

## ◆ 生物科学 ◆

## 蜡样芽孢杆菌 BWL-001 代谢产物及抗弧菌活性研究\*

何佳利<sup>1,2,3</sup>, 甘雨满<sup>3,4</sup>, 白 猛<sup>3,4</sup>, 高程海<sup>3,4</sup>, 张文飞<sup>1,2\*\*</sup>, 王锐萍<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 海南师范大学生命科学学院, 海南海口 571158; 2. 海南师范大学, 热带岛屿生态学教育部重点实验室, 海南海口 571158; 3. 广西中医药大学海洋药物研究院, 广西南宁 530200; 4. 广西中医药大学, 广西海洋药物重点实验室, 广西南宁 530200)

**摘要:**本研究旨在从 1 株海南霸王岭热带雨林土壤来源的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) BWL-001 中挖掘抗海洋弧菌(*Vibrio*)的活性代谢产物, 采用多种现代色谱分离方法对菌株提取物进行分离纯化, 通过核磁共振波谱解析确定单体化合物结构, 并结合 96 孔板微量稀释法进行抗弧菌活性测试。结果显示, 从该菌株 LB 培养基发酵产物中分离鉴定出 10 个单体化合物, 包括 4 个二酮哌嗪类化合物(1-4)、3 个吲哚生物碱衍生物(6-8)以及 3 个其他类化合物(5、9 和 10), 分别命名为 3-异丁基吡咯并哌嗪-2,5-二酮(1)、cyclo-(Pro-Ile)(2)、maculosin(3)、trans-cyclo-(Pro-Phe)(4)、anthranilic acid(5)、indole-3-methylethanoate(6)、indole-3-acetic acid(7)、nb-acetyltryptamine(8)、thymine(9)、acetamide(10)。其中, 化合物 6-8 对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)有弱的抑制活性, 其最小抑菌浓度(Minimal Inhibit Concentration, MIC)值均为 12.5 μg/mL。本研究丰富了海南霸王岭热带雨林土壤来源的蜡样芽孢杆菌代谢产物多样性, 并为抗弧菌活性先导化合物的发现提供理论基础。

**关键词:**霸王岭热带雨林; 土壤; 蜡样芽孢杆菌; 代谢产物; 抗弧菌活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2023)04-0713-06

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20230928.010

弧菌(*Vibrio*)是一类革兰氏阴性细菌, 是海洋环境中最常见的细菌类群。迄今为止, 全球范围内已有 100 多种弧菌, 广泛分布于海湾、近海岸海域河口和海底沉积物中<sup>[1,2]</sup>。部分弧菌是常见的水产养殖致病菌, 如副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、

溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)和欧文氏弧菌(*V. owensii*)等<sup>[3-6]</sup>。其中, 鳃弧菌是最早发现的鱼类细菌病原, 可感染海水鱼、虾等多种水产动物, 对海洋水产养殖业造成重大经济损失<sup>[7,8]</sup>。目前, 抗生素是

收稿日期: 2023-03-29

修回日期: 2023-05-05

\* 国家自然科学基金地区项目(31960012), 海南省自然科学基金高层次人才项目(321RC545)和海南省重大科技计划项目(ZDKJ2021035)资助。

## 【第一作者简介】

何佳利(1991-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事海洋天然药物化学和微生物学研究。

## 【\*\*通信作者】

张文飞(1979-), 男, 教授, 主要从事微生物功能基因代谢研究, E-mail: wfzhang@hainnu.edu.cn。

王锐萍(1963-), 女, 教授, 主要从事微生物学研究, E-mail: wrp@hainnu.edu.cn。

## 【引用本文】

何佳利, 甘雨满, 白猛, 等. 蜡样芽孢杆菌 BWL-001 代谢产物及抗弧菌活性研究[J]. 广西科学, 2023, 30(4): 713-718.

HE J L, GAN Y M, BAI M, et al. Study on Metabolites and Anti-*Vibrio* Activity of *Bacillus cereus* BWL-001 [J]. Guangxi Sciences, 2023, 30(4): 713-718.

治疗水产动物疾病的主要手段,如果大量使用抗生素使耐药性菌株不断涌现,水产病害就愈加难以控制。因此,亟需寻找绿色环保的生物杀菌剂来防治水产养殖中的弧菌疾病。

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种普遍存在的革兰氏阳性细菌<sup>[9]</sup>,属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),与苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)等物种具有许多共同的表型和基因型特性,具有对环境无污染、生物靶向性强、效果显著和持久的生物防治优点,有开发成绿色环保的生物杀菌剂的潜力<sup>[10-12]</sup>。此外,研究表明蜡样芽孢杆菌能产生高活性的激素、细菌素、多肽抗生素、杀虫外毒素以及挥发性抗菌物质等<sup>[13,14]</sup>。蜡样芽孢杆菌的代谢产物结构类型及生物活性多样,关于其代谢产物的研究备受关注。本课题组前期研究发现,热带雨林土壤来源的芽孢杆菌代谢产物具有多种生物活性<sup>[15]</sup>。经过前期活性筛选发现,蜡样芽孢杆菌 BWL-001 的代谢提取物对副溶血弧菌有微弱活性。为深入研究蜡样芽孢杆菌 BWL-001 代谢产物中抗海洋弧菌活性的化学成分,运用多种色谱分离方法,从菌株提取物中分离具有抗海洋弧菌活性的先导化合物,为研发防治水产养殖中弧菌疾病的绿色环保的生物杀菌剂提供研究基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 株 来 源

土壤样品于 2016 年 7 月采自中国海南岛霸王岭热带雨林(19°4'11"N,109°10'37"E),从中分离出蜡样芽孢杆菌 BWL-001,菌种一直存放于海南师范大学热带岛屿生态学教育部重点实验室。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

ZYJ-S 型超净工作台(苏州净化设备有限公司),高效液相色谱仪(日本岛津公司),中压制备色谱仪(瑞士布奇公司),EYELAN-1100V-W 型旋转蒸发器(日本东京理化器械株式会社),YOKO-ZK 暗箱式紫外分析仪(武汉药科新技术开发有限公司),Sephadex LH-20 凝胶(上海科拉曼试剂有限公司),YMC-Pack ODS-A 色谱柱(10 mm×250 mm,5 μm,日本 YMC 公司),Bruker AV-500 MHz 超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司),色谱柱硅胶(青岛海洋化工有限公司),核磁所用的氘代试剂购自艾览(上海)化工科技有限公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 菌种发酵培养

在灭菌后的超净工作台内用 LB 培养基(胰蛋白 10 g/L,酵母提取粉 5 g/L,氯化钠 10 g/L,pH 值为 7.2-7.4)大规模发酵,共发酵 100 瓶。每 1 000 mL 的三角锥形瓶中加入 300 mL 的培养液,在 121 °C 的高温灭菌锅中灭菌 20 min,待培养基冷却后接种,室温 120 r/min 摇床发酵培养 3 d,共发酵 30 L。

#### 1.2.2 提 取 与 分 离

大规模发酵后,加入等体积的乙酸乙酯萃取发酵液(30 L),反复萃取多次至萃取液颜色变浅。萃取液通过减压浓缩得到总浸膏(17.8 g),将总浸膏用 200-300 目的正相硅胶拌样,进行中压正相硅胶柱色谱分离,采用石油醚-乙酸乙酯(100:0-0:100,V/V)和乙酸乙酯-甲醇(100:0-0:100,V/V)体系进行梯度洗脱,收集得到 6 个小组分(Fr. 1-Fr. 6)。

Fr. 5 (1.7 g)经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(纯甲醇)等梯度洗脱分离,再通过高效液相色谱(水-甲醇 15:5,V/V)梯度洗脱制备得到化合物 1 (4.3 mg)、2 (3.7 mg)、3 (4.0 mg)和 4 (3.5 mg)。Fr. 6 (3.4 g)首先经过反相硅胶柱色谱(水-甲醇 7:3-2:8,V/V)梯度洗脱分离,然后经过 Sephadex LH-20(纯甲醇)凝胶柱色谱等梯度洗脱分离,最后经过高效液相色谱(水-甲醇 9:11,V/V)等梯度洗脱制备得到化合物 5 (3.9 mg)。Fr. 4 (4.0 g)经过 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1,V/V)凝胶柱色谱等梯度洗脱,然后通过高效液相色谱(水-甲醇 1:4,V/V)等梯度分离制备得到化合物 6 (3.1 mg)、7 (4.2 mg)和 8 (4.5 mg)。Fr. 3 (2.6 g)经过正相硅胶柱色谱梯度洗脱分离,以乙酸乙酯-甲醇(5:1-1:1,V/V)体系梯度洗脱,再经高效液相色谱(水-甲醇 7:13,V/V)制备得到化合物 9 (3.2 mg)和 10 (5.3 mg)。

#### 1.2.3 抗 菌 活 性 测 定

采用 96 孔板微量稀释法测定所有化合物对欧文氏弧菌(ATCC 25919)、哈维氏弧菌(ATCC 14126)、副溶血弧菌(ATCC 17802)和溶藻弧菌(ATCC 17749)的抗菌活性,测定化合物的最小抑菌浓度(Minimal Inhibit Concentration,MIC)值。上述 4 种菌为海洋致病弧菌,目前所有弧菌菌株均保存于广西中医药大学海洋药物研究院。抗菌活性测定以氯霉素(Chloramphenicol)为阳性对照,二甲基亚砜(DMSO)为阴性对照,具体实验方法参考文献[16]。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物结构鉴定

从霸王岭热带雨林土壤来源的蜡状芽孢杆菌 *B.*

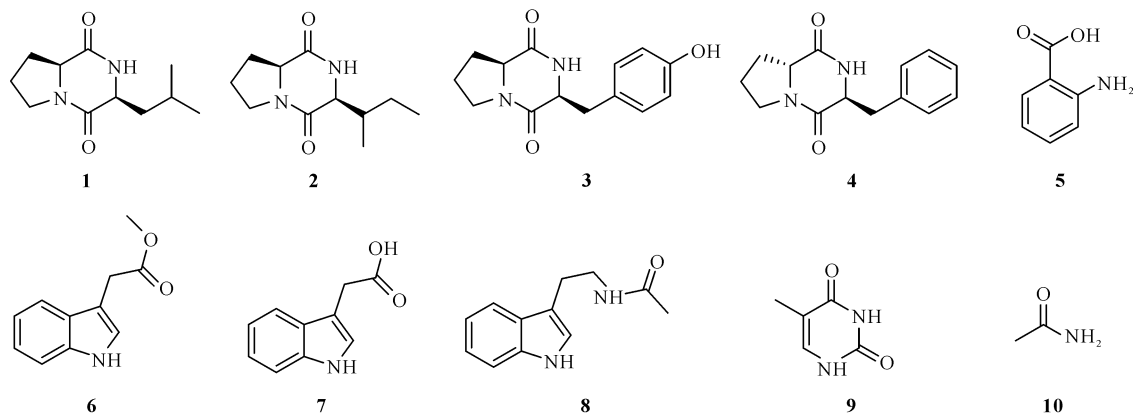


图1 化合物 1-10 的结构

Fig.1 Structures of compounds 1-10

### 2.2 化合物波谱数据

化合物 1。浅黄色油状, ESI-MS  $m/z$ : 211.1  $[M+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 4.11 (1H, m, H-6), 4.00 (1H, m, H-3), 3.56 (2H, m, H-9), 2.33 (1H, m, H-7a), 1.74-2.11 (5H, m, H-7b, H-8, H-10), 1.52 (1H, m, H-11), 0.95 (3H, d,  $J = 4.4$  Hz, H-12 or H-13), 0.85 (3H, d,  $J = 4.4$  Hz, H-12 or H-13);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 170.4 (C-2), 166.4 (C-5), 59.2 (C-6), 53.6 (C-3), 45.7 (C-9), 38.9 (C-10), 28.4 (C-7), 24.9 (C-11), 23.5 (C-8), 22.9 (C-12 or C-13), 21.4 (C-12 or C-13)。上述核磁共振波谱数据与文献[17]报道一致, 因此鉴定该化合物为 3-异丁基吡咯并哌嗪-2,5-二酮。

化合物 2。浅黄色油状, ESI-MS  $m/z$ : 211.1  $[M+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_H$ : 8.00 (1H, s, NH), 4.19 (1H, m, H-6), 3.99 (1H, m, H-3), 3.37 (2H, m, H-9), 2.11 (1H, m, H-7a), 1.76-1.91 (5H, m, H-7b, H-8, H-10), 1.35 (1H, m, H-11), 0.86 (3H, t,  $J = 4.4$  Hz, H-12), 0.85 (3H, d,  $J = 4.4$  Hz, H-13);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_C$ : 170.3 (C-2), 166.5 (C-5), 58.5 (C-6), 52.6 (C-3), 44.8 (C-9), 37.8 (C-10), 27.5 (C-7), 24.1 (C-11), 22.8 (C-8), 22.5 (C-13), 21.9 (C-12)。上述核磁共振波谱数据与文献[18]报道一致, 故鉴定该化合物为 cyclo-(Pro-Ile)。

化合物 3。浅黄色油状, ESI-MS  $m/z$ : 261.1  $[M+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_H$ :

*cereus* BWL-001 中分离鉴定出 10 个化合物, 结构如图 1 所示。

7.06 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2', 6'), 6.66 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-3', 5'), 4.25 (1H, m, H-9), 4.02 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-6), 3.62 (1H, m, H-5a), 3.40 (1H, m, H-5b), 3.24 (1H, m, H-10a), 2.94 (1H, dd,  $J = 14.4, 9.2$  Hz, H-10b), 1.99 (1H, m, H-3a), 1.69 (2H, m, H-4), 1.38 (1H, m, H-3b);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_C$ : 169.9 (C-1), 164.7 (C-7), 155.9 (C-4'), 130.7 (C-2', 6'), 126.9 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'), 58.3 (C-6), 55.9 (C-9), 44.5 (C-3), 34.7 (C-10), 27.8 (C-5), 21.7 (C-4)。上述核磁共振波谱数据与文献[19]报道一致, 因此鉴定该化合物为 maculosin。

化合物 4。浅黄色油状, ESI-MS  $m/z$ : 245.1  $[M+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_H$ : 7.30 (2H, br t,  $J = 7.2$  Hz, H-2', 6'), 7.22 (1H, br t,  $J = 7.2$  Hz, H-4'), 7.19 (2H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-3', 5'), 4.22 (1H, dt,  $J = 6.7, 4.3$  Hz, H-9), 3.62 (1H, ddd,  $J = 12.0, 9.4, 8.4$  Hz, H-3a), 3.39 (1H, ddd,  $J = 12.0, 8.4, 3.0$  Hz, H-3b), 3.15 (2H, m, H-10), 3.06 (1H, dd,  $J = 10.4, 6.6$  Hz, H-6), 2.18 (1H, m, H-5a), 1.94 (1H, m, H-4a), 1.79 (1H, m, H-5b), 1.69 (1H, m, H-4b);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_C$ : 169.4 (C-1), 164.9 (C-7), 135.4 (C-1'), 130.1 (C-2', 6'), 128.9 (C-3', 5'), 127.7 (C-4'), 59.2 (C-6), 57.9 (C-9), 45.3 (C-3), 40.6 (C-10), 29.1 (C-5), 21.8 (C-4)。上述核磁共振波谱数据与文献[20]报道一致, 故鉴定该化合物为 trans-cyclo-

(Pro-Phe)。

化合物 5。黄色油状物, ESI-MS  $m/z$ : 138.0  $[M+H]^+$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 7.75 (1H, dd,  $J = 4.0, 8.0$  Hz, H-7), 7.21 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 6.76 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-4), 6.50 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-6);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 169.9 (C-1), 151.7 (C-3), 133.9 (C-5), 131.5 (C-7), 116.6 (C-6), 114.9 (C-4), 109.7 (C-2)。上述核磁共振波谱数据与文献[21]报道一致, 因此鉴定该化合物为 anthranilic acid。

化合物 6。淡黄色固体, ESI-MS  $m/z$ : 212.1  $[M+Na]^+$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 7.48 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz, H-4), 7.35 (1H, d,  $J = 4.6$  Hz, H-7), 7.24 (1H, s, H-2), 7.08 (1H, td,  $J = 4.6, 0.8$  Hz, H-6), 6.98 (1H, td,  $J = 5.2, 0.8$  Hz, H-5), 3.74 (2H, s, H-1'), 3.60 (3H, s, H-3');  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 172.0 (C-2'), 136.1 (C-7a), 127.1 (C-3a), 124.1 (C-2), 121.0 (C-6), 118.5 (C-5), 118.4 (C-4), 111.4 (C-7), 106.9 (C-3), 51.5 (C-3'), 30.6 (C-1')。上述核磁共振波谱数据与文献[22]报道一致, 故鉴定该化合物为 indole-3-methylthanoate。

化合物 7。棕色晶体(甲醇), mp. 168-172 °C; ESI-MS  $m/z$ : 174.1  $[M-H]^-$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 7.51 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-4), 7.35 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-7), 7.23 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-2), 7.08 (1H, td,  $J = 7.8, 0.6$  Hz, H-6), 6.98 (1H, td,  $J = 7.2, 1.2$  Hz, H-5), 3.64 (2H, s, H-1');  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 173.3 (C-2'), 136.1 (C-7a), 127.2 (C-3a), 123.9 (C-2), 121.0 (C-6), 118.5 (C-5), 118.4 (C-4), 111.4 (C-7), 107.7 (C-3), 31.1 (C-1')。上述核磁共振波谱数据与文献[23]报道一致, 故鉴定该化合物为 indole-3-acetic acid。

化合物 8。黄色油状, ESI-MS  $m/z$ : 201.1  $[M-H]^-$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$ : 9.02 (1H, brs, 1-NH), 7.59 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-4), 7.35 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-7), 7.20 (1H, dd,  $J = 8.0, 8.0$  Hz, H-6), 7.11 (1H, dd,  $J = 8.0, 8.0$  Hz, H-5), 6.93 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-2), 6.08 (1H, brs, 12-NH), 3.55 (2H, dt,  $J = 6.5$  Hz, H-11), 2.94 (2H, t,  $J = 6.5$  Hz, H-10), 1.88 (3H, s, H-14);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$ : 170.9 (C-13), 136.6 (C-8),

127.4 (C-9), 122.4 (C-6), 121.9 (C-2), 119.3 (C-5), 118.6 (C-4), 112.5 (C-3), 111.5 (C-7), 40.1 (C-11), 25.2 (C-10), 23.2 (C-14)。上述核磁共振波谱数据与文献[24]报道一致, 因此鉴定该化合物为 nb-acetyltryptamine。

化合物 9。白色固体, ESI-MS  $m/z$ : 125.1  $[M-H]^-$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 11.00 (1H, s, 2-NH), 10.58 (1H, s, 4-NH), 7.25 (1H, s, H-5), 1.72 (3H, s, H-7);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 165.1 (C-1), 151.3 (C-3), 137.6 (C-5), 107.5 (C-6), 11.8 (C-7)。上述核磁共振波谱数据与文献[25]报道一致, 故鉴定该化合物为 thymine。

化合物 10。白色固体, ESI-MS  $m/z$ : 82.1  $[M+Na]^+$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$ : 6.86 (2H, brs, 1-NH), 1.77 (3H, s, H-2);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_C$ : 173.5 (C-1), 22.6 (C-2)。上述核磁共振波谱数据与文献[26]报道一致, 故鉴定该化合物为 acetamide。

### 2.3 抗菌活性测定结果

抗海洋弧菌活性测试结果表明, 化合物 6-8 对副溶血弧菌有弱的抑制活性, 其 MIC 值均为 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 其他化合物的 MIC 值均大于 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 阳性对照氯霉素的 MIC 值为 0.78  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 3 结论

本研究对海南霸王岭热带雨林土壤来源的蜡样芽孢杆菌 BWL-001 代谢产物进行系统研究, 从该菌株 LB 培养基发酵产物中共分离鉴定出 10 个化合物, 包括 4 个二酮哌嗪类化合物(1-4)、3 个吡啶生物碱衍生物(6-8)以及 3 个其他类化合物(5、9 和 10), 所有化合物均首次从该菌株中分离得到, 化合物 6-8 对副溶血弧菌有弱的抑制活性。此外, 据文献报道, 化合物 1 和 4 对鳗弧菌有微弱抑制活性<sup>[18]</sup>; 化合物 2 和 3 未见相关抗弧菌活性数据的报道; 化合物 6 具有生长促进活性, 对小麦胚芽生长有促进作用<sup>[22]</sup>; 化合物 8 对革兰氏阳性细菌, 如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 等有弱的抑制活性<sup>[27]</sup>, 推测该化合物结构中乙酰基为主要活性基团。本研究仅从蜡样芽孢杆菌 BWL-001 代谢产物中分离出 10 个单体化合物, 仍有很多微量成分未被分离鉴定出来, 后续可以对该菌株代谢产物中的微量成分进行分离, 以期获得更多结构新颖的化合物。本研究丰富了海南

霸王岭热带雨林土壤来源的蜡样芽孢杆菌中活性代谢产物的研究,为充分挖掘蜡样芽孢杆菌中抗海洋弧菌的活性物质提供了科学依据。

#### 参考文献

- [1] HUANG H T, LIAO Z H, WU Y S, et al. Effects of *Bidens alba* and *Plectranthus amboinicus* dietary supplements on nonspecific immune responses, growth, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in white leg shrimp (*Penaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture*, 2022, 546(15):737306.
- [2] 钟宛宣, 杨芸兰, 李祥付, 等. 两株溶藻弧菌噬菌体的生理特性和基因组研究[J]. *热带海洋学报*, 2021, 40(4): 22-34.
- [3] 赵奇. 浅析水产养殖中的鱼病防治措施[J]. *南方农业*, 2022, 16(4): 189-191.
- [4] 战文斌, 刘洪明, 王越. 水产养殖病害及其药物控制与水产品安全[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2004, 34(5): 758-760.
- [5] 赵海军, 王紫娟, 李志佳, 等. 2020年我国水产品出口情况分析及其对策研究[J]. *质量安全与检验检测*, 2021, 31(4): 47-52.
- [6] 张颖雪, 苏洁, 叶仕根. 养殖贝类病原弧菌的耐药性及防治方法研究进展[J]. *江西水产科技*, 2019, 165(5): 53-56.
- [7] 杨少丽, 王印庚, 董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展[J]. *海洋水产研究*, 2005, 26(4): 75-83.
- [8] PATHIRATNE A, WIDANAPATHIRANA G S, CHANDRAKANTHI W H S. Association of *Aeromonas hydrophila* with epizootic ulcerative syndrome (EUS) of freshwater fish in Sri Lanka [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 1994, 10(2/3): 204-208.
- [9] SCHNEPF E, CRICKMORE N, VAN RIE J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 775-806.
- [10] HELGASON E, ØKSTAD O A, CAUGANT D A, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* one species on the basis of genetic evidence [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2627-2630.
- [11] IBRAHIM M A, GRIKO N, JUNKER M, et al. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective [J]. *Bioengineered Bugs*, 2010, 1(1): 31-50.
- [12] JIN Y H, WANG J H, LIU Q, et al. Genome of *Bacillus* sp. strain QHF158 provides insights into its parasporal inclusions encoded by the S-layer gene [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, 51(3): 1145-1150.
- [13] 易龙, 张亚, 廖晓兰, 等. 蜡状芽孢杆菌次生代谢产物的研究进展[J]. *农药*, 2013, 52(3): 162-164, 170.
- [14] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(2): 97-103.
- [15] BAI M, HE J L, GAO C H, et al. Secondary metabolites from *Bacillus thuringiensis* HS66 [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2022, 58(2): 381-383.
- [16] PIERCE C G, UPPULURI P, TRISTAN A R, et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(9): 1494-1500.
- [17] 刘涛, 李占林, 王宇, 等. 海洋细菌 *Bacillus subtilis* 次级代谢产物的研究[J]. *中国海洋药物*, 2009, 28(5): 1-6.
- [18] REN S, MA W, XU T H, et al. Two novel alkaloids from the South China Sea marine sponge *Dysidea* sp. [J]. *Journal of Antibiotics*, 2010, 63(12): 699-701.
- [19] CHEN S L, ZHANG D, CHEN M X, et al. A rare dike-topiperazine glycoside from marine-sourced *Streptomyces* sp. ZZ446 [J]. *Natural Product Research*, 2018, 34(7): 1046-1050.
- [20] HARIZANI M, KATSINI E, GEORGANTEA P, et al. New chlorinated 2,5-diketopiperazines from marine-derived bacteria isolated from sediments of the Eastern Mediterranean Sea [J]. *Molecules*, 2020, 25(7): 1509.
- [21] PARK S Y, SHIM S H. Characterization of metabolites from cultures of *Cellulosimicrobium cellulans* [J]. *Journal of the Korean Society Applied Biological Chemistry*, 2014, 57(4): 481-484.
- [22] LIU Y H, JUNG J H, ZHANG S. Indole alkaloids from a sponge *Sarcotragus* species [J]. *Biochemical Systematics Ecology*, 2006, 34(5): 453-456.
- [23] 龚春燕, 张道敬, 魏鸿刚, 等. 多粘类芽孢杆菌 HY96-2 发酵液化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(3): 379-381, 387.
- [24] 韩箫, 唐旭利, 乔丹, 等. 1株海洋来源真菌 *Penicillium chrysogenum* 生物活性成分研究[J]. *中国海洋药物*, 2019, 38(3): 77-81.
- [25] 石瑛, 田黎, 王婧, 等. 海洋放线菌 *Micromonospora* sp. 与细菌 *Oceanospirillum* sp. 发酵液中化学成分的研究[J]. *中国海洋药物*, 2006(1): 6-10.
- [26] OUYANG X L, WEI L X, FANG X M, et al. Flavonoid constituents of *Euonymus fortunei* [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2013, 49(3): 428-431.

[27] VACA J, SALAZAR F, ORTIZ A, et al. Indole alkaloid derivatives as building blocks of natural products from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus velezensis* and

their antibacterial and antifungal activity study [J]. *Journal of Antibiotics*, 2020, 73(11): 798-802.

## Study on Metabolites and Anti-*Vibrio* Activity of *Bacillus cereus* BWL-001

HE Jiali<sup>1,2,3</sup>, GAN Yuman<sup>3,4</sup>, BAI Meng<sup>3,4</sup>, GAO Chenghai<sup>3,4</sup>, ZHANG Wenfei<sup>1,2\*\*</sup>,  
WANG Ruiping<sup>1,2\*\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou, Hainan, 571158, China; 2. Key Laboratory of Tropical Islands Ecology, Ministry of Education, Hainan Normal University, Haikou, Hainan, 571158, China; 3. Institute of Marine Drugs, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China; 4. Guangxi Key Laboratory of Marine Drugs, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China)

**Abstract:** The aim of this study was to explore the active metabolites against marine *Vibrio* from a strain of *Bacillus cereus* BWL-001 isolated from the soil of Bawangling tropical rainforest in Hainan. A variety of modern chromatographic separation methods were used to isolate and purify the extracts of the strain. The structure of the monomer compound was determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy, and the anti-*Vibrio* activity was tested by 96-well plate micro-dilution method. The results showed that 10 monomer compounds were isolated and identified from LB culture medium of the strain, including four diketopiperazines (1–4), three indole alkaloid derivatives (6–8), and three other compounds (5, 9 and 10). Named 3-isobutylpyrrolo-piperazine-2,5-dione (1), cyclo-(Pro-Ile) (2), maculosin (3), trans-cyclo-(Pro-Phe) (4), anthranilic acid (5), indole-3-methyl-ethanoate (6), indole-3-acetic acid (7), nb-acetyltryptamine (8), thymine (9), acetamide (10). Among them, compounds 6–8 had weak inhibitory activity against *Vibrio parahaemolyticus* with Minimal Inhibit Concentration (MIC) values of 12.5 µg/mL. This study enriched the diversity of metabolites of *B. cereus* derived from the soil of Bawangling tropical rainforest in Hainan, and provided a theoretical basis for the discovery of lead compounds with anti-*Vibrio* activity.

**Key words:** Bawangling tropical rain forest; soil; *Bacillus cereus*; metabolites; anti-*Vibrio* activity

责任编辑:唐淑芬



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxk@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>