

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(8):825–831; 4 August 2013
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

海洋细菌 *Pseudomonas putida* 中具有抗硅藻附着的活性成分

朱建生¹, 姜薇^{1,2*}, 缪莉¹, 靳翠丽¹, 包卫洋¹

¹扬州大学海洋科学与技术研究所, 扬州 225127

²中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广州 510301

摘要:【目的】为发现天然的防污损物质, 从分离自海绵 *Haliclona* sp. 的细菌 *Pseudomonas putida* 中寻找具有抗硅藻附着活性的化合物。【方法】综合菌落生长形态、扫描电镜及 16S rDNA 序列分析, 鉴定细菌种属; 采用活性(抗硅藻附着)-化学(薄层色谱、二极管阵列高效液相和核磁共振氢谱)导向法对其中的活性组分进行分离纯化, 波谱分析确定结构; 采用抗硅藻附着活性模型对单体化合物进行活性复筛。【结果】该细菌鉴定为 *Pseudomonas putida*; 从其发酵液中分离得到 6 个环二肽, 分别鉴定为环(亮氨酸-脯氨酸)(1)、环(亮氨酸-丙氨酸)(2)、环(苯丙氨酸-丙氨酸)(3)、环(缬氨酸-酪氨酸)(4)、环(丙氨酸-酪氨酸)(5)、环(丙氨酸-色氨酸)(6); 化合物 3 和 6 在浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时具有明显的抑制硅藻附着活性(抑制率分别为 50% 和 85%)。【结论】海洋细菌 *Pseudomonas putida* 中具有抗硅藻附着的活性化合物为环(苯丙氨酸-丙氨酸)和环(丙氨酸-色氨酸)。

关键词: 抗硅藻附着, *Pseudomonas putida*, 环二肽, 海洋细菌

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)08-0825-07

海洋硅藻是海洋生物污损早期构成生物膜的主要生物物种, 生物膜成形后更易于各种大型污损生物在其表面附着生长, 最终形成庞杂的污损生物群^[1]。这给国家海洋资源的综合开发利用及军事部署造成巨大的经济损失。随着全球海洋资源开发进程的加快, 海洋生物污损防治已然成为一个研究的热点。寻找高效低毒的海洋抗污损物质既是所有相关研究的物质起点也是最终目标。海洋微生物代谢产物结构新颖、活性多样、显著已成为筛选各类先导化合物的重要宝库。此外海洋微生物可通过菌种选育、代谢调控、规模发酵及现代生物工程等手段大幅提高目标代谢产物产量, 解决了活性物质开发的

资源问题。

本课题组对钱培源教授提供的分离自 8 种海绵的 190 株海洋细菌进行了抗硅藻附着活性筛选, 细菌 272 具有显著抑制硅藻附着活性。本文对该菌株的种属鉴定、化合物提取分离鉴定及单体化合物活性复筛工作进行报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂: 核磁共振谱用 Bruker AV-600 型核磁共振仪测定 (DMSO-d₆ 做溶剂); 比旋光

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2012267); 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室开放基金 (LMB121005); 国家自然科学基金 (41106113, 41006097)

* 通信作者。Tel: +86-514-89795882; E-mail: weijiang@yzu.edu.cn

作者简介: 朱建生 (1987–), 男, 江苏淮安人, 硕士研究生, 研究方向为海洋微生物学。E-mail: jshzjs@126.com

收稿日期: 2013-01-21; **修回日期:** 2013-04-18

用SGW-3型自动旋光仪测定;分析型液相色谱仪为HITACHI L-2000 配 L-2455 DAD 检测器,色谱柱为Apollo RP-18 (5 μm, 4.6 mm×250 mm);半制备高效液相色谱仪为LabTech LC600 配UV600 紫外检测器,色谱柱用Kromasil RP-18 (10 mm×250 mm);色谱用硅胶(200 – 300 目)和 ODS (50 μm) 分别购于阿拉丁和 YMC 公司。

1.1.2 菌株来源:细菌 272 由香港科技大学海岸海洋实验室钱培元教授课题组提供,该细菌分离自海绵 *Haliclona* sp. (采集自美国华盛顿州圣璜岛海域 48.55°N, 123.01°W)。

1.1.3 藻种来源:硅藻为新月菱形藻 (*Nitzschiaoclosterium*),由中国海洋大学水产学院藻种室提供。

1.2 菌株培养

从平板上挑取适量单菌落接种到含有10 mL MB 液体培养基(蛋白胨5 g/L,酵母膏提取物3 g/L,柠檬酸铁0.1 g/L, NaCl 19.45 g/L, MgCl₂ 5.9 g/L, MgSO₄ 3.24 g/L, CaCl₂ 1.8 g/L, KCl 0.55 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.4 – 7.6)的试管中,30℃、150 r/min 振荡培养1.5 d。然后从试管中吸取5 mL菌液接种到装有100 mL培养基的锥形瓶中,30℃、150 r/min 振荡培养1.5 d。再将50 mL菌液接种至1000 mL培养基的锥形瓶中,30℃、150 r/min 振荡培养5 d。活性粗筛时小样发酵1 L,放大规模发酵100 L。

1.3 菌株鉴定

在 MB 固体培养基上,菌落呈白色、圆形、高凸、易挑起、表面光滑湿润、边缘整齐(图 1)。扫描电镜具体操作参照文献^[2],在扫描电镜下观察该菌体形态为杆状,单个菌体长度约为2 μm(图 2)。测定了菌1394 bp的 16S rDNA 序列(上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序分析),序列提交 NCBI 数据库,注册号为 KC859031,再进行 BLAST 数据库同源比对,应用 MEGA 5 软件,分析并构建系统进化树(图 3),并进行了 1000 次 bootstraps 检验,发现菌株 272 与 *Pseudomonas putida* 的相似性达 100%。综合以上实验结果,鉴定菌株 272 为 *Pseudomonas putida*。

1.4 抗硅藻附着活性测试

1.4.1 硅藻培养:温度 20℃,光暗比 12:12, f/2 培养液培养至对数增长期,用软刷刷取附着在瓶底的



图 1. 菌株 272 的菌落特征图
Figure 1. Colonial morphology of strain 272.

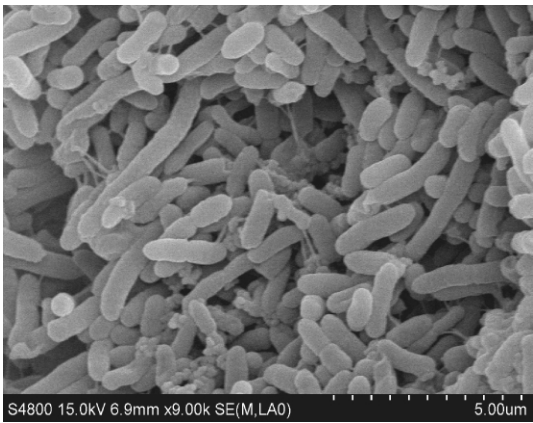


图 2. 菌株 272 的扫描电镜图(9000 ×)
Figure 2. The SEM picture of strain 272 (9000 ×), bar 5.00 μm.

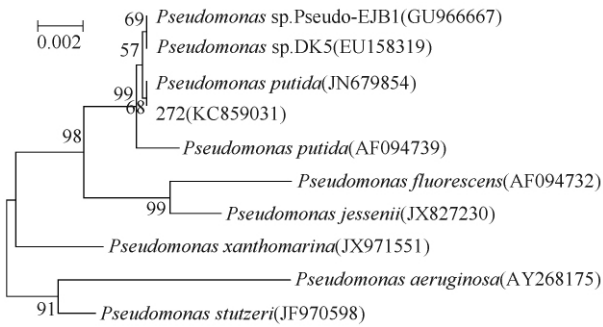


图 3. 菌株 272 的系统发育树状图
Figure 3. Phylogenetic tree based on 16S rDNA similarity of strain 272 and reference strains. Numbers in parenthesis represent GenBank accession numbers; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1000 replications data sets. Bar 0.002 at the bottom is the sequence divergence.

硅藻,离心,加入人工海水,制成硅藻悬浮液,调整密度至每毫升 1 – 1.5 × 10⁵ 细胞待用。

1.4.2 活性测试:在 24 孔板中,加入 0.5 mL 硅藻液和 0.5 mL 待测样品溶液(以人工海水配制,含 DMSO $\leq 2\%$, V/V),温度 20℃,光暗比 12:12,培养 24 h,用人工海水润洗测试孔 5 次以除去未附着的硅藻,倒置显微镜观察计数,计算硅藻附着率^[3]。对照以不含粗提物的 DMSO 代替母液,其它操作同上。每组试验重复 4 次。样品粗提物和纯品测试浓度分别为 100 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。按以下公式(1)计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验组附着藻细胞数}}{\text{对照组附着藻细胞数}}\right) * 100\% \quad (1)$$

1.5 活性-化学导向分离

收集培养液 1 L,用含有 5% 丙酮的乙酸乙酯液萃取 2 次,收集乙酸乙酯,减压浓缩得粗提物 50 mg。运用上述活性测试方法,筛选出细菌 *Pseudomonas putida* 粗提物在浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 有显著的抑制硅藻附着活性(抑制率为 90%)。对该菌株进行规模化发酵,发酵液过滤,收集培养液 100 L,浓缩至约 10 L,用含有 5% 丙酮的乙酸乙酯液萃取 2 次,收集乙酸乙酯,减压浓缩得总浸膏 5.7 g。浸膏经硅胶减压柱色谱,以二氯甲烷/甲醇 70:1 - 1:1 梯度洗脱,得到 5 个组分,对每个组分进行抗硅藻附着活性测

试,其中二氯甲烷:甲醇 = 10:1 洗脱下来的 Fr. C (2.5 g) 在浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 时表现出最强抑制活性(抑制率为 93%)。Fr. C 经 ODS 减压柱色谱,以甲醇/水 5:95 - 100 梯度洗脱,得到 6 个组分,其中甲醇:水 = 30:70 洗脱下来的 Fr. C-2 (1.8 g) 呈强活性(抑制率为 96%)。综合运用 TLC、DAD-HPLC(色谱条件: MeOH/H₂O = 15% - 55%, 40 min, 1.0 mL/min)(图 4)结合 ¹H NMR(图 5)对 Fr. C-2 进行物质组成分析:①TLC(流动相为二氯甲烷:甲醇 = 8:1),薄层板上呈现出十多个碘显黄色的圆形斑点(R_f = 0.3 - 0.6);②Fr. C-2 经 DAD-HPLC 分析,由色谱图可看出当流动相为 MeOH/H₂O = 15% - 35% 时可洗脱下 Fr. C-2 中 90% 以上的组分,各色谱峰的紫外光谱图大致可分为 3 种,在微生物的次生代谢产物中在该极性段呈现此类紫外吸收的多为环二肽类物质;③从 ¹H NMR 推断 Fr. C-2 主要由不同结构的环二肽组成(见讨论)。综合以上 3 种方法基本判断出抑制硅藻附着的活性成分为环二肽类化合物。Fr. C-2 经半制备 HPLC 纯化,流动相甲醇:水 = 30:70 得到化合物 1 (3.8 mg)、2 (10 mg)、3 (5 mg),甲醇:水 = 15:85 得化合物 4 (6 mg)、5 (2 mg)、6 (12 mg)。

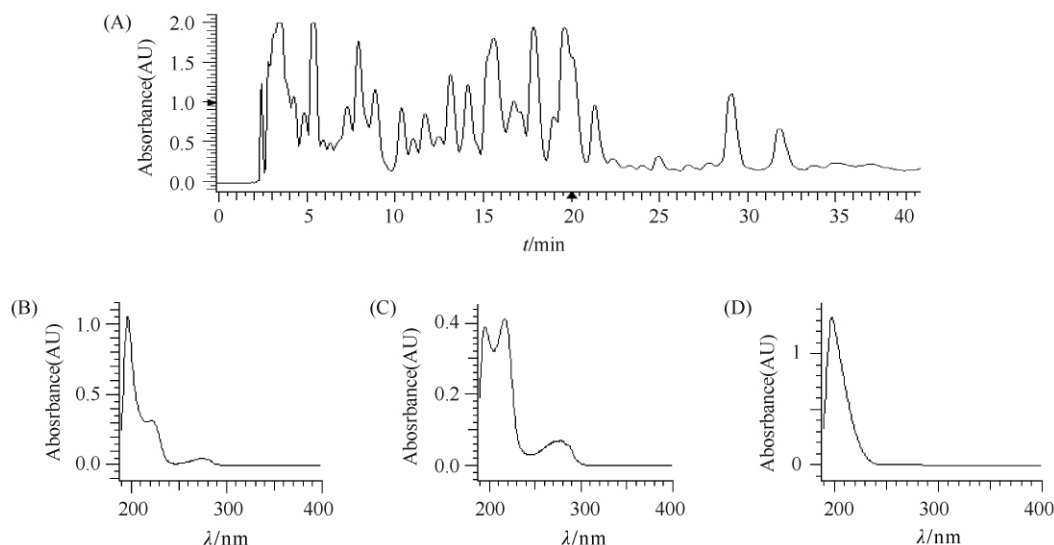


图 4. Fr. C-2 的 DAD-HPLC 色谱图及部分化合物紫外光谱图

Figure 4. DAD-HPLC of Fr. C-2. A: HPLC of Fr. C-2; B: UV of compound at Rt = 10.5'; C: UV of compound at Rt = 11.5'; D: UV of compound at Rt = 15.3'.

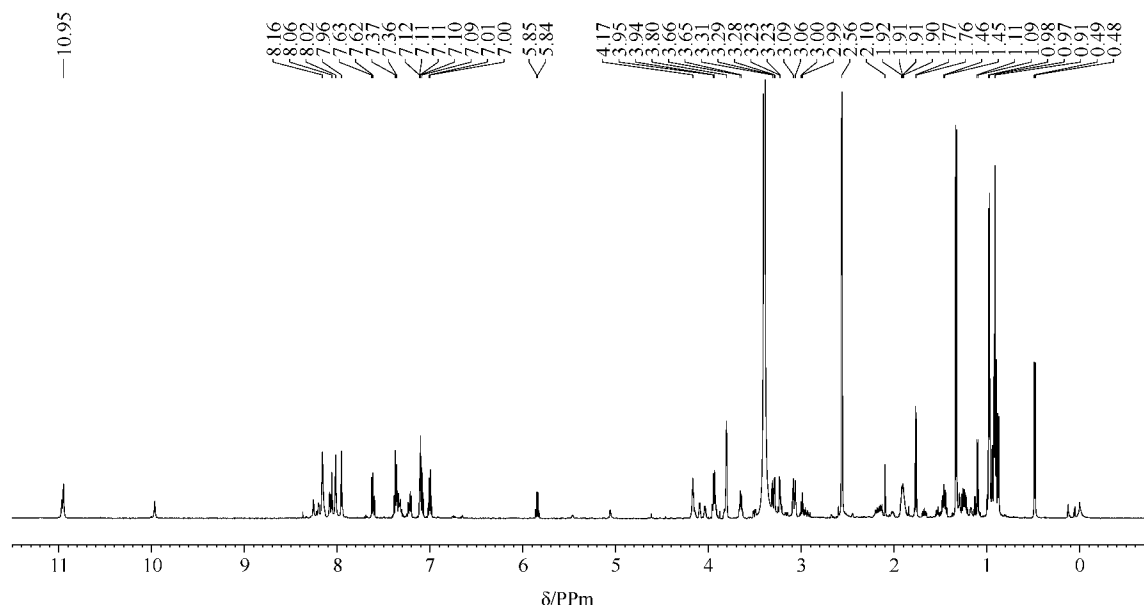


图 5. Fr. C-2 的核磁共振氢谱图

Figure 5. ^1H NMR of Fr. C-2.

1.6 单体化合物活性复筛

运用前面的抗硅藻附着活性测试方法对 6 个单体化合物进行活性复筛。

2 结果

2.1 化合物的结构鉴定

化合物 **1** 无色针晶; $[\alpha]_D^{25} - 91.6^\circ$ (c 0.5, MeOH); ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ_H 0.86 [3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-9/10], 0.87 [3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-9/10], 1.37 [1H, m, H-8], 1.70-1.90 [5H, m, H-7/11b/12], 2.14 [1H, m, H-11a], 3.40 [2H, m, H-13], 4.01 [1H, m, H-6], 4.20 [1H, m, H-3], 8.00 [1H, brs, NH-1]。参照文献[4]确定结构为环(亮氨酸-脯氨酸)[cyclo(Leu-Pro)]。

化合物 **2** 白色簇晶; $[\alpha]_D^{25} - 39.1^\circ$ (c 0.5, MeOH); ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ_H 0.86 [3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-10/11], 0.88 [3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-10/11], 1.28 [3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-7], 1.47 [1H, m, H-8a], 1.62 [1H, m, H-8b], 1.84 [1H, m, H-9], 3.76 [1H, m, H-3], 3.88 [1H, dd, $J = 7.0, 1.3$ Hz, H-6], 8.10 [1H, brs, NH-1], 8.12 [1H, brs, NH-4]。参照文献[5]确定

结构为环(亮氨酸-丙氨酸)[cyclo(Leu-Ala)]。

化合物 **3** 白色粉末; $[\alpha]_D^{25} - 22.7^\circ$ (c 0.5, MeOH); ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ_H 0.47 [3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-7], 2.87 [1H, dd, $J = 4.8, 13.4$ Hz, H-8a], 3.12 [1H, dd, $J = 3.4, 13.4$ Hz, H-8b], 3.63 [1H, dd, $J = 4.8, 3.4$ Hz, H-3], 4.19 [1H, q, $J = 7.0$ Hz, H-6], 7.16 [2H, m, H-10, 14], 7.24 [1H, m, H-12], 7.29 [2H, m, H-11, 13], 8.04 [1H, brs, NH-4], 8.14 [1H, brs, NH-1]。参照文献[5]确定结构为环(苯丙氨酸-丙氨酸)[cyclo(Phe-Ala)]。

化合物 **4** 白色粉末; $[\alpha]_D^{25} + 90.0^\circ$ (c 0.5, MeOH); ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ_H 0.35 [3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-8/9], 0.69 [3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-8/9], 1.75 [1H, m, H-7], 2.77 [1H, dd, $J = 4.8, 13.8$ Hz, H-10a], 3.03 [1H, dd, $J = 4.5, 13.8$ Hz, H-10b], 3.53 [1H, m, H-6], 4.12 [1H, dd, $J = 4.5, 4.8$ Hz, H-3], 6.63 [2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-13, 15], 6.96 [2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-12, 14], 7.89 [1H, brs, NH-1], 8.02 [1H, brs, NH-4], 9.20 [1H, brs, OH-14]。参照文献[5]确定结构为环(缬氨酸-酪氨酸)[cyclo(Val-Tyr)]。

化合物 **5** 无色针晶; $[\alpha]_D^{25} + 20.0^\circ$ (c 0.5,

MeOH); ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ_{H} 0.55 [3H, d, $J=7.0$ Hz, H-7], 2.76 [1H, dd, $J=5.0$, 13.7 Hz, H-8a], 3.02 [1H, dd, $J=3.4$, 13.7 Hz, H-8b], 3.62 [1H, q, $J=7.0$ Hz, H-6], 4.08 [1H, dd, $J=5.0$, 3.4 Hz, H-3], 6.66 [2H, d, $J=8.2$ Hz, H-11, 13], 6.94 [2H, d, $J=8.2$ Hz, H-10, 14], 7.99 [1H, brs, NH-1], 8.03 [1H, brs, NH-4]。参照文献[5]确定结构为环(丙氨酸-酪氨酸) [cyclo (Ala-Tyr)]。

化合物 **6** 白色粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 85.7^\circ$ (c 0.5, MeOH); ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ_{H} 0.40

[3H, d, $J=6.9$ Hz, H-7], 3.01 [1H, dd, $J=4.6$, 14.3 Hz, H-8a], 3.24 [1H, dd, $J=4.6$, 14.3 Hz, H-8b], 3.58 [1H, q, $J=6.9$ Hz, H-6], 4.11 [1H, dd, $J=4.6$, 4.6 Hz, H-3], 6.93 [1H, dd, $J=6.9$, 7.8 Hz, H-14], 7.02 [1H, dd, $J=6.9$, 7.8 Hz, H-15], 7.04 [1H, s, H-10], 7.30 [1H, d, $J=7.8$ Hz, H-13], 7.56 [1H, d, $J=7.8$ Hz, H-16], 7.91 [1H, brs, NH-1], 8.02 [1H, brs, NH-4], 10.89 [1H, brs, NH-11]。参照文献[6]确定结构为环(丙氨酸-色氨酸) [cyclo (Ala-Trp)]。

化合物 **1-6** 结构式见图 6。

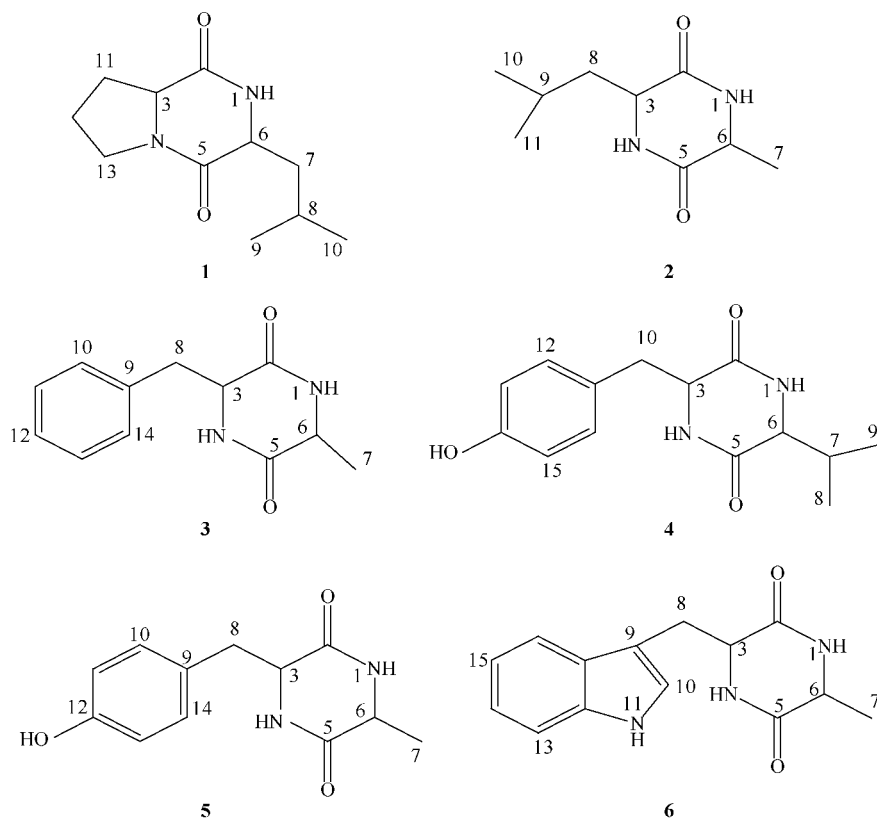


图 6. 化合物 **1-6** 结构式

Figure 6. Structures of compounds **1-6**.

2.2 抗硅藻附着活性

化合物 **3** 和 **6** 在浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时具有明显的抑制硅藻附着活性 (抑制率分别为 50% 和 85%)。

3 讨论

环二肽广泛存在于植物、动物和微生物,尤其在

微生物中多见,由于其具有多种显著的生物活性如:抗菌、抗肿瘤、抗病毒及镇咳等作用而备受关注^[7]。由于环二肽形成一个稳定的六元环结构,具有一定的构象约束,有两个氢键给体和两个氢键受体,氢键是药物与受体相互作用的主要方式之一,因而环二肽在药化中是一个重要的药效团^[8]。在本实验中我们发现环(苯丙氨酸-丙氨酸)和环(丙氨酸-色氨酸)具有显著的抑制硅藻附着活性,关于环二肽抑

制硅藻附着活性的研究报道只有一篇^[9],作者从一株海洋链霉菌中分离得到两个活性环二肽,平面结构同本文的化合物 **3** 和 **2**,该报道运用改良的 Marfey 法确定了组成环二肽的氨基酸都为 L 型,我们也尝试运用该方法确定活性物质的立体构型,并没有获得成功,这是本实验的一个遗憾之处,由于文献中没有给出化合物的比旋光也未交待核磁测试所用的氘代溶剂种类,因而不能判断本文中化合物 **3** 和 **2** 与文献中化合物的立体构型是否完全一致。本文中化合物 **2** 没有活性,推测可能是环二肽的两个手性中心的构型与文献中化合物不同,从而导致活性丧失。文献中环(L-苯丙氨酸-L-丙氨酸)的抑制硅藻活性是环(L-亮氨酸-L-丙氨酸)的 1.4 倍,这两个环二肽都含有 L 丙氨酸,所不同的是一个含有 L-苯丙氨酸另一个连接了 L-亮氨酸,因而作者推测活性功能团可能是苄基。在本实验中我们发现环(丙氨酸-色氨酸)也有活性,但远远不及环(苯丙氨酸-丙氨酸),这两个化合物中都含有丙氨酸,说明吡啶也是活性功能团,但活性弱于苄基。本实验室在对 190 株海洋细菌抗硅藻附着活性筛选时发现活性组分的极性大多集中在中低部位,本文中含有酪氨酸的环二肽都没有明显活性,这可能是酪氨酸的极性酚羟基的存在导致了活性的减弱。最新的研究表明环(L-脯氨酸-L-脯氨酸)是硅藻的性信息素^[10],本实验中在硅藻液中加入化合物 **3** 和 **6**,显示出显著抑藻附着活性,推测有可能是外源环二肽的加入抑制了内源性信息素环(L-脯氨酸-L-脯氨酸)的释放,通过抑制其生殖达到降低附着率的效果。

本实验中采用活性-化学导向分离的方法对一株分离自海绵的细菌开展了抗硅藻附着活性的天然产物研究。活性导向起到快速靶向定位的功效;化学导向则在活性定位后第一时间让研究者了解到组分的色谱和波谱特点,帮助推测可能的结构类型,选择合适的色谱方法和条件进行下一步的分离工作,并对一些不稳定结构有针对性地提前做好相应的保护工作。同样的方法可以运用到其它活性的天然产物研究中。

通过本研究确定了海洋细菌 *Pseudomonas putida* 中具有抗硅藻附着的活性化合物为环(苯丙氨酸-丙氨酸)和环(丙氨酸-色氨酸)。随着人们环保意识加强,从天然产物中发现高效低毒环境友好型的抗污损物质已经成为一个研究的热点。虽然

从动植物中也发现了一些活性抗污损物质,但是受到资源来源的限制,无法应用于工业生产。应用微生物这个生物大工厂规模化生成活性目标化合物是一个可行的渠道。本研究下一步将对该菌株的发酵条件进行进一步优化,提高活性代谢产物的产量。

参考文献

- [1] Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *Journal of Phycology*, 1993, 29 (5):537-566.
- [2] Xie J, Dong G, Liu Z. Method of preparation of microbiological specimen for scanning electron microscope. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2005, 24(4): 440. (in Chinese)
谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法. *电子显微学报*, 2005, 24(4): 440.
- [3] Fernando SA, Carlos R. Inhibition of attachment of some fouling diatoms and settlement of *Ulva lactuca* zoospores by film-forming bacterium and their extracellular products isolated from biofouled substrata in Northern Chile. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2008, 11(1):60-70.
- [4] Liu T, Li Z, Wang Y, Wang Y, Tian L, Pei Y, Hua H. Studies on the secondary metabolites from the marine bacteria *Bacillus subtilis*. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2009, 28(5): 1-6. (in Chinese)
刘涛, 李占林, 王宇, 王业宇, 田黎, 裴月湖, 华会明. 海洋细菌 *Bacillus subtilis* 次级代谢产物的研究. *中国海洋药物*, 2009, 28(5): 1-6.
- [5] Stark T, Hofmann T. Structures, sensory activity, and dose response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(18):7222-7231.
- [6] Ren H, Yu Y. Antitumor metabolites from marine sediment derived *Penicillium* sp. WF-06. *World Notes on Antibiotics*, 2011, 32(2): 86-90. (in Chinese)
任虹, 于洋. 海泥青素 *Penicillium* sp. WF-06 的抗肿瘤活性代谢产物. *国外医药抗生素分册*, 2011, 32(2): 86-90.
- [7] Sano S. Diketopiperazines having various functions. *Kagaku*, 2012, 67(2): 23-27.
- [8] Zhong F, Jiang X, Tian MQ, Bai W, Ma Y, Dang M. Research advances in bioactive cyclic dipeptides. *Journal of Hainan Normal University (Natural Science)*, 2006, 19(4): 352-357. (in Chinese)

- 钟飞, 蒋晓慧, 田敏卿, 白威, 马亚平, 党明珠. 生物活性环二肽研究进展. 海南师范学院学报(自然科学版), 2006, 19(4): 352-357.
- [9] Cho JY, Kang JY, Hong YK, Baek HH, Shin HW, Kim MS Isolation and structural determination of the antifouling diketopiperazines from marine-derived *Streptomyces praecox* 291-11. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2012, 76(6): 1116-1121.
- [10] Gillard J, Frenkel J, Devos V, Sabbe K, Paul C, Rempt M, Inze D, Pohnert G, Vuylsteke M, Vyverman W. Metabolomics enables the structure elucidation of a diatom sex pheromone. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(3): 854-857.

Anti-diatom compounds from marine bacterium *Pseudomonas putida*

Jiansheng Zhu¹, Wei Jiang^{1,2*}, Li Miao¹, Cuili Jin¹, Weiyang Bao¹

¹Marine Science & Technology Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China

²Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

Abstract: [**Objective**] In order to provide more natural antifouling compounds, marine bacterium *Pseudomonas putida* isolated from the sponge *Haliclona* sp. was explored to test its anti-diatom compounds. [**Methods**] The strain was identified by colonial morphology, scanning electron microscope (SEM) and 16S rDNA sequence analysis. The separation procedure was guided by bioactive (Anti-diatom) and chemical (TLC, DAD-HPLC and ¹H NMR) analysis, and their structures were elucidated by spectrographic techniques. The anti-diatom activity of all purified compounds was assayed. [**Results**] Strain 272 isolated from the sponge *Haliclona* sp. was identified as *Pseudomonas putida*. Six diketopiperazine compounds were isolated from the culture of this strain and their structures were determined as cyclo(Leu-Pro) (1), cyclo(Leu-Ala) (2), cyclo(Phe-Ala) (3), cyclo(Val-Tyr) (4), cyclo(Ala-Tyr) (5), cyclo(Ala-Trp) (6); Compounds 3 and 6 displayed significant anti-diatom activity with the inhibitory rate of 50% and 85% at the concentration of 50 μg/mL, respectively. [**Conclusion**] The anti-diatom compounds isolated from marine bacterium *Pseudomonas putida* were cyclo(Phe-Ala) and cyclo(Ala-Trp).

Keywords: Anti-diatom activity, *Pseudomonas putida*, diketopiperazines, marine bacterium

(本文责编: 张晓丽)