

# 厌氧复合菌群 JZ-1 降解拟除虫菊酯的特性和组成多样性研究

张松柏<sup>1,2</sup>, 尹乐斌<sup>1</sup>, 刘勇<sup>1,2</sup>, 张德咏<sup>1,2</sup>, 罗香文<sup>2</sup>, 成飞雪<sup>2</sup>, 罗源华<sup>2</sup>

(1.中南大学研究生院隆平分院,长沙 410125;2.湖南省植物保护研究所,长沙 410125)

**摘要:**从农药厂废水中分离到能够降解多种拟除虫菊酯的复合菌群 JZ-1,对该菌群降解特性研究结果表明,最佳降解条件为 pH 7、温度 30℃,在最佳条件下培养 15 d,对 100 mg·L<sup>-1</sup> 甲氰菊酯、氟氰菊酯、氯氰菊酯的降解率分别为 53.27%、33.36%、41.39%。对该菌群的 16S rDNA 进行扩增和 RFLP 及测序分析结果表明,该菌群含有丰富的细菌资源,该菌群的优势种群包括红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)和紫单胞菌科细菌(*Porphyromonadaceae bacterium*)。该研究为拟除虫菊酯的降解菌资源的挖掘和利用提供了理论参考。

**关键词:**厌氧复合菌群;拟除虫菊酯;降解特性;16S rDNA-RFLP

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2010)06-1150-06

## Composite Diversity and Degradation Characteristics of Synthetic Pyrethroids(SPs) Degradation Anaerobic Microbial Community JZ-1

ZHANG Song-bai<sup>1,2</sup>, YIN Le-bin<sup>1</sup>, LIU Yong<sup>1,2</sup>, ZHANG De-yong<sup>1,2</sup>, LUO Xiang-wen<sup>2</sup>, CHENG Fei-xue<sup>2</sup>, LUO Yuan-hua<sup>2</sup>

(1.Branch of Longping, Graduate College, Central South Universal, Changsha 410125, China; 2.Hunan Plant Protection Institute, Changsha 410125, China)

**Abstract** Synthetic pyrethroids(SPs) degrading microbial community JZ-1 was domesticated by selective culture. Degrading experiments showed the optimum degrading conditions were pH 7, 30 °C. JZ-1 degraded fenprothrin, cyfluthrin and cypermethrin with a concentration of 100 mg·L<sup>-1</sup> up to 53.27%, 33.36%, 41.39% in 15 days in optimum conditions, respectively. The nearly complete 16S rDNA were amplified from JZ-1 using bacterial universal primers 27F and 1492R. The restriction analysis was performed following separate digestion with enzyme *Rsa* I, Which showed there were six clusters in JZ-1, Which meant there were plenty of degradation bacterial resources in JZ-1. The representative 16S DNA sequences of six clusters were sequenced, and showed that the major clusters were *Rhodopseudomonas* and *Porphyromonadaceae bacterium*, respectively. This study contributes to screen and apply SPs degrading organisms for SPs biodegradation.

**Keywords** anaerobic microbial community; synthetic pyrethroids; degradation characteristics; 16S rDNA-RFLP

农药的使用是现代农业生产中不可缺少的重要组成部分。拟除虫菊酯杀虫剂作为一类广谱高效的杀虫剂,一直被认为是一种安全有效的农业虫害防治药剂。随着 20 世纪 80 年代无机盐农药、有机氯农药以及 21 世纪部分高毒有机磷农药的相继禁用,拟除虫

菊酯杀虫剂已发展为我国现阶段使用最广泛的农药之一<sup>[1]</sup>。但是在农药使用的过程中,几乎 90%左右的农药都散落在农田里,随后与灌溉水或由雨水冲刷流入江河湖泊,其所经过的流域普遍受到污染;农药生产排出的废水流入水域也是引起水域污染的重要原因<sup>[2]</sup>。拟除虫菊酯杀虫剂具有对光、热稳定的特点,在环境中的半衰期较长<sup>[3]</sup>,因此在自然条件下一般都较难降解,长期大规模的生产和使用对生态环境造成了严重的污染。

大量研究表明,使环境污染物质转化和降解的生物主要是微生物<sup>[4]</sup>,近年来,以生物修复(Bioremediation)作为理论基础的农药残留降解菌技术为降低农

收稿日期:2009-12-22

基金项目:国家“863”计划项目(2006AA10Z401);国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD17B08,2006BAD08A08);湖南省农村科技计划重点项目(2008NK2009)

作者简介:张松柏(1980—),男,湖北监利人,博士生,助理研究员,主要从事环境微生物学和植物病理学研究。

E-mail: zsongb@hotmail.com

通讯作者:刘勇 E-mail: haoasliu@163.com

产品和农业生产环境中农药残留的一种重要手段,目前已成为去除农药残留污染的一种重要方法。国内外很多有关农药残留降解菌研究的报道,其中拟除虫菊酯杀虫剂的生物修复在降解菌的筛选和降解特性方面报道较多<sup>[4-5]</sup>,但鲜见降解拟除虫菊酯类农药厌氧复合菌群多样性的研究报道。

本研究通过富集培养、驯化得到拟除虫菊酯的降解菌群 JZ-1,进一步测定了该菌群对拟除虫菊酯杀虫剂的降解能力。提取菌群总 DNA,选择性扩增细菌 16S rDNA 片段,在此基础上建立 16S rDNA 克隆文库,并利用 RFLP 法对其进行分析,从而获得该降解菌群结构及其多样性的初步信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基、试剂和仪器

主要试剂:40%甲氰菊酯乳油,5%氟氯氰菊酯乳油,25%氯氰菊酯乳油,海南正业化工有限公司惠赠;甲氰菊酯、氟氯氰菊酯、氯氰菊酯标样(纯度均为98.0%)购自天津东方绿色技术发展有限公司。其他试剂为分析纯或色谱纯。

主要仪器:气相色谱仪(Agilent 6890N, USA),分光光度计(Tu-1901,北京普析通用仪器有限责任公司),凝胶成像系统(Tanon-1600,上海天能科技有限公司),农药残留由湖南省植物保护研究所农药残留检测室进行检测。

培养基:驯化培养基参照张松柏等<sup>[6]</sup>PSB培养基,置于充满CO<sub>2</sub>的普通干燥缸中培养。选择培养基:驯化培养基中加入一定浓度的相应的甲氰菊酯。固体培养基:在相应培养基中加入1.5%的琼脂。

### 1.2 菌群的驯化

废水及污泥混合物:采集于山东某农药厂废水排放口。

菌群的驯化参照刘婷等<sup>[7]</sup>的方法,废水和污泥混合物共2.0 g接种至120 mL驯化培养基中,于(30±1)℃下培养7 d至菌液浑浊,取0.5%接种于含20 mg·L<sup>-1</sup>的甲氰菊酯的选择培养基中,每7 d进行1次转移接种,并逐渐增加选择培养基中甲氰菊酯的浓度,直至最终浓度达到100 mg·L<sup>-1</sup>,命名为JZ-1。每批做3个转移接种,每批均设不加菌作为对照。

### 1.3 菌群细胞的获得

用驯化好的厌氧菌群 JZ-1 菌液,8 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min得到菌体细胞。用驯化培养基清洗2次(每次清洗后4 000 r·min<sup>-1</sup>,4℃离心10 min),之后重悬

于驯化培养基,并调整OD<sub>600</sub>为0.6左右。

### 1.4 菌群降解拟除虫菊酯农药特点

#### 1.4.1 不同初始条件下降解试验

120 mL的含拟除虫菊酯农药100 mg·L<sup>-1</sup>的选择培养基中,加入0.5%的JZ-1菌液,培养15 d后取样测定拟除虫菊酯农药残留量。试验设定不同初始温度及pH值以考察菌群的降解性能及降解最适条件。试验同时分别设未加菌的灭菌培养基在同等条件下作为对照。试验均设3次重复。

#### 1.4.2 菌群在最佳降解条件下降解试验

120 mL的含拟除虫菊酯农药100 mg·L<sup>-1</sup>的PSB培养基中,加入0.5%的JZ-1菌液,与最佳初始条件培养,每隔一段时间取样,测定拟除虫菊酯农药残留量。设未加菌的灭菌培养基在同等条件下作为对照。试验均设3次重复。

### 1.5 拟除虫菊酯农药残留量测定

120 mL样品,用正己烷萃取3次,每次用量分别为40、40、30 mL。旋转蒸发器上蒸干,然后用正己烷溶解并用容量瓶定容至10 mL,接着加入无水硫酸钠脱水。气相色谱测定其含量<sup>[6]</sup>。以相应的标样定性定量,所有数据均为3次重复平均值。

测试条件如下:气相色谱仪型号 Agilent 6890N,色谱柱型号为 HP-5(30 m×0.32 mm×0.25 μm),采用程序升温法:毛细管柱起始温度160℃,保持5 min,10℃·min<sup>-1</sup>升至200℃,保持1 min,10℃·min<sup>-1</sup>升至280℃,保持8 min,检测器(μECD)温度320℃,进样口温度250℃,载气为N<sub>2</sub>(纯度99.99%),流量1 mL·min<sup>-1</sup>。进样量均为1 μL,分流比20:1。

农药降解率的计算方法:

$$\text{降解率}(\%) = (1 - C_1/C_0) \times 100$$

式中:C<sub>1</sub>为降解菌处理甲氰菊酯残留浓度,C<sub>0</sub>为对照处理甲氰菊酯残留浓度。

### 1.6 16S rDNA 扩增

细菌基因组提取采用上海生工生物工程技术服务有限公司 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒。以所提的细菌总 DNA 为模板,采用细菌 16S rDNA 通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3')和 1492R(5'-TACCTTGTTACGACTT-3')进行序列扩增<sup>[6]</sup>,PCR 反应体系(总体积 50 μL):10×PCR Buffer 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol·L<sup>-1</sup>)2 μL, dNTP(10 mmol·L<sup>-1</sup>)1 μL,引物 27F/1492R(25 μmol·L<sup>-1</sup>)各 0.5 μL, Taq 酶(5 U·μL<sup>-1</sup>)0.5 μL; 双蒸水 43 μL。PCR 扩增条件为:94℃,4 min;94℃,1 min;50℃,1 min;72℃,1 min;30个

循环,最后 72 °C,10 min。PCR 反应完成后,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增片断。PCR 反应重复 10 次,以消除单次 PCR 反应的偏好。

### 1.7 RFLP 分析

扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳回收,通过 TA 克隆技术将 16S rDNA 片段与 pUC-T 载体连接,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。蓝白斑方法筛选转化子。挑取白色克隆子,用 pUC-T 载体通用引物 M13/pUC(-29)back(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')与 T7 Promoter(5'-TAATACGACTCACTATAGG G-3')重新进行 PCR 扩增。用 *Rsa* I 限制性内切酶消化 PCR 扩增产物,37 °C 过夜。酶切 DNA 片断用 2%的琼脂糖凝胶电泳分离,经溴化乙锭染色和凝胶成像系统成像后,所得 DNA 带型图谱在天能凝胶分析系统辅助下人工进行比较分析。

克隆 16S rDNA 文库库容 Coverage(*C*)值的计算公式为:

$$C=[1-(n/N)]\times 100\%$$

式中 *n* 为含单个克隆的 OTU (Operational Taxonomic Unit, 16S rDNA 经 *Rsa* I 消化所获得的基因图谱相同),则认为他们是相同的基因型,每一个基因型作为一个 OTU<sup>[8]</sup>数;*N* 为总克隆数。

根据克隆文库中的 OTU 种类和每个 OTU 的克隆数目,计算出 Shannon-Wiener 多样性指数(*H*),计算公式为:

$$H=-\sum p_i \ln p_i (p_i=ni/N)$$

式中 *ni* 为每个 OTU 的克隆数目;*N* 为文库中的总克隆数目<sup>[9]</sup>。

### 1.8 测序与系统进化树分析

根据 RFLP 结果挑出有代表性的克隆子送上海生工生物技术服务有限公司测序。测定的 16S rDNA 序列用 BLAST 在 GenBank 中搜索相近序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。利用 Mega 3.1 软件进

行多序列联配,构建系统发育树<sup>[10]</sup>。

### 1.9 核酸序列注册登记号

测定的 16S rDNA 序列已经提交到 GenBank 数据库,登录号为 GU247215-GU247220(CS1-CS6)。

## 2 结果与分析

### 2.1 驯化结果

取菌群 JZ-1 约 5 mL,接种于 120 mL 含 100 mg·L<sup>-1</sup> 甲氰菊酯的 PSB 选择培养基,微生物生长的判断采用分光光度计测定在 OD<sub>600</sub> 的吸光值,定时取菌群 JZ-1 培养物 1 mL,稀释 10 倍后测定菌群的 OD<sub>600</sub> 吸光值。菌群 JZ-1 在选择培养基中延滞期约 2 d,快速增长期约 5 d,经 9 d 达到稳定期(图 1)。

### 2.2 菌群的降解特点

#### 2.2.1 最佳降解条件

表 1 为菌群 JZ-1 在 15 d、不同初始条件下降解 3 种拟除虫菊酯农药的降解效率,结果表明,菌群 JZ-1 降解 3 种拟除虫菊酯农药的最佳降解条件为 pH 7,温度 30 °C。

#### 2.2.2 降解效率

菌群 JZ-1 对 3 种菊酯类杀虫剂的降解能力表明(图 2),菌群 JZ-1 能有效的降解这 3 类拟除虫菊酯

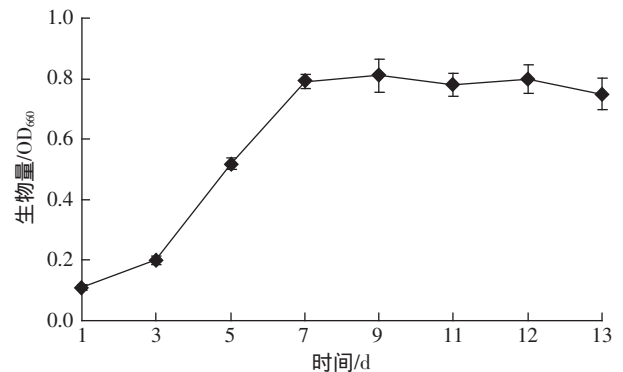


图 1 复合菌群的生物量

Figure 1 The biomass of microbial community JZ-1

表 1 JZ-1 降解拟除虫菊酯农药的最佳条件

Table 1 The optimum degrading conditions of SPs by organism-community JZ-1

温度/°C	pH	降解效率/%			温度/°C	pH	降解效率/%		
		甲氰菊酯	氟氯氰菊酯	氯氰菊酯			甲氰菊酯	氟氯氰菊酯	氯氰菊酯
15	7.0	8.65±0.53	7.34±0.71	7.61±0.81	5.0	30	12.35±0.21	8.69±0.74	11.45±0.58
20	7.0	18.32±1.02	17.24±0.52	15.25±0.62	6.0	30	38.54±1.58	24.87±2.04	22.34±2.34
25	7.0	38.57±2.31	20.52±1.41	28.36±0.84	7.0	30	54.07±3.22	33.06±1.07	41.52±3.14
30	7.0	51.23±2.54	32.47±3.02	42.03±2.17	8.0	30	41.47±1.24	28.34±0.84	32.87±0.91
35	7.0	32.67±1.07	21.38±1.01	25.27±1.34	9.0	30	18.54±0.19	9.21±0.24	9.65±0.47
40	7.0	22.17±1.24	14.86±0.32	16.31±0.87	10.0	30	7.35±1.07	5.14±0.63	5.71±0.29

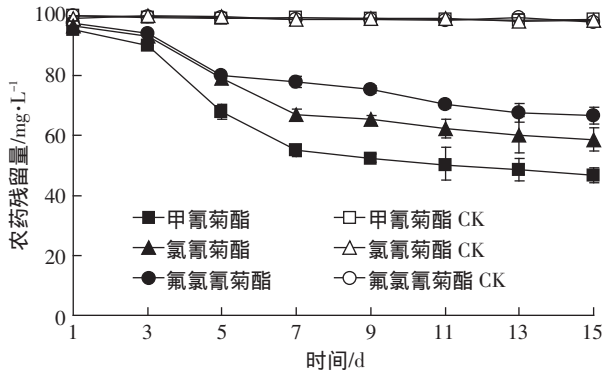


图 2 复合菌群 JZ-1 降解拟除虫菊酯农药效率

Figure 2 Degrading efficiency of SPs insecticides by microbial community JZ-1

农药,但其降解效率并不一致。最佳条件下培养 15 d,对 100 mg · L<sup>-1</sup> 甲氰菊酯、氟氯氰菊酯、氯氰菊酯的降解率分别为 53.27%、33.36%、41.39%。

2.3 16S rDNA 的 PCR 扩增

从 5 mL 培养物中提取获得 20 μL 的菌群总 DNA,直接以此菌群总 DNA 为模板,用细菌通用引物对菌群总 DNA 进行 16S rDNA 扩增,得到大小约为 1 600 bp 的目标片段。

2.4 RFLP 和测序分析

*Rsa* I 限制性内切酶为 4 碱基限制性内切酶,酶切位点特异性高。*Rsa* I 的酶切位点是 GT<sup>r</sup>AC,酶切

位点包括了 TA 位点,在 16S rDNA 片段中酶切频率高,酶切片段丰富,在操纵分类单元 OTU 分类上精确有效。根据 *Rsa* I 酶切分型,将得到的 93 个阳性克隆子分为 6 个 OTU 谱型(图 3),系统发育分析,可将这 6 个 OTU 分成 4 个类群(、、、)(图 4)。其中 2 个 OTU 是优势类型(分别含有 51 和 27 个克隆),4 个 OTU 只含有 2~5 个克隆,文库的库容值为 93.54%,Shannon-Wiener 多样性指数 *H* 为 1.20,对 6 个类型的克隆子进行了测序,将得到的测序结果和 GenBank 数据库中比对并进行系统发育分析。结果表明,2 个优势类型克隆子中,CS1 与红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)亲缘关系最近,相似性为 99%,CS2 与紫单孢菌科细菌(*Porphyromonadaceae bacterium*)亲缘关系最近,相似性为 98%(图 4)。

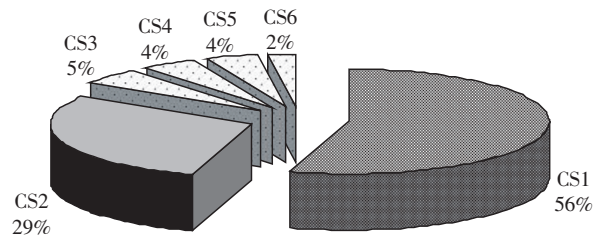
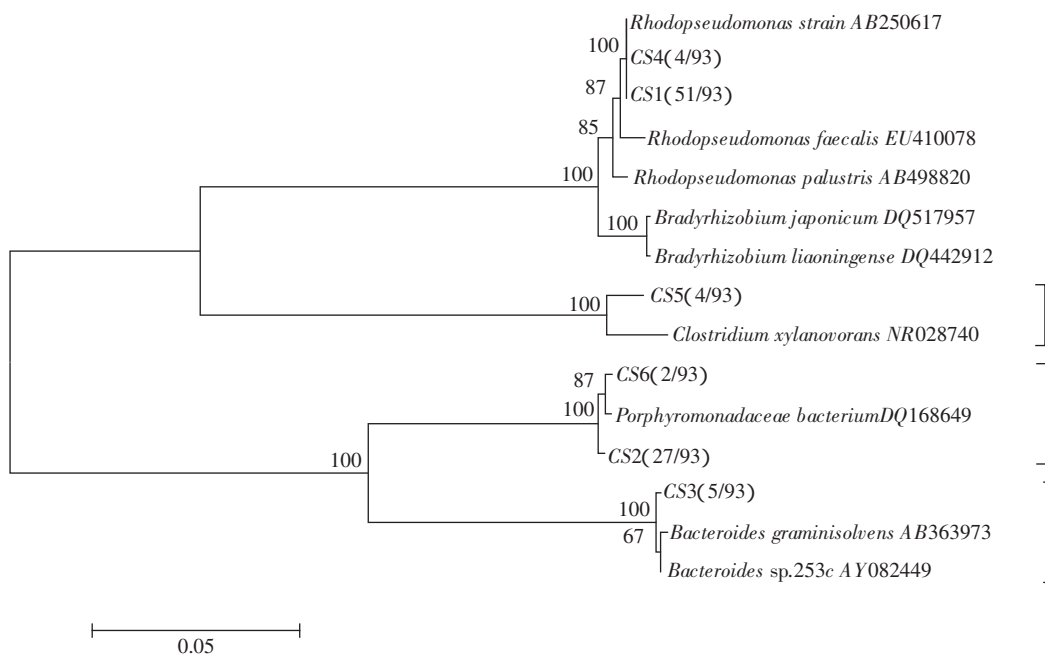


图 3 复合菌群 JZ-1 的 16S rDNA *Rsa* 酶酶切 OTU 及所在比例  
Figure 3 OTU and its percentage of microbial community JZ-1 amplified 16S rDNA after digestion by *Rsa*



The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.  
Bar 5% sequence divergence. Numbers in brackets indicate the clone number out of total clones.

图 4 复合菌群 JZ-1 的 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA of microbial community JZ-1

### 3 讨论

理论上,克隆文库的库容表征样品中微生物种类的覆盖程度<sup>[8]</sup>。本研究通过厌氧驯化培养,获得了对 3 种拟除虫菊酯农药具有较高降解效率的复合菌群 JZ-1,并建立了 93 个克隆的 16S rDNA 文库,文库的库容为 93.54%。表明库容值较大,文库的覆盖程度较高,具有很好的代表性。这也表明本文构建的文库能比较真实的代表菌群 JZ-1 的结构。

由系统发育分析(图 4)可知,复合菌群 JZ-1 中除包含有 3 个属已经分离培养的降解拟除虫菊酯农药的细菌<sup>[4,6]</sup>,还包含一个尚未报道的可以降解拟除虫菊酯农药的细菌资源—紫单孢菌科细菌(*Porphyromonadaceae bacterium*),表明尚有一些新的拟除虫菊酯农药降解菌资源未被发掘。

Shannon-Wiener 多样性指数表征样品中细菌种类多样性。夏北成等<sup>[9]</sup>利用 16S rDNA-RFLP 技术分析多处土壤样品中细菌的群落结果,其多样性指数均大于 2.00。复合菌群 JZ-1 的 Shannon-Wiener 多样性指数  $H$  为 1.20,其多样性指数明显偏低,可能的原因是厌氧条件培养,拟除虫菊酯农药抑制作用,部分细菌无法培养以及 PCR 扩增的偏好等。Watanabe 等<sup>[11-12]</sup>使用不同的 16S rRNA 基因的通用引物对同一地下储油洞内微生物的研究表明,不同引物得到的关于微生物群落结构的结果差异很大。而且单单使用 PCR 这一种方法并不能使我们完全准确地了解到某一特定微生物群落的真实信息。

夏北成等研究表明:16S rDNA-RFLP 技术分析菌群群落的多形性,是通过分子生物学方法所获得一个带有菌群中的 16S rRNA 基因的 *E.coli* 群体。然后,利用特异性的内切酶酶切单一 16S rDNA 序列,从而获得菌群的多样性信息<sup>[9]</sup>。利用单一的特异性内切酶酶切(图 3、图 4)得出不同的 OTU,然而,不同的 OTU 在系统发育树上却聚类在同一个分支(图 4)表明,利用单一的内切酶酶切仅能反映 16S rDNA 序列的部分特征,所得出的 OTU 也仅能反映菌群的部分多样性信息。刘婷等<sup>[7]</sup>在利用单一内切酶(*Rsa*)酶切的基础上,利用第二种特异性内切酶(*Hae*)对相同的 OTU 再进行酶切,获得了更加丰富的 OTU 类型。夏北成等<sup>[9]</sup>研究表明采样的量以及从中获得的克隆数,都是影响菌群多样性信息的因素。

因此,微生物菌群 JZ-1 的结构多样性还需要结合荧光原位杂交、DNA 芯片等其他分子方法对其进

行深入研究。

与分离纯化培养的单一降解菌相比,复合菌群的降解效率相对较低,但其具有较好的环境适应性,从而达到较好的应用效果<sup>[7,13]</sup>。拟除虫菊酯农药残留降解菌在降解菌的分离以及降解特性方面研究较多<sup>[1]</sup>,然而,筛选稳定的降解拟除虫菊酯农药残留的厌氧复合菌群,并分析其降解特性和菌群的多样性的研究还鲜见报道<sup>[4]</sup>。本文筛选的稳定的厌氧复合菌群 JZ-1 为利用复合菌群降解拟除虫菊酯农药残留研究提供一定理论参考。

### 4 结论

(1)通过驯化培养,获得了对 3 种拟除虫菊酯农药具有降解作用的厌氧复合菌群 JZ-1,该菌群降解最佳条件为 pH 7、温度 30 °C;在最佳条件下,对甲氰菊酯、氟氯氰菊酯、氯氰菊酯的降解率为 53.27%、33.36%、41.39%。

(2)构建了复合菌群 JZ-1 的 16S rDNA 的克隆文库,RFLP 分析表明该文库的库容  $C$  为 93.54%,Shannon-Wiener 多样性指数  $H$  为 1.20。

(3)复合菌群 JZ-1 的优势种群为红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、紫单孢菌科细菌(*Porphyromonadaceae bacterium*)。

#### 参考文献:

- [1] 刘尚钟,王敏,陈馥衡.拟除虫菊酯类农药的研究和展望[J].农药,2004,43(7):289-293.  
LIU Shang-zhong, WANG Min, CHEN Fu-hen. Research progress and development prospect of pyrethroid pesticide[J]. *Chinese Journal of Pesticides*, 2004, 43(7):289-293.
- [2] Moses M, Johnston E S, Anger W K, et al. Environmental quality and pesticide exposure[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 1993, 9:913-959.
- [3] MacRae I C. Microbial metabolism of pesticides and structurally related compounds[J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1989, 109:1-87.
- [4] 王兆守,李顺鹏.拟除虫菊酯类农药微生物降解研究进展[J].土壤,2005,37(6):577-580.  
WANG Zhao-shou, LI Shun-peng. Study on microbial degradation of synthetic pyrethroid insecticides[J]. *Soils*, 2005, 37(6):577-580.
- [5] Tallur P N, Megadi V B, Ninneker H Z. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN 1[J]. *Biodegradation*, 2008, 19:77-82.
- [6] 张松柏,张德咏,罗香文,等.降解甲氰菊酯光合细菌的分离鉴定及其降解特性研究[J].农业环境科学学报,2009,28(1):140-144.  
ZHANG Song-bai, ZHANG De-yong, LUO Xiang-wen, et al. Isolation and identification of fenpropathrin degrading strain PSB07-15 and its degradation characteristics[J]. *Journal of Agro-Environment Science*,

- 2009, 28(1) :140-144.
- [7] 刘 婷, 陈朱蕾, 曹 丽, 等. 16S rDNA-RFLP 分析六氯苯好氧降解群的结构及其多样性[J]. 微生物学报, 2006, 46(5) :758-762.  
LIU Ting, CHEN Zhu-lei, CAO Li, et al. 16S rDNA-RFLP analysis of structure and diversity of an aerobic microbial community degrading hexachlorobenzene[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(5) :758-762.
- [8] Moyer C L, Tiedje J M, Dobbs F C. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 :2501-2507.
- [9] 夏北成, Zhou J, Tiedje J M. 土壤细菌类克隆群落及其结构的生态学特征[J]. 生态学报, 2001, 21(4) :574-578.  
XIA Bei-cheng, ZHOU J, Tiedje J M. Structures of bacteria cloning communities in the soil environment and their ecological characteristics[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(4) :574-578.
- [10] Kumar S, Tamura K, Nei M. Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5 :150-163.
- [11] Watanabe K, Kodama Y, Kaku N. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity[J]. *BMC Microbiology*, 2002, 2(1) : 23.
- [12] Watanabe K, Kodama Y, Syutsubo K, et al. Molecular characterization of bacterial population in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 :4803-4809.
- [13] Lakshmi C V, Kumar M, Khanna S. Biodegradation of chlorpyrifos in soil by enriched cultures[J]. *Current Microbiology*, 2009, 58 :35-38.