

红豆杉内生真菌次生代谢物的分离鉴定及其抗菌活性分析

陈淑娟¹, 刘佳佳¹, 龚汉祥², 杨栋梁¹

¹ 中南大学化学化工学院制药工程系, 长沙 410083

² 苏州常熟市质量技术监督局, 常熟 215500

摘要: 以产紫杉醇类化合物的云南红豆杉内生真菌 12.3.2 为目标菌株, 对其次生代谢物进行分离鉴定和抗菌活性研究。通过硅胶柱层析, 共分离得到 3 个主要成分, 红外光谱、质谱、核磁共振氢谱等光谱解析鉴定其分别为松柏烯、邻苯二甲酸二异辛酯、油酸乙酯。生物活性试验表明 3 种化合物对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和白色链球菌这 5 种致病菌都有一定的抑制作用。其中松柏烯对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和白色念珠菌有较强的抑制作用。松柏烯是首次报道从植物内生真菌次生代谢物中分离得到, 这为松柏烯的来源开辟了一条重要的途径, 同时也为松柏烯的进一步开发利用奠定了基础。

关键词: 内生真菌, 次生代谢物, 抗菌活性, 松柏烯, 邻苯二甲酸二异辛酯, 油酸乙酯

Identification and antibacterial activity of secondary metabolites from *Taxus* endophytic fungus

Shujuan Chen¹, Jiajia Liu¹, Hanxiang Gong², and Dongliang Yang¹

¹ Department of Pharmacy Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China

² Suzhou Changshu Bureau of Quality and Technique Supervision, Changshu 215500, China

Abstract: We isolated three secondary metabolites by silica gel column chromatography from endophytic fungus 12.3.2 that was isolated from *Taxus yunnanensis* and could produce taxanes. They were identified as cembrene (3,7,11-trimethyl-14-(1-methylethyl)-1,3,6,10-cyclotetradecatetraene), diisooctyl phthalate (1,2-benzenedicarboxylic acid diisooctylester) and ethyl oleate (9-octadecenoic acid-ethyl ester) by infrared spectra (IR), mass spectra (MS) and ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR). Their antibacterial activities against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* were examined. Results show that all of the three compounds could inhibit the growth of those pathogenic bacteria. Especially, cembrene showed stronger inhibition to *S. aureus*, *B. subtilis* and *C. albicans*. This is the first report on cembrene produced by plant endophytic fungus.

Keywords: endophytic fungus, secondary metabolite, antibacterial activity, cembrene, 1,2-benzenedicarboxylic acid diisooctylester, ethyl oleate

Received: October 14, 2008; **Accepted:** December 9, 2008

Supported by: Key Research Items from the Ministry of Education (No. 03126).

Corresponding author: Jiajia Liu. Tel: +86-731-8836834; E-mail: csj8615@126.com

教育部科研重点项目(No. 03126)资助。

植物内生真菌(Endophytic fungi)是指在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌^[1]。植物内生真菌几乎存在于所有目前已研究过的植物中,与宿主植物表现为互惠共生的关系。内生真菌的次生代谢产物十分丰富,能刺激植物的生长发育,提高宿主植物对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力^[2],而且它被视为新型生物活性物质的重要来源^[3,4]。

自 1993 年, Stierle A^[5]等从短叶红豆杉(*Taxus sp.*)的韧皮部分离到 1 株产抗癌药物紫杉醇内生真菌以来,人们对红豆杉内生真菌次生代谢物进行了广泛的研究并取得了一系列的成果^[6,7]。而从传统药用植物以及一些特殊环境中植物的内生真菌代谢产物中寻找新型活性物质,将继续是内生真菌研究的主流^[8]。

由于人类病原菌如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、链球菌(*Streptococcus*)、肠道球菌(*Enterococcus*)等的抗药性不断增强,人们迫切需要寻找更多更有效的抗菌新药^[9]。目前,人们正通过各种手段和渠道寻找新的高效药物,如有机合成,从动植物组织中提取,利用微生物发酵等。利用内生真菌等微生物通过发酵大量生产有用化合物,不存在资源破坏、短缺等问题,且可以通过改进发酵工艺及选育诱导菌种提高目标产物的含量,这为微生物发酵产抗菌药物的开发应用奠定了基础^[10]。Yang 等^[11]从红豆杉内生真菌代谢物中分离出 2 种抗生物质; Yu 等^[12]则从南方红豆杉内生真菌中筛选出一株具有明显的抗菌和杀细胞作用的内生真菌 *Bionectria sp.*。在以前的研究中得到了 1 株分离自云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)、能产生紫杉醇类物质的内生真菌^[13]。本研究对它的次生代谢物进行了分离纯化,并对产物的抗菌活性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

目标菌株: 内生真菌 12.3.2: 分离纯化自采集于云南丽江的云南红豆杉树皮韧皮部。

供试菌株: 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*), 枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*), 大肠杆菌(*E. coli*), 绿脓杆菌(*P. aeruginosa*), 白色念珠菌(*C. albicans*)。

以上供试菌株保存于中南大学湘雅医学院微生物研究所。

1.1.2 培 养 基

PDA 固体培养基, 细菌培养用牛肉膏琼脂培养基, 真菌培养用萨市培养基。

BMAPh 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 苯丙氨酸 0.02 g, 乙酸钠 1 g, 水 1000 mL, pH 自然。

1.2 仪 器

安捷伦 1100 型高效液相色谱仪(Hypersil ODS C18 柱/柱长×直径为 250 mm×4.0 mm, 填料粒径为 5 μm); AVATAR360 红外测试仪; QP-2010 质谱仪; INOVA400 核磁共振仪(400 MHz, CDCl₃ 作为溶剂, TMS 为内标物质)。

1.3 次生代谢物提取液的制备

将目标菌株 12.3.2 活化后, 用接种针挑取适量菌丝接种于 BMAPh 液体培养基(500 mL 的三角瓶装液量为 200 mL)。27°C、120 r/min 培养 3 d 后制备种子液; 最后将种子液接种于 5 L 的生物发酵罐中(装液量为 3 L), 培养 6~8 d。

将培养成熟的液体培养基用 4 层纱布过滤, 滤液 45°C 下减压浓缩, 浓缩液加入 1/2 左右体积的三氯甲烷和甲醇混合液(V/V=10:1)进行萃取; 固体菌丝经过捣碎匀浆后加入 50 mL 三氯甲烷浸提 24 h, 分别收集发酵液和菌丝浸提液的有机相, 再加入等体积的水进行二次萃取, 合并菌丝和发酵液的有机相, 之后用离心机在 3000~3500 r/min 离心处理 5~6 min, 弃去沉淀后于 35°C 下减压浓缩除去有机相, 最后用甲醇定容贮于棕色磨口玻璃瓶中备用。

1.4 产物分离纯化

利用硅胶柱层析进行产物分离纯化, 湿法上样。分离采用梯度洗脱(正己烷/丙酮、氯仿/甲醇); 纯化用洗脱剂分别为: 正己烷/丙酮、氯仿/甲醇。

由于菌株 12.3.2 的提取物是有一定颜色的, 因此, 在收集产物时主要依据色带颜色来进行分段收集; 同时利用 TLC 检测确定其中相邻组分的差异, 是否可以合并。

1.5 产物结构鉴定

高效液相色谱纯度检测条件: 流动相: 甲醇(色谱醇)—水(梯度洗脱); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 254 nm、280 nm、320 nm 三波长检测; 进样量: 10 μL; 质谱条件: EI 离子源, 离子源温度 230°C; 电离能量

70 eV; 发射电流 34.6 μ A; 溶剂延迟 3 min; 扫描质量范围: 20~500 amu, 扫描间隔: 0.2 s。

1.6 抗菌活性检测

纸片琼脂扩散法: 取现配的试验菌菌悬液 ($10^6 \sim 10^7$ CFU/mL), 制成含菌平板, 备用; 用无菌镊子取经灭菌后吸取次生代谢物提取物的圆形滤纸片 (直径 6 mm, 每片吸取药液 20 μ L), 置于超洁净台上, 待溶剂挥干后贴于含菌平板, 每板 3 片。细菌置于 37°C 培养 24 h, 真菌置于 28°C 下培养 48 h 后观察并测量抑菌圈直径, 每个实验重复 3 次, 结果取平均值。

2 结果

2.1 产物分离

两次硅胶柱层析共分离纯化得到 3 个化合物: 组分 1(淡黄色油状物), 组分 2(草绿色油状物), 组分

3(淡黄色油状物)。

2.2 产物结构鉴定

组分 1 纯度: 95.79%。

IR 光谱特征吸收 3046、3015, 表明有双键存在; 1380~1370 附近 2 个强度几乎相等的吸收峰为 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 的特征峰(图 1)。

MS 分子离子峰 272(丰度 100), 数据分别为: 41.0(33.9)、55.0 (32.8)、69.0 (29.8)、81.0(64.0)、91.0(34.5)、93.0(73.8)、105.0(50.3)、107.0(57.1)、119.0(51.8)、121.0(51.5)、133.0(40.9)、135.0(31.4)、161.0(33.2)、229.0(57.8)、272.0(100.0)、273.0(22.5)、274.0(2.4)分子量为偶数, 不含氮。通过 NIST107 质谱库进行检索, 可能的化合物是: 松柏烯(Cembrene)、2-羟基棕榈酸(2-hydroxy-hexadecanoic acid)、十五酸(Pentadecanedioic acid)、3-苯基-1-邻乙氧苯基-2-硫脲(1-(p-ethoxyphenyl)-3-phenyl-2-thiourea)等。

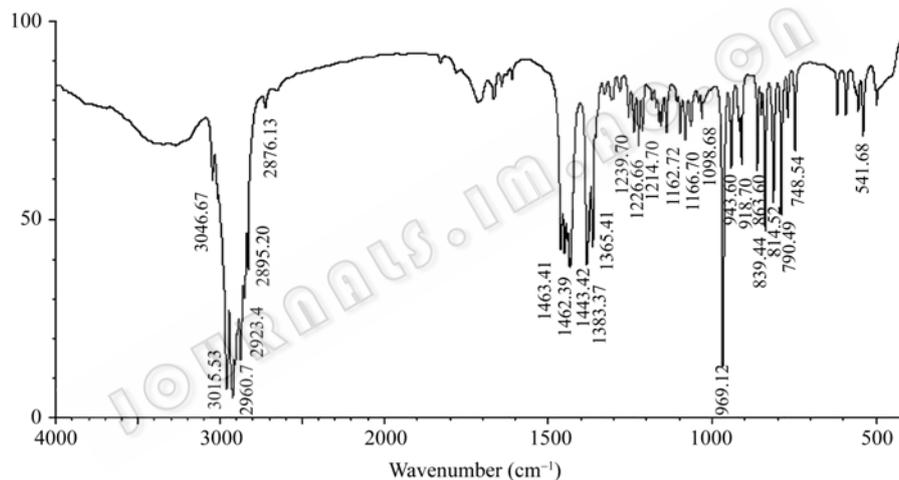


图 1 组分 1 的红外光谱图谱

Fig. 1 Infrared spectra chromatogram of component 1.

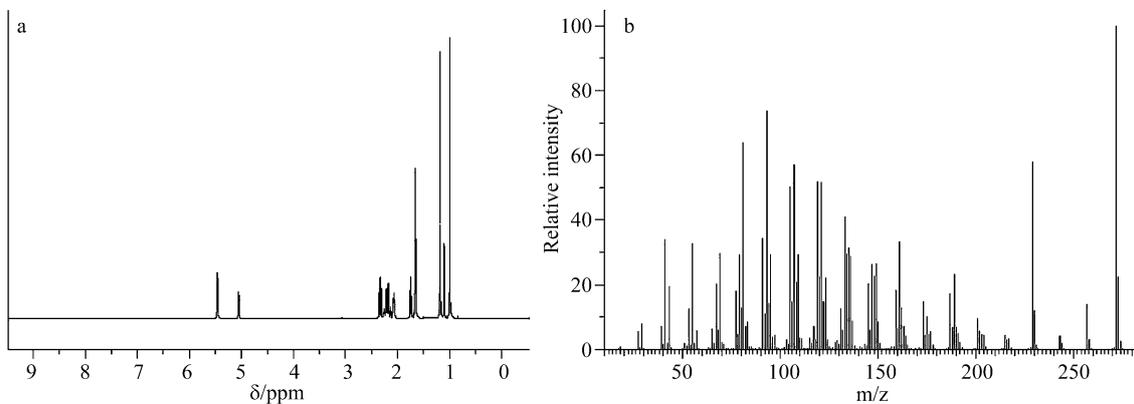


图 2 组分 1 的核磁共振氢谱(a)和质谱(b)图谱

Fig. 2 ^1H -nuclear magnetic resonance(a) and mass spectra(b) chromatogram of component 1.

$^1\text{H-NMR}$ 1.03, 1.07(d, $J=6.9\text{Hz}$, 6H, 2CH_3), 1.55(s, 3H, CH_3), 1.62(s, 3H, CH_3), 1.69(s, 3H, CH_3), 1.23-2.57(m, 17H, 5CH_2 , $5\text{CH}_2\text{CH}$), 5.05(t, $J=7.0\text{Hz}$, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 5.88-5.98(ABq, $J=11.4\text{Hz}$, 2H, trans $=\text{CH}-\text{CH}=\text{}$)(图 2)。

结合上述数据, 与文献[14]对比得出, 组分 1 属于西松烷二萜, 松柏烯 [3,7,11-trimethyl-14-(1-methylethyl)-1,3,6,10-cyclotetradecatetraene], 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$, 分子结构如图 3。

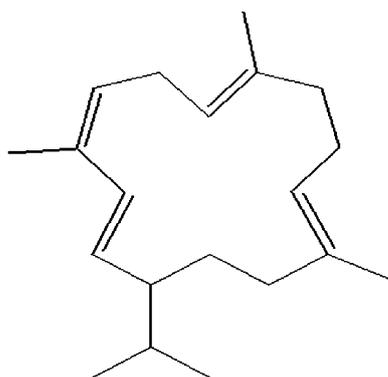


图 3 组分 1 的化合物结构式

Fig. 3 Structural formulae of component 1.

组分 2 纯度: 97.24%。

IR 光谱 3074(H-Ar); 2960, 2934, 2874, 1463, 1381($-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$); 1726(酯羰基); 1608, 1587, 1436(苯环骨架振动); 1076, 1134(酯 C-O-C 的伸缩振动); 730(邻苯二取代)(图 4)。

MS 谱图显示分子量为 390。分子量为偶数, 表明

不含氮, 根据 NIST107 质谱库进行检索, 可能为邻苯二甲酸-(2-乙基)-己酯(Bis-(2-ethylhexyl)-phthalate)、邻苯二甲酸二异辛酯(1,2-benzenedicarboxylic acid diisooctylester)、邻苯二甲酸二-(2,2,4,4-四甲基丁酯)(Phthalic acid bis (6-methylheptyl) ester)(图 5)。

$^1\text{H-NMR}$ 分析 7.70 (dd, 2H, Ar-H), 7.53 (dd, 2H, Ar-H), 4.38-4.07 (d, 4H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$), 1.63 (m, 2H, 2CH_2-), 1.55-1.26 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$), 0.99-0.78 (m, 12H, $-\text{CH}_3$)(图 5)。

该化合物的各种波谱数据和文献[15]报道的的化合物邻苯二甲酸二异辛酯一致, 基于上述分析, 鉴定该化合物为邻苯二甲酸二异辛酯(1,2-benzenedicarboxylic acid diisooctylester), 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$, 分子结构如图 6。

组分 3 纯度: 96.61%。

IR 谱图的 3461 处有吸收, 同时 1302-1036 有宽的吸收, 表明含有酯基; 3003、1655 表明有 $\text{C}=\text{C}$ 双键存在(图 7)。

MS 图谱根据 NIST107 质谱库进行检索, 发现与油酸乙酯($\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$)的相似度达到 97%。因此, 组分 3 可能为油酸乙酯(图 8)。

$^1\text{H-NMR}$ 5.34(m, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 4.12(m, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 2.28(t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 2.01(m, 4H, $-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$), 1.62(m, 4H, $-\text{CH}_2-$), 1.31(m, 12H, $-\text{CH}_2-$), 1.27(m, 8H, $-\text{CH}_2-$), 1.25(t, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.88(t, 3H, $-\text{CH}_3$)(图 8)。

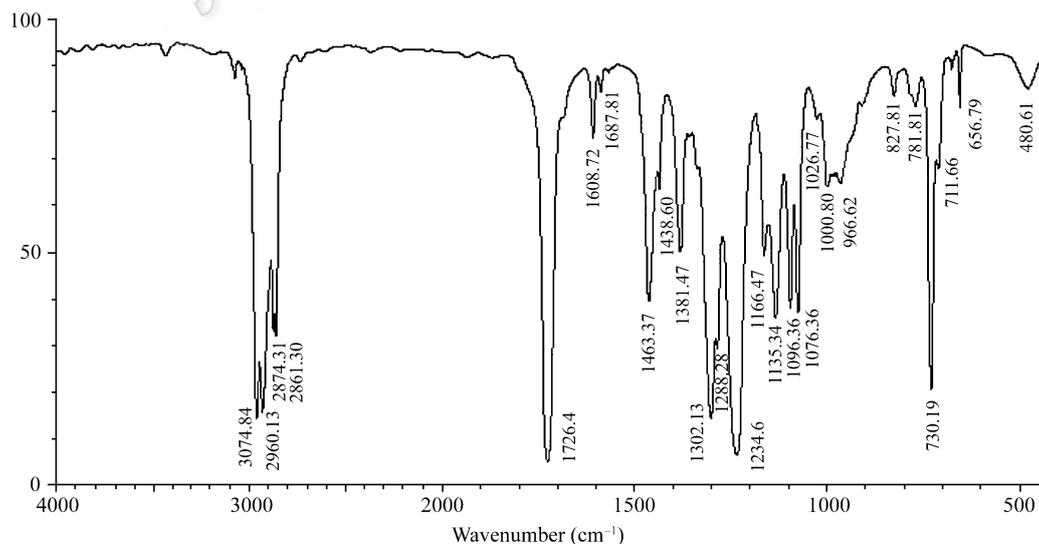


图 4 组分 2 的红外光谱图谱

Fig. 4 Infrared spectra chromatogram of component 2.

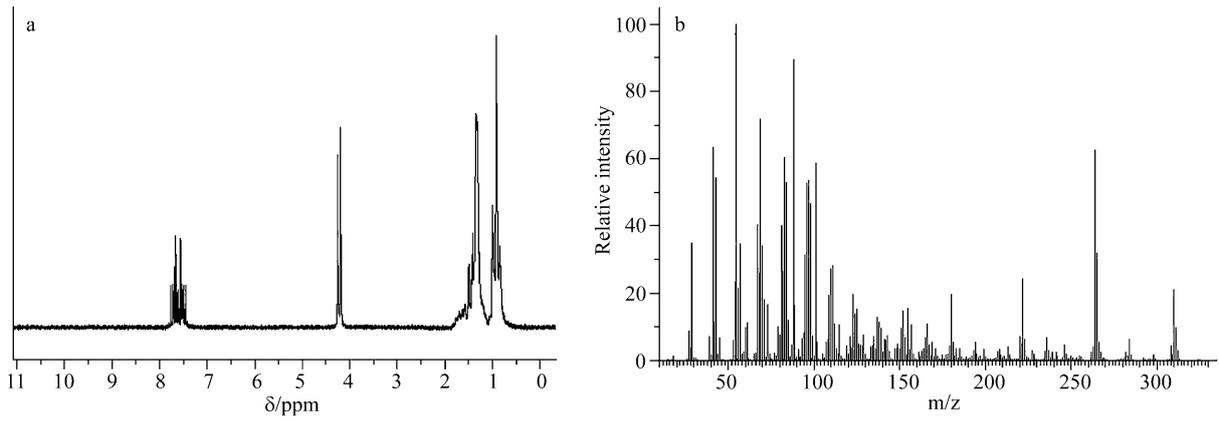


图5 组分2的核磁共振氢谱(a)和质谱(b)图谱
Fig. 5 ¹H-nuclear magnetic resonance(a) and Mass spectra(b) chromatogram of component 2.

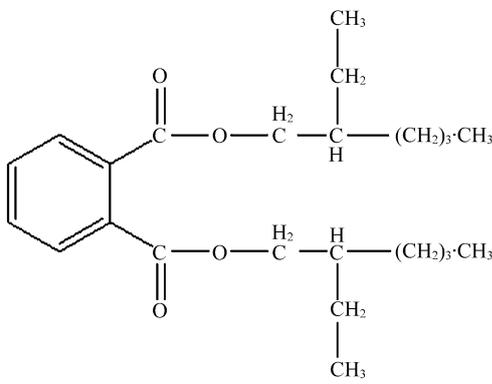


图6 组分2的化合物结构式
Fig. 6 Structural formulae of component 2.

结合上述数据,可以确定组分3是油酸乙酯(9-octadecenoic acid-ethyl ester),分子式为C₂₀H₃₈O₂,分子结构如图9。

2.3 抗菌活性检测

通过表1可以知道,3个组分对5种受试菌株都有抑制作用。其中组分1对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和白色念珠菌有较强的抑制作用;组分2对枯草杆菌和白色念珠菌的抑制作用不明显;组分3对绿脓杆菌的抑制作用不明显,对其余4株受试菌株都有一定的抑制作用。

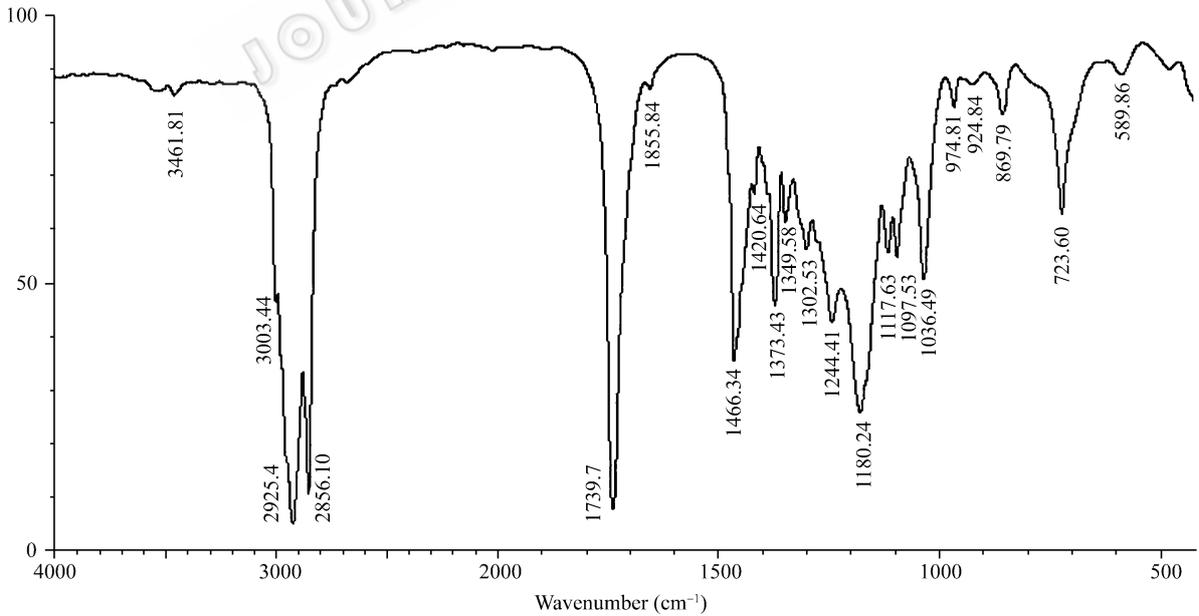


图7 组分3的红外光谱图谱
Fig. 7 Infrared spectra chromatogram of component 3.

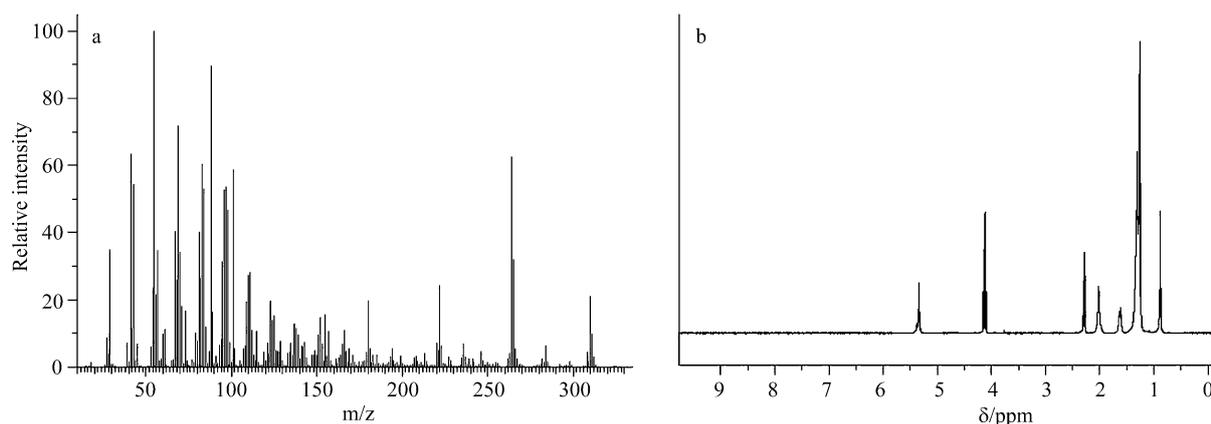


图 8 组分 3 的质谱(a)和核磁共振氢谱(b)图谱

Fig. 8 Mass spectra(a) and ^1H -nuclear magnetic resonance(b) chromatogram of component 3.

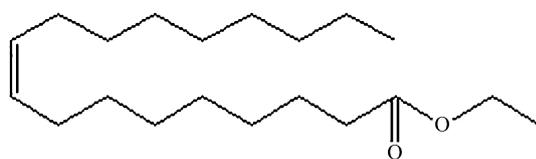


图 9 组分 3 的化合物结构式

Fig. 9 Structural formulae of component 3.

表 1 三组分对 5 种人类致病菌的抑制作用

Table 1 The bioactivity results of the three components to the five human-pathogenic microbes

Test strains	Component 1	Component 2	Component 3
<i>S. aureus</i>	++	+	+
<i>B. subtilis</i>	++	±	+
<i>E. coli</i>	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	±
<i>C. albicans</i>	++	±	+

The diameter of inhibition zone $\varnothing > 13$ mm (++) , 6–13 mm (+) , inconspicuous (±).

3 讨论

从红豆杉内生真菌 12.3.2 次生代谢物中分离出的组分 1 松柏烯属于二萜类化合物。西松烷 (Cembrane) 型大环二萜类化合物是一类结构新颖复杂, 并具有显著生物活性的天然产物。大量的西松烷型二萜内酯类化合物几乎都是从海洋软珊瑚中分离得到^[16]。Song 等首次从中国松树油性树脂中检测到松柏烯^[17]。已经有研究表明, 该类化合物中有许多物质具有显著和广谱的生物活性^[18]。抗菌活性试验表明, 此次从内生真菌次生代谢物中分离出的松柏烯对 5 种供试菌都有抑制作用, 是种广谱的抗菌剂。尤其对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和白色念珠菌有较好的抑制作用, 有良好的开发利用前景。本

研究首次报道从植物内生真菌次生代谢物中分离得到松柏烯, 为松柏烯的来源开辟了一条重要的途径, 同时也为松柏烯的开发利用奠定了基础。

组分 2 邻苯二甲酸二异辛酯具有抗菌活性能力^[19], 对土壤系统中所测试生物的生长和生理均有一定抑制作用。它还是种用途广泛的芳香羧酸酯化合物, 有开发为农药载体、驱虫剂、化妆品、香味剂、润滑剂的生产原料的应用前景^[20]。本试验中邻苯二甲酸二异辛酯对其中的 3 种人类致病菌表现出一定的抑制作用, 但是鉴于它以多种方式危害人体和生物, 虽然它并不属于巨毒物质, 对人体的三致(致癌、致畸、致死)作用还存在着争议, 但其对动物的三致作用和生理危害明显, 因此不建议开发成药物使用。

组分 3 油酸乙酯主要用作润滑剂、抗水剂、树脂韧化剂。将其用作杀虫剂辅剂, 可以提高杀虫剂的渗透能力, 更加快速、有效地击倒害虫, 对杀虫剂起明显的增效作用。其次, 研究表明油酸乙酯还有降低血脂防止动脉血管硬化及抗病原菌作用等^[21]。生物活性试验表明, 油酸乙酯有一定的抗人类病原菌的作用。而且在工业上油酸乙酯也有很大的用途, 是多种植物挥发油的主要成分^[22], 有开发利用价值。

本试验对 3 个组分的抑菌活性进行了定性的评价, 重复试验表明其抑菌活性稳定, 但没有测定其最小抑菌浓度, 这对结果的判定会产生一定的影响。

本试验从红豆杉内生真菌 12.3.2 次生代谢物中共分离得到 3 个化合物: 松柏烯、邻苯二甲酸二异辛酯、油酸乙酯, 但微生物发酵产物种类十分丰富, 要分离得到更多有用的化合物还需要进行大量的工作。在此次试验中一些重要的化合物未被分离出来,

比如在 HPLC 检测的过程中发现 12.3.2 次生代谢物中含有紫杉醇类化合物^[13], 但却未分离纯化得到, 原因可能是紫杉醇类化合物的含量十分低, 在分离纯化过程中跟其他物质混在一起没有得到很好的分离。因此下一步需要通过改变洗脱剂或分离手段来提高分离效果, 以期得到更多有用化合物(特别是紫杉醇类化合物), 并对其进行抗菌抗肿瘤研究。

REFERENCES

- [1] Petrini O. Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: Andrews J H, Hirano SS, Ed. *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer Verlag, 1991: 179-197.
- [2] Liang ZQ. The diversity of fungal secondary metabolites and their potential applications. *Chin Biodiv*, 1999, 7(2): 145-150.
梁宗琦. 真菌次生代谢产物多样性及其潜在应用价值. *生物多样性*, 1999, 7(2): 145-150.
- [3] Huang YJ, Wang JF, Li GL, et al. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2001, 31(2): 163-167.
- [4] Strobel GA. Endophytes as source of bioactive products. *Microbes Infect*, 2003, 5(6): 535-544.
- [5] Stierle A, Stroble G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [6] Chen JH, Liu JJ, Zang GG, et al. Screening of taxol-producing endophytic fungi and regulation of fermentation conditions. *J Cent S Univ (Nat Sci)*, 2004, 35(1): 65-69.
陈建华, 刘佳佳, 臧巩固, 等. 紫杉醇产生菌的筛选与发酵条件的调控. *中南大学学报 (自然科学版)*, 2004, 35(1): 65-69.
- [7] Xu F, Tao WY, Cheng L, et al. Strain improvement and optimization of the media of taxol-producing fungus *Fusarium maire*. *Biochem Eng J*, 2006, 31(1): 67-73.
- [8] Zou WX, Tan RX. Recent advances on endophyte research. *J Integr Plant Biol*, 2001, 43(9): 881-892.
邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展. *植物学报*, 2001, 43(9): 881-892.
- [9] Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiol*, 2002, 148(9): 2675-2685.
- [10] Yang CP, Chen HB, Wu WJ, et al. Diversity of plant endophytic fungi secondary metabolites and their potential applications. *Acta Agric Boreal-Occident Sin*, 2005, 14(2): 126-132.
杨春平, 陈华保, 吴文君, 等. 植物内生真菌次生代谢产物的多样性及潜在应用价值. *西北农业学报*, 2005, 14(2): 126-132.
- [11] Yang XS, Strobel G, Stierle A, et al. A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. *Plant Sci*, 1994, 102(1): 1-9.
- [12] Yu Y, Hu CH. Separation and identification of a new *Taxus chinensis* var. *mairei* endophytic fungus (*Bionectria* sp.) and the activity of its metabolites. *J Southwest Univ (Nat Sci Ed)*, 2007, 29(6): 131-135.
余艳, 胡昌华. 南方红豆杉内生真菌 *Bionectria* sp. 的分离、鉴定及代谢产物活性研究. *西南大学学报*, 2007, 29(6): 131-135.
- [13] Liu JJ, Gong HX, Yang DL, et al. Study on endophytic fungi producing taxol isolated from *Taxus yunnanensis*. *Progress Mod Biomed*, 2006, 6(12): 53-55.
刘佳佳, 龚汉祥, 杨栋梁, 等. 产紫杉醇类云南红豆杉内生真菌筛选的研究. *现代生物医学进展*, 2006, 6(12): 53-55.
- [14] Li J, Lan J, Liu ZS, et al. First total synthesis of three cembrene diterpenoids. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1996, 10(7): 2851-2861.
- [15] Liu X, Hu YX, Zhang L. Synthesis of di(2-ethylhexyl) phthalate by transesterification. *Chem R*, 2004, 5(26): 301-302.
刘霞, 胡应喜, 张琳. 酯交换法合成邻苯二甲酸二异辛酯. *化学试剂*, 2004, 5(26): 301-302.
- [16] Li GQ, Zhang YL, Lin WH. Research progress on the cembranoid diterpenes from oceanic organisms. *Period Ocean Univ China*, 2006, 36(3): 370-372.
李国强, 张艳玲, 林文翰. 西松烷二萜类海洋活性成分研究进展. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(3): 370-372.
- [17] Song ZQ, Lang ZQ, Liu X. Chemical characteristics of oleoresins from Chinese pine species. *Biochem Syst Ecol*, 1995, 23(5): 517-522.
- [18] Rashid MA, Gustafson KR, Boyd MR. HIV-inhibitory cembrane derivatives from a Philippines collection of the soft coral *Lobophytum* species. *J Nat Prod*, 2000, 63(4): 531-533.
- [19] Chen Q, Sun HW, Wang B, et al. Effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on microorganisms and animals in soil. *J Agro-Environ Sci*, 2004, 23(6): 1156-1159.
陈强, 孙红文, 王兵, 等. 邻苯二甲酸二异辛酯 (DEHP) 对土壤中微生物和动物的影响. *农业环境科学学报*, 2004, 23(6): 1156-1159.
- [20] Xia FY, Zheng P, Zhou Q, et al. Relationship between quantitative structure and biodegradability for phthalic acid ester compounds. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci)*, 2004, 30(2): 141-146.
夏凤毅, 郑平, 周琪, 等. 邻苯二甲酸酯化合物生物降解性与其化学结构的相关性. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 2004, 30(2): 141-146.
- [21] Ward WB. *The Nematode Caenorhaditis Elegans* Maupous. New York: Cold Spring Harbour Press, 1988: 567-573.
- [22] Lou N, Li Ya, Li Yu. Chemical constituents of the essential oil from *Potentilla glabra* var. *mandshurica* Maxim. *J Lanzhou Univ (Nat Sci Ed)*, 2004, 4(40): 58-60.
娄宁, 李亚, 李瑜. 白毛银露梅挥发性化学成分研究. *兰州大学学报 (自然科学版)*, 2004, 4(40): 58-60.