.87 ± 2.80) cm, AAB处理比CK处理增长了79.59%, 比AA处理增长了32.90%; 叶片数也要很大程度的增长, AAB处理的平均叶片数达到了 (19.0 ± 1.15) cm, 比CK和AA处理分别增长了39.24%和18.74%。在整个植株的质量方面AAB处

理也有很大增长, AAB植株的平均鲜重为52.94 g, AA和CK分别只有42.70 g和37.01 g, AAB与AA和CK相比, 分别增长23.98%和43.03%; 干重与鲜重很吻合, AAB、AA和CK的平均干重分别为4.73、3.65和3.31 g, AAB比AA和CK分别增长了29.80%和42.86%。生物表面活性剂的加入使得黄瓜的生物量有显著的增加, 只喷施氨基酸水溶肥的AA处理长势明显不如添加了生物表面活性剂的AAB处理(图8)。



图 7 黄瓜水培结果

Fig. 7 The hydroponic experiment results of cucumbers

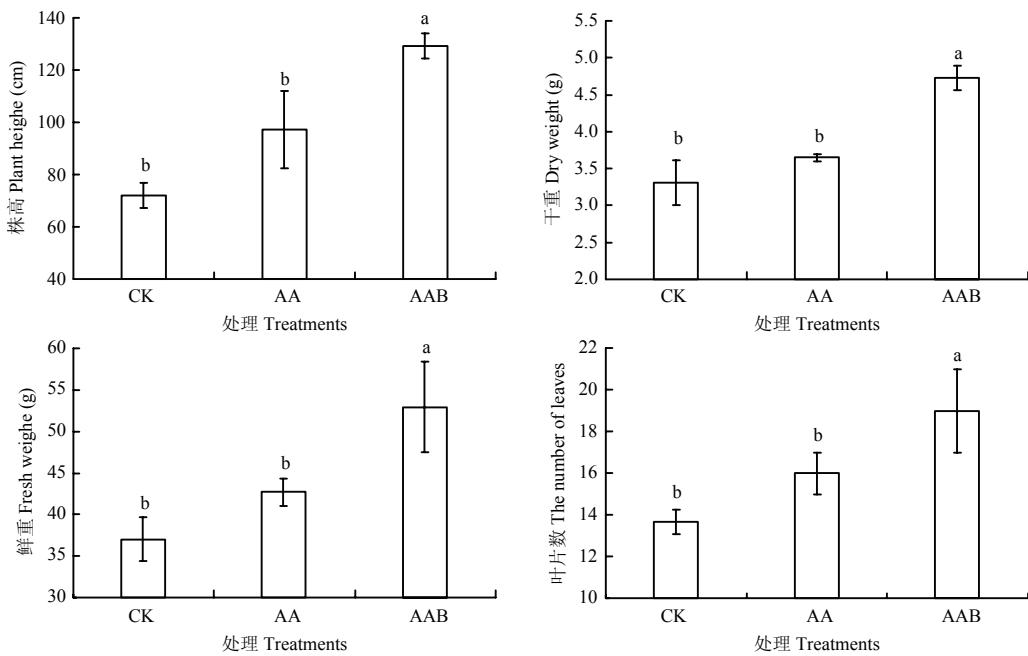


图 8 水培黄瓜生物量

Fig. 8 The biomass of hydroponic experiment cucumbers

2.6.2 盆栽试验 利用盆栽试验进一步验证 *E.hormaechei* B4 所产生物表面活性剂的对黄瓜叶片吸收叶面肥的效果, 所用土壤的基本性质如表 4 所示。结果表明, 供试土壤的有机质含量比较高, 而总氮和

速效磷和速效钾的含量并不是很高, 该土壤比较适合于叶面肥施用效果的研究。

盆栽试验中, 分别测定了不同处理中黄瓜的株高、叶绿素含量, 结果如图 9 所示。AAB 处理的平均株

表 4 供试土壤的基本性质

Table 4 the basic properties of soil used in this study

pH	有机碳 Total organic carbon ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	硝态氮 Nitrate ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	铵态氮 Ammonium ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	总氮 Total nitrogen ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	速效磷 Available phosphorus ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	速效钾 Available potassium ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
6.35	5.51±0.07	251.0±1.1	1.32±0.01	0.7910±0.011	14.72±0.82	93.00±0.78

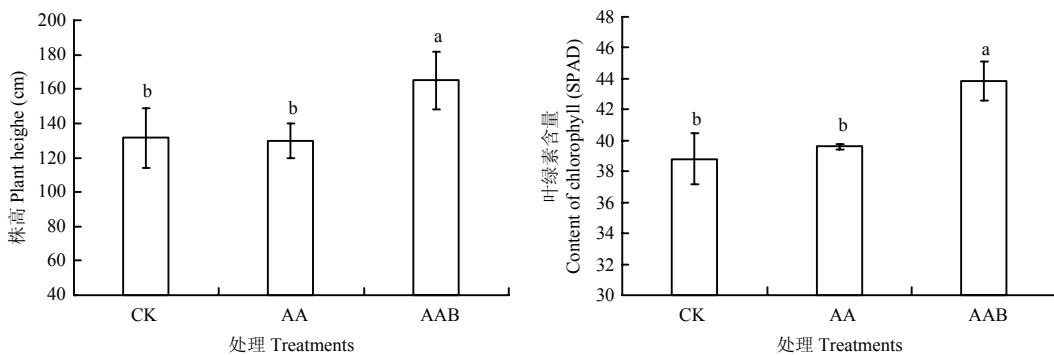


图 9 盆栽试验结果

Fig. 9 The pot experiment results of cucumbers

高为 (164.97 ± 0.09) cm, AA 与 CK 处理没有明显差异, AAB 却显著高于这两个处理, 与 AA 和 CK 相比分别增加了 26.93% 和 25.52%。关于叶绿素含量的差异, AAB 处理也有类似的趋势, AAB 处理的比 AA 和 CK 处理的叶绿素含量分别增加了 10.69% 和 11.72%。盆栽试验结果表明, *E. hormaechei* B4 合成的生物表面活性剂对黄瓜叶片吸收氨基酸叶面肥有显著的促进作用。

3 讨论

生物表面活性剂种类繁多, 能够分泌生物表面活性剂的微生物也多种多样, 主要包括假单胞菌^[7]、芽孢杆菌^[8]、乳酸菌^[20]等, 但是不同微生物所产生生物表面活性剂的量及其特性差异明显。目前, 关于生物表面活性剂在食品和农业方面应用的报道比较多, GEORGE 等^[21]将海洋放线菌 *Brachybacterium paraconglomeratum* 中分离得到的糖脂类生物表面活性剂应用到食品加工上时发现, 该糖脂不仅可以改善面包的风味, 而且对大多数的细菌都具有拮抗作用; SIDDHARTHA 等^[22]利用从铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* SS14 纯化出来的鼠李糖脂来防治玉米的穗腐病取得了比较理想的效果, 而思斯等^[23]从酶学角度研究了生物表面活性剂对提高纤维素高效降解的机制。然而关于生物表面活性剂在促进植物吸收叶面肥效率及其机制的研究还鲜有报道, 而关于霍氏肠杆菌 (*E. hormaechei*) 产生物表面活性剂的优化及其产物的纯化鉴定更是报道甚少, 所以本研究关于霍氏肠杆菌 B4 生物表面活性剂的纯化鉴定及其应用的研究是非常有意义的, 将为新型肥料的研制提供坚实的理论基础。

为了使霍氏肠杆菌 B4 产足够的生物表面活性剂, 必须优化菌株产生物表面活性剂的条件, 主要包括碳源、氮源及各种培养条件, 而 C/N 是限制菌株产生生物表面活性剂的主要因素。生物表面活性剂的产生往往开始于氮源快消耗殆尽的时期^[24], 当氮源耗尽时生物体内氮依赖型的酶促反应就无法进行, 而碳源依旧充足, 就会产生很多碳链较长的烃类, 从而成为生物表明活性剂的疏水端^[25]。在产量与性质方面, *E. hormaechei* B4 菌株所产的生物表面活性剂可使纯水的表面张力值从 $72.25\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 降低到 $34.14\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, 说明该生物表面活性剂降低水表面张力的效果比较好。到目前为止, 最有效的生物表面活性剂在 0.005% 浓度可以将纯水的表面张力值降低到 $27\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ^[26],

E. hormaechei B4 产的生物表面活性剂和它比起来差距不大, 因此该生物表面活性剂具有很好应用潜能。在最优培养条件下, *E. hormaechei* B4 发酵产生的直接粗生物表面活性剂高达 $12.14\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 有机萃取后可以得到 $2.07\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 较纯的生物表面活性剂。EREIRA 等^[27]用相同的方法萃取了枯草芽孢杆菌的发酵产物, 只获得了 $1.76\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的肽类表面活性剂, 相比之下 *E. hormaechei* B4 有更强的产表面活性剂能力。在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度条件下, 霍氏肠杆菌 B4 分泌的生物表面活性剂可使纯水的表面张力值降低到 $47\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 左右, 进一步说明该生物表面活性剂在低浓度下就具有良好的表面活性, 所拍摄的排油圈结果更加直观的体现了所产生生物表面活性剂的强大功能。

微生物所产生物表面活性剂的表面比较多, 主要槐糖脂、鼠李糖脂、海藻糖脂、脂肪和脂蛋白等, 在具体研究前, 必须对菌株所产的生物表面活性剂进行纯化与鉴定。本研究结合 FTIR 和 HPLC-MS 技术, 分离纯化了霍氏肠杆菌 B4 分泌的生物表面活性剂, FTIR 检测结果表明, 该纯化的生物表面活性剂含有含有-CH₂、-CO 和 C-O 等官能团, 与鼠李糖脂 (Rha-Rha-C₁₀-C₁₂) 所含的官能团比较吻合。而 HPLC-MS 分析结果表明, 荷质比为 701.54 的碎片, 与已有文献报道的鼠李糖脂 (Rha-Rha-C₁₀-C₁₂) 比较吻合, 最终确定霍氏肠杆菌 B4 所产的表面活性剂为鼠李糖脂。该鉴定结果, 将为该生物表明活性剂的实际应用提供理论依据。

本研究采用了水培和盆栽试验来验证霍氏肠杆菌 B4 所产表面活性剂的提高黄瓜叶片吸收养分的效率。叶面肥喷施液在作物叶面的润湿是养分进入叶片内部的前提^[28], 而覆有蜡质层的叶面具有低能表面的特征, 使叶面肥喷施液无法在叶面润湿, 不利于作物叶片对养分的吸收, 表面活性剂则可以降低叶面肥的表面张力, 降低了喷施液与蜡质层之间的界面张力, 从而增加叶面肥在叶面的润湿作用。本研究中, 黄瓜水培结果显示添加了生物表面活性剂的比没有添加的鲜重增加了 23.98%, 干重增加了 29.80%。盆栽试验中添加了生物表面活性剂的植株比没有添加的叶绿素含量增加了 10.69%, 进一步说明生物表面活性剂的添加促进了植物对氨基酸叶面肥氮的吸收。总之, *E. hormaechei* B4 所产的生物表面活性剂对黄瓜吸收叶面肥的促进是显而易见的, 这与浙江大学 LIU 等^[29]研究得出鼠李糖脂可以提高氨基酸叶面肥吸收效率的结果是一致。在盆栽试验中喷施氨基酸叶面肥的长势

和喷清水的无明显差异。可能原因是水培黄瓜蒸腾量大, 气孔张开程度大更易吸收叶面肥。再者是盆栽期间蚜虫危害比较严重, 有研究表明部分生物表面活性剂有杀灭蚜虫的功能^[30], 喷施了生物表面活性剂的叶面肥可能起到驱赶蚜虫和促进吸收的双重功效, 使得该处理长势要远远高于其他两个处理, 这有待进一步验证, 今后也要对粗的生物表面活性剂进一步的提纯, 并进行相关的结构鉴定工作。

近年来, 环境污染及食品安全问题都受到社会的广泛关注, 在绿色食品的生产中, 考虑到化工生产表面活性剂残留, 以及其对环境产生的危害, 高效、可降解、无毒害的生物表面活性剂必然会受到广泛推崇。所以, 本研究的应用前景比较广阔。

4 结论

霍氏肠杆菌 B4 在优化后的发酵条件下, 生物表面活性产量较高。该菌所产的表面活性剂主要成分为鼠李糖脂类物质, 具有很好的表面活力, 低浓度情况下能有效降低水的表面张力。霍氏肠杆菌 B4 所产生生物表面活性剂能很好地促进黄瓜对氨基酸叶面肥的吸收, 喷施了添加 B4 菌株所产生生物表面活性剂的氨基酸叶面肥的黄瓜植株生物量有明显增长。

References

- [1] ARIMA K, KAKINUMA A, TAMURA G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1968, 31(3): 488-494.
- [2] ROSENBERG E, RON E Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52(2): 154-162.
- [3] LANG S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2002, 7(1/2):12-20.
- [4] VAN HAMME J D, SINGH A, WARD O P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(6): 604-620.
- [5] NITSCHKE M, COSTA S G V A O, CONTIERO J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress*, 2005, 21:1593-1600.
- [6] BALAN S S, KUMAR C G, JAYALAKSHMI S. Pontifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Pontibacter korlensis*, strain SBK-47: Purification, characterization and its biological evaluation. *Process Biochemistry*, 2016, 51(12): 2198-2207.
- [7] JANEK T, ŁUKASZEWICZ M, KRASOWSKA A. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 110: 379-386.
- [8] MNIF I, SAHNOUN R, ELLOUZ-CHAABOUNI S, GHRIBI D. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Safety and Environmental Protection*, 2017, 109: 72-81.
- [9] LUNA J M, RUFINO R D, SARUBBO L A. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. *Process Safety and Environmental Protection*, 2016, 102: 558-566.
- [10] 钱欣平. 生物表面活性剂的合成及其促进有机物降解的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- [11] QIAN X P. Study on the synthesis of biological surfactants and the promotion of organic degradation[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2002. (in Chinese)
- [12] ZHANG Y, MILLER R M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(10): 3276-3282.
- [13] GHOJAVAND H, VAHABZADEH F, MEHRANIAN M, RADMEHR M, SHAHRAKI K A, ZOLFAGHARIAN F, EMADI M A, ROAYAEI E. Isolation of thermotolerant, halotolerant, facultative biosurfactant-producing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(6): 1073-1085.
- [14] MORIKAWA M, HIRATA Y, IMANAKA T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2000, 1488(3): 211-218.
- [15] LIN S C, CHEN Y C, LIN Y M. General approach for the development of high-performance liquid chromatography methods for biosurfactant analysis and purification. *Journal of Chromatography A*, 1998, 825(2): 149-159.
- [16] HABA E, PINAZO A, JAUREGUI O, ESPUNY M J, INFANTE M R, MANRESA A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 81(3): 316-322.
- [17] HEYD M, KOHNERT A, TAN T H, NUSSER M, KIRSCHHÖFER F, BRENNER-WEISS G, BERENSMEIER S. Development and trends

- of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391(5): 1579-1590.
- [18] BENINCASA M, ABALOS A, OLIVEIRA I, MANRESA A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, 85(1): 1-8.
- [19] NIE M, YIN X, REN C, WANG Y, XU F, SHEN Q R. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, strain NY3. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(5): 635-643.
- [20] VECINO X, RODRÍGUEZ-LÓPEZ L, GUDIÑA E J, CRUZ J M, MOLDES A B, RODRIGUES L R. Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2017. DOI: 10.1016/j.jiec.2017.06.014
- [21] DE JESUS CORTES-SANCHEZ A, HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ H, JARAMILLO-FLORES M E. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiological Research*, 2013, 168(1): 22-32.
- [22] BORAH S N, GOSWAMI D, SARMA H K, CAMEOTRA S S, DEKA S. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of maize. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1505.
- [23] 恩斯, 王明月, 刘绍雄, 吴海波, 王金华, 王婷婷, 田荣荣, 陈硕凯, 熊智. 高效纤维素降解细菌的分离鉴定及酶学特性. 江苏农业科学, 2013, 41(3): 305-308.
- SI S, WANG M Y, LIU S X, WU H B, WANG J H, WANG T T, TIAN R R, CHEN S K, XIONG Z. Isolation of the efficient lignocelluloses degrading microbes and study on its enzymatic characteristics. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(3): 305-308. (in Chinese)
- [24] PEYPOUX F, BONMATIN J M, LABBE H, GRANGEMARD I., DAS B C, PTAK M, WALLACH J, MICHEL G. [Ala4] surfactant, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 224(1): 89.
- [25] BANAT I M, MAKKAR R S, CAMEOTRA S S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53(5): 495-508.
- [26] VOLLENBROICH D, OZEL M, VATER J, KAMP R M, PAULI G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 1997, 25(3): 289-297.
- [27] PEREIRA J F B, GUDIÑA E J, COSTA R, TEIXEIRA J A, COUTINHO J A, RODRIGUES L R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 2013, 111(9): 259-268.
- [28] 肖艳, 唐永康, 曹一平, 王敬国. 表面活性剂在叶面肥中的应用与进展. 磷肥与复肥, 2003, 18(4):11-12.
- XIAO Y, TANG Y K, CAO Y P, WANG J G. Application of surfactants fertilizer for foliage dressing and its progress. *Phosphate and Compound Fertilizer*, 2003, 18(4):11-12. (in Chinese)
- [29] LIU H, SHAO B, LONG X, YAO Y, MENG Q. Foliar penetration enhanced by biosurfactant rhamnolipid. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 2016, 145: 548.
- [30] 孙星星, 王凯, 李红阳, 高波, 顾慧玲, 张俊喜, 周加春, 朱富强. 新型生物农药鼠李糖脂及其复配剂对甘蓝蚜虫的防治效果. 浙江农业科学, 2016, 57(12): 2071-2073.
- SUN X X, WANG K, LI H Y, GAO B, GU H L, ZHANG J X, ZHOU J C, ZHU F Q. Control effect of new bio-pesticide rhamnolipid and its compound agent on aphids in cabbage. *Zhejiang Agricultural Sciences*, 2016, 57(12): 2071-2073. (in Chinese)

(责任编辑 李云霞)