

山东半岛农药污染点源放线菌多样性及抑菌活性

辛红梅¹, 郭正彦², 范丽霞¹, 胡兆农^{1*}, 吴文君^{1*}

¹西北农林科技大学植物保护学院农药研究所 杨凌 712100

²安徽农业大学资环学院 合肥 230036

摘要:【目的】探究山东半岛农药污染点源放线菌多样性及非链霉菌抑菌活性,试图发现新放线菌和新抗生素。【方法】通过 16S rDNA 序列对已分离得到的 154 株纯培养放线菌进行初步分类鉴定并进行系统发育分析;采用管碟法和菌丝生长速率法检测 10 株非链霉菌的抑菌活性。【结果】154 株放线菌覆盖 7 个科,8 个属,有一株非链霉菌(205)可能为潜在的新种。10 株非链霉菌的发酵液均对供试的植物病原真菌和细菌有不同程度的抑制作用,尤其是菌株 *Microbacterium oxydans* JN853773 和 *Kocuria rosea* JN192402 对所有供试病原菌都有强烈的抑制作用。【结论】农药污染点源可以作为开发新型抗生素产生菌的重要来源。

关键词: 农药污染点源,多样性,非链霉菌,抑菌活性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)04-0435-07

放线菌(Actinomycetes)因其生物活性代谢产物的多样性而一直备受关注,目前在临床医学及农业应用的抗生素四分之三是由放线菌产生的^[1]。随着具有生物活性的菌株被大量分离,再用传统的思路分离放线菌往往造成重复研究,从中发现生物活性化合物的几率也越来越低^[2-3]。为改变这种局面,科学家们拓宽筛选范围,特别注重从极端环境、海洋及动植物体内分离筛选活性菌株,并取得重大成就^[4-7]。农药污染点源是一种特殊的土壤环境,由于农药长期滞留在土壤中,从而会对土壤微生物产生选择性影响。例如:对于某些能利用农药污染物作为碳源或氮源的微生物来说,污染可能会刺激这些微生物的生长繁殖,而对于那些缺乏耐受性的微生物来说,污染物势必会对其生长繁殖产生抑制作用^[8-9]。因此,农药的污染可能导致土壤微生物

群落发生重大改变。

笔者基于“抗生素耐药性诱变”的原理^[10],提出在农药污染源土壤中筛选新型抗生素的思路。通过纯培养及基于 16S rDNA 基因序列的系统发育分析,对山东半岛农药污染点源土壤中放线菌进行多样性研究,旨在获得更多的可培养放线菌资源,为开发新抗生素奠定基础。人们把能用培养基分离纯化的微生物称为可培养微生物,而自然界中的微生物资源还有大部分未得到纯培养,这是因为营养、温度、PH 等复杂的生存条件,所以难以人为设计适合其生长的培养基^[11]。

根据以往的传统方法,人们首先从自然环境中分离并筛选有活性的放线菌,然后发酵从中分离有活性的物质。但是随着大量的筛选,许多菌成为已知菌,许多物质也成为已知化合物,而且经最后鉴

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973”项目(2010CB126105);国家公益性行业(农业)科研专项(200903052);国家自然科学基金(30870344,31171868);中央高校基本科研业务费专项资金(QN2011058)

* 通信作者。Tel/ Fax: +86-29-87092191; E-mail: huzhaonong@nwsuaf.edu.cn, wuwenjun@nwsuaf.edu.cn

作者简介:辛红梅(1986-),女,陕西人,硕士研究生,主要从事天然产物农药研究。E-mail: xinhongmei123abc@163.com

收稿日期:2011-12-08; 修回日期:2012-02-20

定,大多数为链霉菌及其代谢产物。为了提高筛选新活性菌株的效率及减少大量盲目性的工作,本实验从分子鉴定着手,逆向筛选非链霉菌,然后发酵,希望发现新的活性物质。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:山东半岛工业、农业比较发达,所以大片土地被化学用品和农业用品污染。本实验室采集山东半岛不同地区的化工厂、化肥厂和农药厂排污口水口的土壤,用稀释平板法^[12]分离得到154株放线菌。

1.1.2 试剂和仪器:细菌基因组DNA提取试剂盒、溶菌酶、蛋白酶K购自天根生化科技有限公司,Taq酶、dNTPs等购自西安沃尔森生物技术有限公司,Marker、pMD18-T载体购自宝生物工程有限公司,凝胶回收试剂盒购自安徽优晶生物工程有限公司,其余试剂为国产分析纯试剂。电泳仪和PCR仪购自Bio-RAD公司。

1.1.3 通用引物:采用16S rDNA通用引物^[13]:上游引物F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物R:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。引物合成与测序均由上海桑尼生物科技有限公司完成。

1.1.4 培养基^[13-14]:(1)黄豆粉10g,甘露醇10g,水1L,pH7.0-7.5;(2)可溶性淀粉20g,脱脂大豆粉10g,硫代硫酸钠3.3g,FeSO₄·7H₂O 0.5g,K₂HPO₄0.5g,KCl 0.3g,水1L,pH6.5;(3)葡萄糖20g,蛋白胨5g,酵母粉1g,牛肉膏3.8g,NaCl 1.9g,CaCO₃0.47g,水1L,pH7.0;(4)大豆粉30g,葡萄糖20g,淀粉5g,酵母膏2g,NaCl 4g,K₂HPO₄0.5g,MgSO₄·7H₂O 0.5g,CaCO₃2g,水1L,pH7.8;(5)小米10g,葡萄糖10g,蛋白胨3g,NaCl 2.5g,CaCO₃1g,(NH₄)₂SO₄1g,pH7.0

1.2 放线菌总DNA的提取

将培养好的平板菌接种于液体淀粉酪素培养基^[14]中,28℃,180 r/min振荡培养2天,离心,收集菌丝体。接下来按天根基因组DNA提取试剂盒的操作步骤进行,将提取的基因组DNA用TE Buffer适度稀释,取5 μL于1%琼脂糖凝胶电泳40 min(电压为100 V)^[13],用凝胶成像系统检测并照相,观察结果。

1.3 16S rDNA分子鉴定

将所有菌株用F和R引物扩增,扩增体系和反应程序参照文献^[13],扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,电压为100 V。将PCR产物送至上海桑尼生物科技有限公司测序,将测序结果通过NCBI数据库进行相似性搜索,调出相似性大于96%且有效发表的典型菌株的序列,用clustalx进行序列比对,用MEGA5.0的Neighbor-Joining法构建系统进化树,确定放线菌的分类地位^[15-16],定义菌的16S rDNA序列相似性低于98%作为不同的分类操作单元(OTU,Operational taxonomic unit),序列的相似性大于或等于98%,则归于同一个OTU标准计^[17]。

1.4 抗菌活性测定

对10株稀有放线菌分别用5种液体培养基,28℃摇瓶发酵5天,采用管碟法^[14]测定发酵液对5种细菌的活性,供试细菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 1.89)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, 1.88)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, 1.1846)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, 1.1636)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, 1.2031),购自中国科学院普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。

采用菌丝生长速率法^[14]测定对5种植物病原真菌的活性。供试菌株为番茄灰霉病原菌(*Botrytis cinerea*)、西瓜枯萎病原菌(*Fusarium oxysporum f. sp. niveum*)、小麦赤霉病原菌(*Gibberella zeae*)、油菜菌核病原菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)和苹果炭疽病原菌(*Colletotrichum gloeosporioides*),由西北农林科技大学植物病理研究室提供。

2 结果和分析

2.1 可培养放线菌的多样性

对154株放线菌纯培养物进行16S rDNA分析,以序列相似性大于或者等于98%划分一个OTU的标准进行分析,共生成46个OTU,主要包括放线菌目下的5个亚目,7个科,8个属,其中链霉菌属(*Streptomyces*)134个菌株、考克氏菌属(*Kocuria*)1个菌株、微杆菌属(*Microbacterium*)1个菌株、拟诺卡氏菌属(*Nocardopsis*)4个菌株、诺尔氏菌属(*Knoellia*)1个菌株、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)1个菌株、小单孢菌属(*Micromonospora*)1个菌株、游

动放线菌属 (*Actinoplanes*) 12 个菌株, 其中, 以链霉菌数量最多, 占有测序株的 87.01% (表 1)。结果表明在农药污染点源环境中, 链霉菌为可培养放

线菌优势种群, 其他可培养的菌株数量相对较少。但是与本实验室之前从常规土壤的可培养放线菌比较, 此次从污染点源环境中分离得到的可培养非链

表 1 46 OTUs 所代表的菌株

Table 1 List of isolates representing the 46 OTUs

Phylogenetic group (154 strains)		Representative isolate (Accession no.)	No. of strains in OTU	Nearest type strain (Accession no.)	Sequence identity / %
Suborder	Family				
	<i>Microbacteriaceae</i>	58 (JN853773)	1	<i>Microbacterium oxydans</i> (Y17227)	99
<i>Micrococccineae</i>	<i>Micrococcaceae</i>	40 (JN192402)	1	<i>Kocuria rosea</i> (X87756)	99
	<i>Intrasporangiaceae</i>	205 (JN247544)	1	<i>Knoellia sinensis</i> (AJ294412)	98
<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	301 (JN247547)	1	<i>Micromonospora chokoriensis</i> (AB241454)	100
		560 (JN247549)	12	<i>Actinoplanes brasiliensis</i> (X93185)	99
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	225 (JN247545)	1	<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i> (EF114314)	99
		147 (JN247542)	1	<i>Nocardiopsis umidischolae</i> (AY036001)	100
<i>Streptosporangineae</i>	<i>Nocardiopsaceae</i>	198 (JN247543)	1	<i>Nocardiopsis valliformis</i> (AY336503)	99
		300 (JN247546)	1	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i> (Y13593)	99
		553 (JN247548)	1	<i>Nocardiopsis dassonvillei subsp. albirubida</i> (X97882)	99
		23B (JN936845)	8	<i>Streptomyces albidoflavus</i> (AB184255)	100
		72 (JN968979)	7	<i>Streptomyces alboflavus</i> (EF178699)	99
		100 (JN968985)	1	<i>Streptomyces albogriseolus</i> (AY177662)	100
		79 (JN968981)	2	<i>Streptomyces atroolivaceus</i> (AJ781320)	100
		230 (JN968999)	2	<i>Streptomyces althioticus</i> (AY999791)	98
		237 (JN969002)	1	<i>Streptomyces anulatus</i> (DQ026637)	100
		377 (JN969031)	1	<i>Streptomyces antibioticus</i> (AB184184)	99
		144 (JN968991)	4	<i>Streptomyces bacillaris NBRC</i> (AB184439)	100
		282 (JN969013)	2	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> (AB184650)	100
		332 (JN969023)	2	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i> (AB184849)	100
		338 (JN969025)	1	<i>Streptomyces collinus</i> (AB184123)	99
		501 (JN969035)	2	<i>Streptomyces cellulosa</i> (AB184265)	99
		35 (JN936847)	3	<i>Streptomyces djakartensis</i> (AB184657)	99
		51 (JN936849)	1	<i>Streptomyces deccanensis</i> (EF219459)	99
		549 (JN969041)	1	<i>Streptomyces ederensis</i> (AB184658)	99
		568 (JN969042)	1	<i>Streptomyces eurocidicus</i> (AY999790)	99
		61 (JN968977)	3	<i>Streptomyces flavotricini</i> (AB184132)	99
<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	181 (JN968994)	1	<i>Streptomyces griseorubens</i> (AB184139)	99
		134 (JN968989)	2	<i>Streptomyces misionensis</i> (AB184285)	99
		6 (JN936840)	5	<i>Streptomyces marokkonensis</i> (AJ965470)	99
		339 (JN969026)	1	<i>Streptomyces novaecaesareae</i> (AB184357)	99
		307 (JN969018)	1	<i>Streptomyces olivaceus</i> (AB249920)	99
		264 (JN969006)	2	<i>Streptomyces polychromogenes</i> (AB184292)	99
		10 (JN936841)	7	<i>Streptomyces pactum</i> (AB184398)	99
		12 (JN936842)	19	<i>Streptomyces pilosus</i> (AB184161)	100
		23A (JN936844)	1	<i>Streptomyces parvulus</i> (AB184326)	98
		57 (JN968976)	3	<i>Streptomyces plicatus</i> (AB184291)	100
		83 (JN968982)	9	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> (AB184240)	99
		299 (JN969017)	1	<i>Streptomyces tauricus</i> (AB045879)	100
		510 (JN969037)	8	<i>Streptomyces thermolineatus</i> (Z68097)	99
		1 (JN936839)	1	<i>Streptomyces violaceorubidus</i> (AJ781374)	99
		17 (JN936843)	8	<i>Streptomyces variabilis</i> (AB184884)	100
		34 (JN936846)	7	<i>Streptomyces violaceoruber</i> (AB184174)	99
		108 (JN968987)	5	<i>Streptomyces viridodiataticus</i> (AB184317)	99
		135 (JN968990)	9	<i>Streptomyces xinghaiensis</i> (EF577247)	99
		543 (JN969040)	1	<i>Streptomyces xantholiticus</i> (AB184349)	99

霉菌属放线菌的比率明显提高。尤其是菌株 205 的 16SrDNA 序列与 *Knoellia* 属模式菌株 *Knoellia sinensis* (AJ294412) 的同源性仅为 98.3%, 与 *Knoellia subterranean* (AJ294413) 同源性为 98.1%, 与 *Knoellia aerolata* (EF553529) 同源性为 97.6%。

当前诺尔氏菌属 (*Knoellia*) 有效发表的诺尔氏菌属有效种只有 3 个, *Knoellia sinensis*, *Knoellia subterranean*^[18] 和 *Knoellia aerolata*^[19]。根据 205 菌株的 16S rDNA 序列构建系统发育树 (图 1), 它与已知菌形成独立分支, 所以目前初步推断其可能是新种。

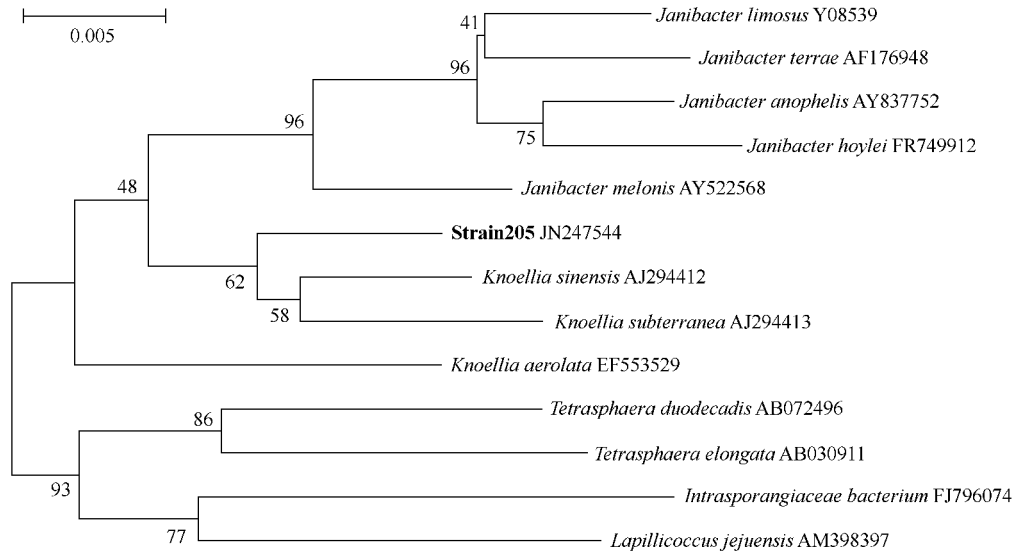


图 1 根据 16SrDNA 序列构建的系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences.

2.2 10 株非链霉菌的抑菌活性结果

经过比较, 这 10 株菌总体上用小米即 (5) 号液体培养基发酵活性较好, 部分菌株用其他培养基发酵活性较好, 所以统一采用小米液体培养基评价其抑菌活性。采用小米液体培养基, 对 10 株非链霉菌 (40, 58, 147, 198, 205, 225, 300, 301, 553, 560) 28℃ 培养 5 天, 过滤得发酵液, 采用管碟法对 5 种细菌进行测定, 结果见表 2。由表 2 可知, 菌株 40 和 58 发酵液对供试的三种 G^+ 细菌和两种 G^- 细菌都表现明显抑制作用。菌株 198 和 301 发酵液对 G^+ 细菌有明显活性, 对 G^- 细菌没有活性。另外 6 株菌发酵液仅对部分 G^+ 细菌表现活性, 对两种 G^- 细菌均无作用。

采用菌丝生长速率抑制法, 10 株非链霉菌发酵液对 5 种植物病原真菌测定结果见表 3。从表中可知, 菌株 40 和 58 发酵液对 5 种供试病原真菌具有很好的抑制作用, 抑制率均达到 96% 以上; 其它菌株发酵液对供试病原真菌仅表现弱的或者无活性。以上活性结果表明非链霉菌菌株 40 和 58 可能产生具有农用活性的次级代谢产物, 具有进一步研究的价值。

表 2 10 株非链霉菌小米发酵液对细菌的活性

Table 2 The inhibitory actives of the fermentation broths of ten non-*Streptomyces* strains against five bacteria

Strains	The diameter of inhibitory area (mm)				
	SA	BS	BC	EC	PA
40	+++	+++	+++	+++	++
58	+++	+++	+++	+++	++
147	-	++	-	-	-
198	++	++	++	-	-
205	-	++	++	-	-
225	-	+	+	-	-
300	-	++	++	-	-
301	++	++	++	-	-
553	-	++	-	-	-
560	-	+	-	-	-

Notes: SA is represented for *Staphylococcus aureus*, BS is represented for *Bacillus subtilis*, BC is represented for *Bacillus cereus*, EC is represented for *Escherichia coli*, PA is represented for *Pseudomonas aeruginosa*. "+++" means excellent activity (20–30 mm), "++" means good activity (10–20 mm), "+" means weak activity (5–10 mm), "-" means No activity.

3 讨论

与无农药污染土壤中微生物种群相比, 农药污染点源的土壤微生物群落会发生明显的变化。姚健

表 3 10 株非链霉菌发酵液对 5 种植物病原真菌的抑制活性

Table 3 The inhibitory actives of the fermentation broths of ten non-*Streptomyces* strains against five phytopathogenic fungi

Strains	The inhibitory ratio/%				
	BC	FO	GZ	SS	CG
40	100.00	97.90	100.00	100.00	98.76
58	100.00	96.94	99.91	99.86	97.43
147	4.44	7.31	28.17	1.54	15.00
198	-	6.67	-	-	-
205	-	-	-	23.07	14.29
225	-	6.06	14.29	3.08	-
300	6.67	-	-	3.07	-
301	68.00	29.27	66.20	7.69	12.50
553	2.86	6.06	-	7.69	-
560	11.11	-	-	4.61	-

Notes: All values are means of three replicates. “-” represents no activity; BC is represented for *Botrytis cinerea*, FO is represented for *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*, GZ is represented for *Gibberella zeae*, SS is represented for *Sclerotinia sclerotiorum*, CG is represented for *Colletotrichum gloesporioides*.

等报道,虽然农药污染源的土壤微生物数量减少,但是农药污染很可能引起土壤微生物 DNA 序列本身发生变化;而化肥污染很可能引起某些土壤微生物的富集和一些微生物物种的丧失^[9]。王洪霞等人(2006)研究表明,当双氰胺与土壤质量比大于 1/1000 时,双氰胺能够抑制放线菌的生长^[20]。而当前农药污染环境土壤中土壤放线菌的研究大多集中于面源土壤微生物响应^[21-22]或从污染土壤中筛选降解菌^[23-24]。关于把农药污染点源作为新型抗生素产生菌菌源的报道尚未发现,于是 2007 年本实验室以农药污染点源土壤作为分离对象,并发现了大量具有抑菌活性的可培养放线菌。本文利用 16SrDNA 手段,探明来源于山东半岛农药污染点源土壤可培养放线菌主要属于 7 个科 8 个属,显示了山东半岛农药污染点源土壤可培养放线菌具有一定丰富的多样性,可以作为筛选新型抗生素产生菌的来源之一。

应用分子鉴定确定菌株是否为链霉菌,然后选择性的测定活性,减少了时间和资源,大大提高了筛选新菌株和新物质的效率。实验对 10 株非链霉菌发酵液活性进行初步评价,菌株 58 和 40 的发酵液对供试病原真菌和细菌都有明显的抑制作用。菌株 58 和菌株 40 分别与 *Microbacterium oxydans* (Y17227) 和 *Kocuria rosea* (X87756) 同源性均高于 99% 以上。关于 *Microbacterium* 有报道可以积累一些特殊的糖脂,用作生物表面活性剂^[25];有的可以分泌一些胞外多糖,在植物根际起保湿功能^[26],而

更多报道是菌可以积累一些有用的酶系,用于天然产物的生物转化、环境污染降解^[27-28],甚至用作农作物生长促进剂^[29]等多个方面;*Kocuria* 属菌是一类适应能力极强的微生物,可以从哺乳动物表皮、土壤、根际、发酵食品、临床标本、淡水及海洋沉积物等多种自然环境中分离得到。在该属菌中,*K. marina* 具有极强的耐盐性能^[30-31],*K. aegyptia* 拥有非常特殊的生理机制和遗传基因^[32],*K. varians* 能产生抗菌活性很高的肽类抗生素——羊毛硫抗生素^[33],还有 *Kocuria rosea* 有耐辐射活性^[34]。但是尚未有从这两个属分离到农用抗生素的报道。农用抗生素是微生物产生的代谢物质,此类物质在低微浓度时即可抑制或杀灭作物的病、虫、草害或调节作物生长发育。而最终能够开发应用的是高效、安全、稳定性好的菌株,其抑菌特点也可分为特异性和广谱性^[35]。因此菌株 40 和 58 将从其代谢物稳定性、广谱性的要求出发,进行进一步研究。

此外,本研究结果表明菌株 205 发酵液具有初步的抑制细菌的活性,但是当前该属 3 个有效发表种均未有关于抑菌活性的报道;结合 16SrDNA 分析结果初步判断菌株 205 为诺尔氏菌属(*Knoellia*)一潜在新种可能性极大,尚待完成多相分类鉴定。因此,农药污染点源可以作为筛选新型抗生素产生菌的来源之一。

参考文献

- [1] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites, a personal review. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1-26.
- [2] 焦瑞身. 新世纪微生物学者的一项重要任务—未培养微生物的分离培养. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2004, 20: 641-645.
- [3] Zengler K, Toledo G, Rappé M, Elkins J, Eric J. Mathur, Jay M. Short, and Keller M. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(24): 15681-15686.
- [4] 黄路枝, 胡兆农, 郭正彦, 吴文君. 土壤稀有放线菌的选择性分离及其抗菌活性研究. *农药学报 (Chinese Journal of Pesticide Science)*: 2007, 9(1): 59-65.
- [5] 程元荣, 郑卫. 小单孢菌及其产生的次级生物活性代谢产物. *中国抗生素杂志 (Chinese Journal of Antibiotics)*, 2006, 31(6): 320-327.
- [6] 江红, 林如. 海洋小单孢菌来源的轻快菌素 BFW523-3 的体外抗肿瘤活性. *中国抗生素杂志 (Chinese Journal of Antibiotics)*, 2008, 33(9): 533-560.

- [7] Bull AT, Stach JEM. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(11): 491-499.
- [8] 石兆勇, 王发园. 农药污染对微生物多样性的影响. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2007, 35(19): 5840-5841.
- [9] 姚健, 杨永华, 沈晓蓉, 陆维忠. 农用化学品污染对土壤微生物群落 DNA 序列多样性影响研究. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*) 2000, 20(6): 1021-1027.
- [10] Haifeng Hu and Kozo Ochi. Novel approach for improving the productivity of antibiotic producing strains by inducing combined resistant mutations. *Applied Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1885-1892.
- [11] Lior Pachter. Interpreting the unculturable majority. *Nature Methods* 2007, 4: 479-480.
- [12] 黄秀梨. 微生物学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2000: 62-64.
- [13] 郭正彦. *Streptomyces alboflavus* 313 发酵液中抑菌成分的研究. 西北农林科技大学博士学位论文. 2009.
- [14] 邓晶. 化学污染地区产抗生素的稀有放线菌分离筛选. 西北农林科技大学硕士学位论文. 2010.
- [15] 徐丽华, 李文均, 刘志恒. 放线菌系统学. 北京: 科学出版社, 2007.
- [16] 曹艳茹, 姜怡, 陈义光, 唐蜀昆, 秦盛, 赵国振, 徐丽华. 武陵山放线菌多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(7): 952-958.
- [17] Stach JEM, Maldonado LA, Masson DG, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 6189-6200.
- [18] Groth I, Schumann P, Schütze B, Augsten K, Stackebrandt E. *Knoellia sinensis* gen. nov., sp. nov. and *Knoellia subterranea* sp. nov., two novel actinobacteria isolated from a cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52: 77-84.
- [19] Hang-Yeon Weon, Byung-Yong Kim, Peter Schumann, Reiner M. Kroppenstedt, Hyung-Jun Noh, Chan-Won Park and Soon-Wo Kwon. *Knoellia aerolata* sp. nov., isolated from an air sample in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 2861-2864.
- [20] 王洪霞, 孙庆元. 双氰胺对土壤微生物种群数量的影响. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2006, 34(1): 113-114.
- [21] 杜慧玲, 郭平毅. 尿素和高效唑对苯磺隆胁迫土壤微生物数量的影响. 山西农业科学 (*Journal of Shanxi Agricultural Sciences*), 2009, 37(6): 45-49.
- [22] 钟文辉, 蔡祖聪, 尹力初, 张鹤. 用 PCR-DGGE 研究长期施用无机肥对种稻红壤微生物群落多样性的影响. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2007, 27(10): 4011-4018.
- [23] 张宝良, 王宝辉, 田禹, 马放, 李凤梅. 油污土壤生物修复高效菌筛选鉴定. 哈尔滨工业大学学报 (*Journal of Harbin Institute of Technology*), 2006, 38(12): 2180-2184.
- [24] Lara D. Sette, Valéria M. de Oliveira, Gilson P. Manfio. Isolation and characterization ofalachlor-degrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, 87: 81-89.
- [25] Palme O, Moszyk A, Iphöfer D, Lang S. Selected microbial glycolipids: production, modification and characterization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010, 672: 185-202.
- [26] Godinho AL, Bhosle S. Sand aggregation by exopolysaccharide-producing *Microbacterium arborescens*-AGSB. *Current Microbiology*, 2009, 58(6): 616-621.
- [27] Yu C, Xu H, Huang G, Chen T, Liu G, Chai N, Ji Y, Wang S, Dai Y, Yuan S. Permeabilization of *Microbacterium oxylans* shifts the conversion of puerarin from puerarin-7-O-glucoside to puerarin-7-O-fructoside. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(3): 863-870.
- [28] 王春明, 李大平, 王春莲. 微杆菌 3-28 对萘、菲、葱、芘的降解. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*), 2009, 15(3): 361-366.
- [29] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Lee JS, Lee KC, Saravanan VS, Santhanakrishnan P. *Microbacterium azadirachtae* sp. nov., a plant-growth-promoting actinobacterium isolated from the rhizosphere of neem seedlings. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60: 1687-1692.
- [30] Kim SB, Nedashkovskaya OI, Mikhailov VV, Han SK, Kim KO, Rhee MS, Bae KS. *Kocuria marina* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(5): 1617-1620.
- [31] Kovács G, Burghardt J, Pradella S, Schumann P, Stackebrandt E, Mürliageti K. *Kocuria palustris* sp.

- nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(1): 167-173.
- [32] Li WJ, Zhang YQ, Schumann P, Chen HH, Hozzein WN, Tian XP, Xu LH, Jiang CL. *Kocuria aegyptia* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a saline, alkaline desert soil in Egypt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(4): 733-737.
- [33] T. O'Mahony, N. Rekhif, C. Cavadini and G. F. Fitzgerald. The application of a fermented food ingredient containing variacin, a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. *Journal of Applied microbiology*, 2001, 90(1): 106-114.
- [34] 唐然,袁梦龙,吴菁,陈明,张维,林敏. 一株耐辐射考克氏菌的分离与鉴定. 核农学报 (*Journal of Nuclear Agricultural Sciences*) 2010 24(2): 276-280.
- [35] 张化霜. 微生物农药研究进展. 农药科学与管理 (*Pesticide Science and Administration*). 2011, 32(11): 22-25.

Diversity and antimicrobial activities of actinomycetes from pesticide-contaminated spots in Shandong Peninsula

Hongmei Xin¹, Zhengyan Guo², Lixia Fan¹, Zhaonong Hu^{1*}, Wenjun Wu^{1*}

¹Institute of Pesticide Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

²Institute of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: [Objective] In order to study diversity and find antimicrobial activities of actinomycetes from pesticide-contaminated spots in Shandong Peninsula. [Methods] The phylogenetic analysis of 154 isolated strains was done based on 16SrDNA sequences. Antimicrobial activities of 10 non-Streptomyces strains were tested by using cylinder-plate method and hypha growth rate method. [Results] Among the strains, 154 strains belonged to 7 families, 8 genera: *Streptomyces* (87.01%), *Kocuria*, *Microbacterium*, *Nocardiopsis*, *Knoellia*, *Pseudonocardia*, *Micromonospora*, *Actinoplanes*. The fermentation broths of 10 non-Streptomyces strains had inhibitory activities against all tested phytopathogenic fungi (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *Gibberella zeae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum gloeosporioides*) and bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), especially *Microbacterium oxydans* JN853773 and *Kocuria rosea* JN192402 had strong inhibitory effects. [Conclusion] Abundant diversity of actinomycetes existed in pesticide contaminated spots in Shandong Peninsula. *Microbacterium oxydans* JN853773 and *Kocuria rosea* JN192402 showed high antimicrobial activities and could be further exploited.

Keywords: pesticide-contaminated spots, diversity, non-Streptomyces, antimicrobial activity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973Program) (2010CB126105), by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (200903052), by the National Natural Science Foundation of China (30870344, 31171868) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (QN2011058)

* Corresponding authors. Tel/Fax: +86-29-87092191; E-mail: huzhaonong@nwsuaf.edu.cn, wuwenjun@nwsuaf.edu.cn

Received: 8 December 2011/Revised: 20 February 2012