

**Киприанова Е.А., Шепелевич В.В., Клочко В.В., Остапчук А.Н.,
Варбанец Л.Д., Скоклюк Л.Б., Березкина А.Е., Авдеева Л.В.**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного 154, Киев ГСП, ДО3680, Украина*

АНТИФУНГАЛЬНЫЕ И ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ВЕЩЕСТВА ШТАММОВ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AUREOFACIENS* – КОМПОНЕНТОВ ГАУПСИНА

В филтратх культуральных жидкостей *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306 – компонентов инсектофунгицидного биопрепарата гаупсин – методами хромато-масс спектрометрии обнаружены феназин-1-карбоновая, 2-оксифеназин-1-карбоновая кислота и 2-оксифеназин, активные в отношении фитопатогенных грибов; штамм В-306 наряду с феназинами синтезировал антифунгальный антибиотик пирролнитрин.

Супернатанты культуральных жидкостей *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 и В-306, выращенных на среде Кинг А, а также выделенные из них путем упаривания, диализа и лиофилизации препараты экзополимеров обладали высокой активностью в отношении вируса табачной мозаики (ВТМ). В дозе 10 мг/мл они снижали инфекционность ВТМ на 76–96 %, при концентрациях 1 и 0.1 мг/мл противовирусный эффект соответственно уменьшался до 40–62 и 14–27 %.

Диализ не оказывал влияния на противовирусную активность выделенных препаратов, которые содержали от 2 до 7,6 % углеводов, в том числе нейтральные моносахариды фукозу, маннозу, галактозу и глюкозу.

Ключевые слова: *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, антибиотики-феназины, пирролнитрин, антифунгальная и противовирусная активность, вирус табачной мозаики, экзополимеры.

Сапрофитные бактерии *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (ранее *P. aureofaciens*) принадлежат к одному из наиболее активных продуцентов антибиотических веществ среди видов рода *Pseudomonas*. На протяжении последних десятилетий достигнут значительный прогресс в их использовании для биологической защиты растений от возбудителей заболеваний. Установлена важная роль антибиотиков, образуемых штаммами *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* в процессах биоконтроля, изучены механизмы колонизации корней бактериями и подавления патогенов, исследованы гены, участвующие в этих процессах [14, 7]. Препараты, содержащие штаммы названного вида (например, псевдобактерин-2) уже используются на практике для борьбы с грибными заболеваниями растений; в то же время продолжают испытания и расширяются показания для применения новых активных культур [13]. Так, в Институте микробиологии и вирусологии НАНУ на основе двух штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* был создан и защищен патентом комплексный биопрепарат гаупсин, тормозящий рост фитопатогенных бактерий и грибов, и обладающий, наряду с антимикробной, значительной энтомопатогенной активностью [4]. Входящие в состав гаупсина штаммы *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306 были отобраны в результате широкомасштабного исследования антагонистической активности большой коллекции бактерий рода *Pseudomonas* в отношении фитопатогенных грибов и бактерий, а также изучения их действия на некоторых насекомых-вредителей, в частности яблоневую плодоядку и колорадского жука. Оба штамма хорошо росли в смешанной культуре. Созданный на их основе комплексный препарат представляет собой клеточную биомассу обоих штаммов со средой выращивания. Гаупсин с успехом используется для защиты овощных, злаковых, плодовых культур, виноградных насаждений и лесных массивов от грибных и бактериальных заболеваний, а также насекомых-вредителей. В последние годы нами установлено наличие у гаупсина противовирусных свойств [1].

Таким образом, к настоящему времени накоплена значительная информация о широком спектре биологической активности препарата гаупсин и его компонентов – штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*. Однако природа веществ, обуславливающих эту активность, охарактеризована либо недостаточно полно, либо вообще не изучена.

Целью настоящей работы было изучение и характеристика соединений, обеспечивающих широкий спектр действия гаупсина как средства биологической защиты растений.

© Киприанова Е.А., Шепелевич В.В., Клочко В.В., Остапчук А.Н., Варбанец Л.Д., Скоклюк Л.Б., Березкина А.Е., Авдеева Л.В., 2013

Материалы и методы. Объектом исследований служил препарат гаупсин, полученный совместным глубинным культивированием штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306 на органо-минеральной производственной среде с мелассой и кукурузным экстрактом [4]; конечная концентрация клеток составляла $1 \cdot 10^9 - 1 \cdot 10^{10}$ кл/мл. Исследовались также отдельные штаммы УКМ В-111 и УКМ В-306 – компоненты препарата.

Культивирование штаммов. Для оценки способности штаммов к синтезу веществ с антифунгальной активностью использовали полусинтетическую среду Кинг А, оптимальную для биосинтеза феназинов (г/л): пептон – 20, K_2SO_4 – 20, глицерин – 20, $MgCl_2$ – 7. Для обнаружения антибиотиков группы пирролнитрина использовали среду Е [10] (%): глицерин – 3, Наглютамат – 1,0, NH_4Cl – 0,3, KH_2PO_4 – 2,18, Na_2HPO_4 – 1,43, $MgSO_4$ – 0,05, $FeSO_4$ – 0,05, $ZnSO_4$ – 0,005. В параллельных опытах к среде Е добавляли d-триптофан в концентрации 500 мкг/мл.

Ферментации вели в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, заполненных на 150 мл питательной средой, в течение 72 ч, на качалках (240 об/мин), при температуре 27 °С. По завершении ферментации проводили идентификацию образуемых соединений.

Определение производных феназина. Культуральные жидкости, освобожденные от клеток центрифугированием, фильтровали через мембранные фильтры (Agilent, 0,2 мкм). Полученные фильтраты исследовали хромато-масс-спектрометрическим методом с использованием жидкостного хроматографа «Agilent 1200» и масс-спектрометрического детектора «Agilent G1956B».

Разделение феназинов проводили на колонке с сорбентом в обращенной фазе (Ascentis RP-amide C18, 150 мм × 4,6 мм × 5 мкм) в градиентном режиме в системе метанол-вода с добавлением 0,1 % уксусной кислоты. Температура колонки 30 °С, инъекция пробы 5 мкл. Детекцию проводили с помощью диодно-матричного детектора при длине волны 240 нм. Масс-спектрометрический анализ проводили с регистрацией позитивных и негативных ионов с соотношением m/z (масса/заряд) в диапазоне 50–300.

Определение пирролнитрина. Хроматографическое разделение фильтратов культуральных жидкостей проводили согласно методу определения феназинов. Масс-спектрометрическую детекцию осуществляли в режиме SIM (select ion method) с фиксацией иона со значением m/z = 258 (позитивный режим), что соответствует молекулярной массе пирролнитрина.

Наработку антимикробно активных метаболитов P. chlororaphis subsp. *aureofaciens* осуществляли, выращивая штаммы-компоненты гаупсина в описанных выше условиях ферментации. Пигменты получали путем экстракции среды Кинг А подкисленным бутанолом и препаративной тонкослойной хроматографии полученных экстрактов в системе хлороформ-уксусная кислота (9:1).

Для исследования противовирусного эффекта использовали гаупсин и фильтраты культуральных жидкостей штаммов В-111 и В-306, выращенных на среде Кинг А в условиях глубинного культивирования, а также препараты, полученные из освобожденной от клеток культуральной жидкости путем упаривания, диализа и лиофилизации.

Биохимические исследования. Содержание элементов в полученных препаратах определяли на элементном анализаторе «Carlo Erba 1106».

Количество углеводов в препаратах определяли водно-фенольным методом [9], а также реакцией с антроном и серной кислотой [3].

Содержание нуклеиновых кислот оценивали по методу Спирина [5], белков – по Лоури [12], 2-кето-3-дезоксиктоновую кислоту (КДО) – тиобарбитуровым методом [2]. Идентификацию нейтральных моносахаридов проводили после гидролиза препаратов в 2 н HCl (5 ч, 100 °С). Моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов [2] на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890/5973N, колонка DB-225mS (30м×0,25мм×0,25мкм), газ-носитель – гелий, поток через колонку – 1 мл/мин. Температура испарителя – 250 °С, интерфейса – 280 °С, термостата – 220 °С (режим изотермический). Моносахариды идентифицировали, сравнивая время удерживания ацетатов полиолов исследуемых образцов со стандартными, а также используя компьютерную базу данных ChemStation. Количественные соотношения отдельных моносахаридов выражали в % от общей суммы площадей пиков.

Антифунгальную активность феназиновых пигментов, полученных из культуральных жидкостей штаммов В-111 и В-306, исследовали методом серийных разведений на жидком

судле в отношении штаммов фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *Mucor plumbeus*, *Drechslera graminea*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizoctonia solani*, *Monilia fructigena*, *Alternaria* sp., *Botrytis cynerea*. Перечисленные тест-культуры были получены нами из отдела физиологии и систематики микромицетов ИМВ.

При изучении противовирусной активности гаупсина в качестве тест-объекта использовали ВТМ (штамм U₁). Суспензию препарата ВТМ (2 мг/мл), очищенного методом дифференциального центрифугирования, сохраняли при 4 °С в ампулах в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,4 и использовали по необходимости.

Способность препарата гаупсин, штаммов, входящих в его состав, и полученных из них препаратов тормозить развитие вирусной инфекции изучали на сверхчувствительных к ВТМ растениях дурмана (*Datura stramonium* L.) и табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Иммуный 580.

Водные растворы препаратов испытывали методом «половинок»: правую половинку листа заражали ВТМ (контроль), а левую – смесью ВТМ и исследуемого вещества в концентрациях 10–0,1 мг/мл.

Степень угнетения вирусной инфекции рассчитывали по формуле:

$$I = (1 - Д/К) \times 100, \%$$

где К – среднее количество некрозов в контроле, Д – то же, что и в опыте.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием метода попарных сравнений.

Результаты и их обсуждение. Известно [7], что антифунгальные и антибактериальные свойства штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* обусловлены синтезом антибиотиков – производных феназина, однако у штаммов, входящих в состав биопрепарата гаупсин, они не были детально охарактеризованы. Не известно, синтезируют ли эти бактерии антимикробные вещества иной природы, нежели феназины, а также с какими соединениями связан антивирусный эффект гаупсина. Поэтому задачей наших исследований была не только качественная, но и количественная характеристика феназинсинтезирующей активности штаммов-компонентов гаупсина. Хромато-масс-спектрометрические исследования (LC/MS) (рис. 1) показали присутствие феназиновых производных как непосредственно в гаупсине (на производственной среде), так и при выращивании бактерий на среде Кинг А, оптимальной для биосинтеза пигментов группы феназина. При этом высокой феназинсинтезирующей активностью обладал штамм В-111, в культуральной жидкости которого содержалось 520–600 мг/л феназин-1-карбоновой кислоты, 90–128 мг/л 2-оксифеназин-1-карбоновой кислоты и 20–35 мг 2-оксифеназина; в культуральной жидкости штамма В-306 присутствовали те же соединения, но в несколько меньших количествах (350–380, 60–75 и 15–20 мг/л соответственно).

LC/MS-исследования показали, что при выращивании бактерий на среде Е, штамм В-306 синтезировал наряду с феназиновыми производными пирролнитрин (рис. 2) – высокоактивный антифунгальный агент, принадлежащий к фенилпирролам [6]. В культуральной жидкости штамма В-111 этот антибиотик не был обнаружен.

Пирролнитрин, впервые выделенный из культуральной жидкости *Pseudomonas pyrrocyntia*, был впоследствии найден у некоторых других видов псевдомонад, в частности у отдельных штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* [10]. Методом меченых атомов было показано, что непосредственным и специфическим предшественником пирролнитрина является d-триптофан. В наших опытах в присутствии d-триптофана интенсивность биосинтеза пирролнитрина возрастала в среднем в 2,0–2,5 раза.

В табл. 1 представлены результаты изучения антифунгальной активности антибиотиков – производных феназина, образуемых штаммами *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 и В-306. Показано, что все исследованные феназиновые пигменты тормозят рост фитопатогенных грибов и в общем сходны по своей антифунгальной активности; наиболее активна среди них 2-оксифеназин-1-карбоновая кислота.

Свой вклад в антифунгальное действие гаупсина вносит и пирролнитрин, обнаруженный нами в культуральной жидкости штамма В-306 и угнетающий, согласно литературным данным [11], различные виды паразитических и сапрофитных грибов в концентрации от 0,19 до 6,25 мкг/мл.

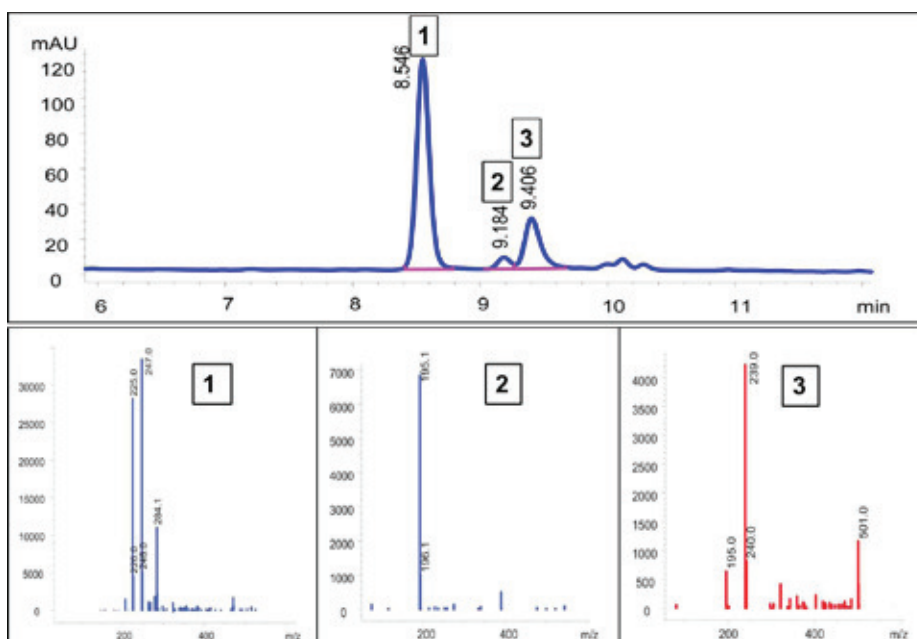


Рис. 1. Хроматограмма и масс-спектры компонентов культурального фильтрата штамма *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-111: 1 – феназин-1-карбоновая кислота; 2 – 2-оксифеназин; 3 – 2-оксифеназин-1-карбоновая кислота.

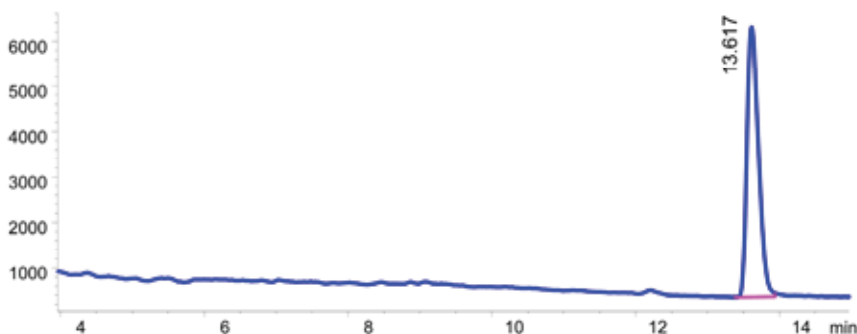


Рис. 2. Хроматограмма пирролнитрина в фильтрате культуральной жидкости штамма *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-306.

Таблица 1
Антифунгальная активность феназиновых пигментов, синтезируемых штаммами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* – компонентами гаупсина

Фитопатогенные грибы	Минимальная ингибирующая рост грибов концентрация, мкг/мл		
	Феназин-1-карбоновой кислоты	2-оксифеназин-1-карбоновой кислоты	2-оксифеназина
<i>Fusarium avenaceum</i>	200	200	400
<i>Fusarium oxysporum</i>	200	200	–
<i>Mucor plumbeus</i>	200	100	200
<i>Drechslera graminea</i>	50	20	50
<i>Rhizopus arrhizus</i>	100	100	–
<i>Rhizoctonia solani</i>	200	200	–
<i>Monilia fructigena</i>	200	100	200
<i>Alternaria</i> sp.	100	50	–
<i>Botrytis cynerea</i>	50	20	100

Примечание: “–” активность в отношении тест-культуры не исследовали.

Таким образом, антифунгальная активность гаупсина связана по нашим данным с синтезом двух групп гетероциклических антибиотиков – феназинов и фенилпирролов. Подобно *P.aeruginosa*, исследуемый вид *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* представляет собой настоящую «фабрику антибиотиков». У отдельных штаммов этого вида описаны и другие антифунгально активные соединения: пиоллотеорин, 2,4-диацетилфлороглюцин, цианистый водород, бутиролактоны [7].

Целью наших исследований была также характеристика веществ, ответственных за противовирусное действие гаупсина.

Ранее [5] нами было показано, что гаупсин на протяжении трех вегетационных сезонов тормозил на 80–97 % развитие вируса табачной мозаики (ВТМ) штамма U1 в опытах *in vivo* на растениях дурмана *Datura stramonium* и табака *Nicotiana tabacum*. Активными относительно ВТМ были культуральные жидкости, полученные как при совместном (гаупсин), так и при раздельном выращивании штаммов В-111 и В-306 на производственной среде, а также на среде Кинг А (табл. 2).

Таблица 2

Угнетение ВТМ-инфекции препаратами из штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306 на растениях *Datura stramonium*

Препарат	Концентрация, мг/мл	Угнетение инфекционности, %
Гаупсин	Неразведенный	93,0
Клетки штаммов В-111 и В-306 в смеси со средой выращивания Кинг А	— // —	91,7
Препарат из штамма В-111, выращенного на среде Кинг А	10	93,7
	1	59,0
	0,1	14,0
Препарат из штамма В-306, выращенного на среде Кинг А	10	97,5
	1	62,0
	0,1	44,3

Из ферментационной среды путем упаривания, диализа и лиофилизации нами были получены водорастворимые термостабильные препараты. Как диализированные, так и недиализированные препараты обнаруживали сходную противовирусную активность (рис. 3, 4), что может свидетельствовать о высокомолекулярной природе противовирусных агентов. Наиболее высокую активность на листьях табака и дурмана (76,0–97,5 %) полученные препараты демонстрировали при концентрации 10 мг/мл; антивирусный эффект прогрессивно снижался при концентрациях 1–0,1 мг/мл (табл. 2).

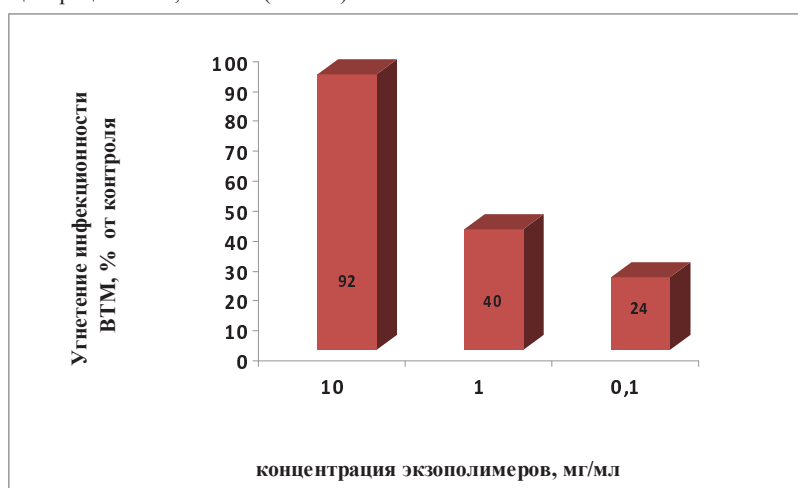


Рис. 3. Угнетение инфекционности (в %) ВТМ недиализированными экзополимерами *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-306 на растениях *Datura stramonium*.

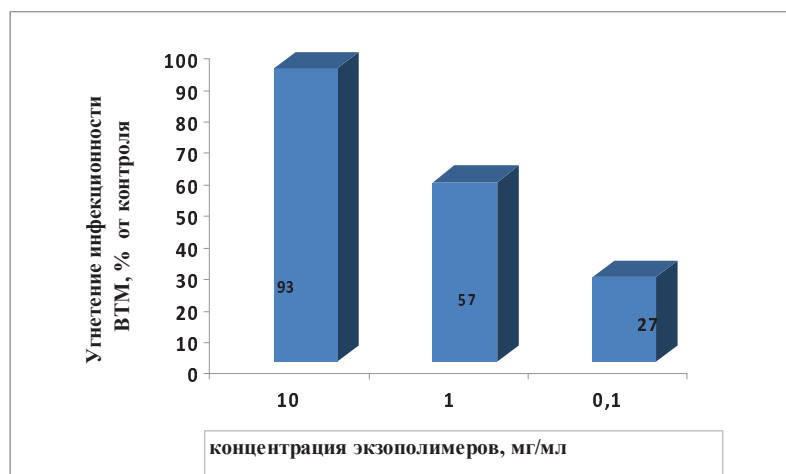


Рис. 4. Угнетение инфекционности (в %) BTM диализированными экзополимерами из штамма *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-306 на растениях *Datura stramonium*.

В табл. 3 представлены данные о химическом составе препаратов экзополимеров, обладающих противовирусной активностью.

Таблица 3

Состав экзополимеров *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УKM B-111 и УKM B-306, выращенных на среде Кинг А

Препарат из штамма	Содержание (в % к сухому весу препарата)						
	Углерода	Азота	Водорода	Углеводов		Белка	Нуклеиновых кислот
				Фенол-серный метод	Антронный метод		
B-111	39,72	12,34	5,89	7,6	7,0	31,0	1,36
B-306	30,65	14,94	4,32	2,0	6,5	28,8	2,17

Общее содержание углеводов, определенное двумя методами, составляло от 2 до 7,6 %.

Качественный состав нейтральных моносахаридов в обоих препаратах сходен и представлен (табл. 4) галактозой, маннозой, глюкозой и фукозой.

Таблица 4

Моносахаридный состав внеклеточных экзополимеров *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-111 и B-306

Штамм	Содержание моносахаридов (% от общей суммы площадей пиков)			
	фукоза	манноза	галактоза	глюкоза
B-111	8,1	22,1	50,4	19,4
B-306	27,0	21,8	32,18	19,06

Наиболее значительные отличия между препаратами наблюдались в содержании фукозы и галактозы.

В исследуемых препаратах не выявлено КДО – характерного компонента липополисахаридов грамотрицательных бактерий, что дает основание предполагать, что внеклеточные полимеры не являются липополисахаридами.

Несмотря на высокое содержание в препарате белка, противовирусные вещества гаупсина не инактивируются прогреванием при 100 °C на протяжении 10 мин. Таким образом, можно предположить, что противовирусная активность не связана с белковыми компонентами препарата.

Параллельно с изучением лиофилизированных препаратов, нами были проведены исследования по частичной очистке вещества, обуславливающего противовирусную активность,

осаждением его спиртом как из культуральной жидкости продуцентов, так и из самих препаратов. Полученные таким образом препараты содержали следы нуклеиновых кислот и 0,6–2,1 % белка. Однако, несмотря на низкое содержание белка, они (как и описанные выше экзополимеры) проявляли высокую противовирусную активность: 91–94 % угнетение ВТМ-инфекции на дурмане в концентрации 10 мг/мл и 49,0–50,9 % в дозе 1 мг/мл. При исследовании препаратов в дозе 0,1 мг/мл инфекционность ВТМ снижалась до 8,4–9,2 %.

В составе обоих препаратов были обнаружены жирные кислоты – С15:0 и С18:0, а также моносахариды: фукоза, манноза, галактоза, глюкоза и арабиноза, что очень близко представленным выше данным (табл. 4).

Таким образом, результаты изучения противовирусных веществ *P. chlororaphis* (независимо от того, каким путем они были получены) свидетельствуют о том, что они являются экзополимерами, содержащими нейтральные моносахариды. Остается невыясненным вопрос о том, содержат ли они уроновые кислоты, аминокислоты, пируват или какие-либо другие еще не исследованные нами компоненты (например, сульфаты и фосфаты, найденные к настоящему времени в составе некоторых микробных экзополисахаридов [8]). Лишь окончательный и полный анализ различных входящих в их состав соединений позволит ответить на вопрос о том, какие функциональные группы в молекулах экзополимеров *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* обеспечивают их уникальную биологическую активность.

**О.А. Кіпріанова, В.В. Шепелевич, В.В. Клочко, А.М. Остапчук, Л.Д. Варбанець,
Л.Б. Скоклюк, А.Е. Березкіна, Л.В. Авдєєва**

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ

АНТИФУНГАЛЬНІ І ПРОТИВОВІРУСНІ РЕЧОВИНИ ШТАМІВ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AUREOFACIENS* - КОМПОНЕНТІВ ГАУПСИНУ

Резюме

В фільтратах культуральних рідин *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 – компонентів інсектофунгіцидного біопрепарату гаупсин – методами хромато-мас-спектрометрії виявлені феназин-1-карбонова, 2-оксифеназин-1-карбонова кислота і 2-оксифеназин, активні по відношенню до фітопатогенних грибів; штамп В-306 поряд із феназинами синтезував антифунгальний антибіотик пірролінтрин.

Супернатанти культуральних рідин *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 і В-306, які вирощені на середовищі Кінг А, а також виділені з них шляхом випаровування, діалізу та ліофілізації препарати екзополімерів проявляли високу активність щодо вірусу табачної мозаїки (ВТМ). В дозі 10 мг/мл вони знижували інфекційність ВТМ на 76–96 %, при концентраціях 1 і 0,1 мг/мл противірусний ефект відповідно зменшувався до 40–62 і 14–27 %.

Діаліз не впливав на противірусну активність виділених препаратів, які містили від 2 до 7,6% вуглеводів, в тому числі нейтральні моносахариди: фукозу, манозу, галактозу і глюкозу.

К л ю ч о в і с л о в а: *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, антибіотики-феназини, пірролінтрин, антифунгальна і противірусна активність, вірус табачної мозаїки, екзополімери.

**Е.А. Кіпріанова, В.В. Шепелевич, В.В. Клочко, А.М. Остапчук, Л.Д. Варбанець,
Л.Б. Скоклюк, А.Е. Березкіна, Л.В. Авдєєва**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

ANTIFUNGAL AND ANTIVIRAL SUBSTANCES OF *PSEUDOMONAS* *CHLORORAPHIS* SUBSP. *AUREOFACIENS* STRAINS - COMPONENTS OF GAUPSIN

S u m m a r y

Phenazine-1-carboxylic, 2-hydroxy-phenazine-carboxylic acid and 2-hydroxy-phenazine active against phytopathogenic fungi were detected in fermentation broth of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* strains UCM B-111 and UCM B-306 – components of insectofungicide biopreparation gaupsin using chromatography.

mass-spectrometric methods; strain B-306 produced antifungal antibiotic pyrrolnitrin together with phenazines.

Supernatants of fermentation broth of *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* B-111 and B-306 strains grown in King A medium and exopolymers preparations obtained from these supernatants using evaporation, dialysis and lyophilisation were highly active against tobacco mosaic virus (TMV). At a dose of 10 mg/ml they reduced TMV infectivity by 76-96 %, at concentrations 1 and 0.1 mg/ml the antiviral effect was decreased to 40-62 and 14-27 %, respectively

Dialysis did not influence the antiviral activity of isolated preparations. The latter contained 2-7.6 % of carbohydrates including neutral monosaccharides: fucose, mannose, galactose and glucose.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, antibiotics-phenazines, pyrrolnitrin, antifungal and antiviral activity, tobacco mosaic virus, exopolymers.

The authors' address: Kiprianova E.A., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Балко О.І., Кіпріанова О.А., Коваленко О.Г., Шенелевич В.В., Авдєєва Л.В. Антифiтовiрусна активнiсть бiопрепарату гаупсин // Мiкробiологiя i бiотехнологiя. – 2010. – № 2. – С. 51–57.
2. Варбанец Л.Д., Здорovenko Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. – Киев: Наук. думка, 2006. – 237 с.
3. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. – Киев: Наук. думка, 1982. – 189 с.
4. Кіпріанова О.А., Гораль С.В. Инсектофунгiцидний препарат гаупсин для боротьби з шкiдниками i хворобами сiльськогосподарських культур // Патент України № 73682 АО 1N 63/00 С 12 N 1/20 від 10.03.2004 р. Опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.
5. Спирин А.С. Определение нуклеиновых кислот // Биохимия. – 1958. – 23, №5. – С. 562–662.
6. Arima K., Imanaka H., Konsaka M. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas* // Agr. Biol. Chem. – 1964. – 28, N 8. – P. 575–582.
7. Bernd H.A. *Pseudomonas*. Model Organism, Pathogen, Cell Factory / Ed by Rehm. –Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.KgaA, 2008. – P. 331–369.
8. Chin-Chang Hung, Peter H. Santschi, Jeffrey B. Gillow. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II // Carbohydrate Polymers. – 2005. – 61. – P. 141–147.
9. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. // Anal. Chem. – 1956. – 28, N2. – P. 350–356.
10. Elander P. Metabolism of Tryptophans in *Pseudomonas aureofaciens* // Appl. Microbiol. – 1968. – 16, N 5. – P. 753–758.
11. Gordee R.S., Matthews T.R. Evaluation of the in vitro and in vivo antifungal activity of pyrrolnitrin // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. –1967. – P. 379.
12. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N1. – P. 265–275.
13. Raio A., Puopolo G., Gimmino A., Danti R., Della Rocca G., Evidente A. Biocontrol of cypress canker by the phenazine producer *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* strain M 71 // Biological Control. –2011. – 10. – P. 1016.
14. Weller D. M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soil-born pathogens: looking back over 30 years // Phytopathology. – 2007. – 97. – P. 250–256.

Отримано 22.10.2012