УДК 579.835: 577.114: 612

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM LIPOFERUM* SP59B НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ИХ ГЛИКОПОЛИМЕРОВ

А. К. Суркина[1], С. А. Коннова[1,2], Ю. П. Федоненко[1,2]

[1]Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов
E-mail: surkina-ak@mail.ru
[2]Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени. Н. Г. Чернышевского
E-mail: konnovasa@yandex.ru

Проведено сравнительное исследование биологической активности гликополимеров бактерий *Azospirillum lipoferum* Sp59b, выращенных при различных условиях культивирования. Впервые показано, что биополимерный и жирнокислотный состав данных гликанов зависят от источников углерода и азота, а также от продолжительности выращивания бактерий. Установлено, что показанные структурные вариации в липидах А липополисахаридов в значительной мере определяют способность данных препаратов стимулировать активность ферментов мышиных макрофагов и продукцию провоспалительных цитокинов клетками цельной крови человека.

Ключевые слова: *Azospirillum lipoferum* Sp59b, гликополимер, условия культивирования, цитокины, миелопероксидаза, NO.

The Influence of Growth Conditions of Bacteria *Azospirillum lipoferum* Sp59b on the Biological Activity of Their Glycopolymers

A. K. Surkina, S. A. Konnova, Yu. P. Fedonenko

It is well known that lipopolysaccharides (LPSs) from outer membranes and capsular polysaccharides of Gram-negative bacteria activate innate immune system of humans and mammals and can produce septic shock clinical signs. A beneficial effect of LPSs consists in moderate stimulation of production of endogenous mediators by immune system cells, thus increasing the resistance of the organism to infections. In this respect the development of non-toxic derivatives of bacterial glycopolymers with improved immunostimulary properties becomes urgent. Therefore, the aim of our research was to evaluate the influence of the growth conditions of bacteria *Azospirillum lipoferum* Sp59b on the biological activity of their glycans. Using the experimental models of mouse macrophages and human whole blood cells (in vitro), we made a comparative study on the immunostimulatory properties of eight glycopolymers of *A. lipoferum* Sp59b grown under different cultivation conditions. For the first time, it has been shown that biopolymer and fatty acid compositions of these glycanes depend on the source of nitrogen and carbon and on the growth phase. It was elucidated that alteration of growth conditions led to significant rearrangements in the lipid A structures of the LPSs and dramatically changed their ability to stimulate mouse macrophage enzymes and synthesis of the main proinflomatory cytokines in human whole blood cells.

Key words: *Azospirillum lipoferum* Sp59b, glycopolymer, growth conditions, cytokines, myeloperoxidase, NO.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-2-177-183

Липополисахариды (ЛПС), или эндотоксины, и капсульные полисахариды (КПС) грамотрицательных бактерий относятся к так называемым патоген-ассоциированным молекулярным паттернам (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) – высоко консервативным структурам, способным запускать механизмы врожденного иммунитета [1]. Эндотоксины стимулируют лейкоциты к синтезу многочисленных факторов воспаления, в том числе интерлейкина-1 бета (ИЛ-1β), фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α), фактора активации тромбоцитов, свободных кислородных радикалов, перекиси водорода и оксида азота [2, 3]. Эти молекулы необходимы для развития острого воспалительного ответа, но, синтезируясь в больших количествах при генерализованной грамотрицательной инфекции, индуцируют повреждение тканей, что в конечном итоге может привести к состоянию септического шока. Благоприятное действие ЛПС выражается в индукции умеренного синтеза эндогенных медиаторов клетками иммунной системы, активации ферментов и повышении сопротивляемости организма к инфекциям. При правильном дозировании данные биополимеры могут быть использованы в качестве эффективных иммуномодуляторов. Однако токсичность и пирогенность ЛПС ограничивает их применение в медицинской практике [4].

Одной из стратегий изменения эндотоксических свойств гликополимера является модификация его химической структуры, которая определяет биологическую активность данной молекулы [5]. Дефосфорилирование и дезацилирование бактериальных гликоконъюгатов методами кислотного и щелочного гидролиза, как правило, приводят к значительному уменьшению их токсичности. Однако при применении этих методов наряду со снижением токсичности молекулы ЛПС наблюдается полная утрата ее биологической активности, в том числе и полезных

© Суркина А. К., Коннова С. А., Федоненко Ю. П., 2017

иммуномодулирующих эффектов [6]. Другим подходом к изменению структуры эндотоксина является его модификация на стадии выращивания бактерий [7]. В работе Sadasivan и Neyra показано, что выращивание почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum lipoferum* Sp59b на среде с фруктозой и азотнокислым калием стимулирует флокуляцию, продукцию внеклеточных полисахаридов и устойчивость клеток к высушиванию [8]. Показано, что условия выращивания азоспирилл существенно влияют и на состав их внеклеточных полисахаридов [9]. Ранее нами установлено, что ЛПС данного штамма обладает низкой токсичностью в отношении теплокровных животных и оказывает умеренный стимулирующий эффект на мононуклеары периферической крови человека [10]. Получение нетоксичных производных гликополимеров *A. lipoferum* Sp59b с улучшенными иммуностимулирующими свойствами – следующий этап нашего исследования. Поэтому целью нашей работы было установление влияния условий выращивания на структуру и биологическую активность гликанов бактерий *A. lipoferum* Sp59b.

Материалы и методы

В работе использован штамм микроорганизмов *A. lipoferum* Sp59b (IBPPM 173), предоставленный Коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (http://collection.ibppm.ru). В качестве препарата сравнения был выбран изученный ранее ЛПС, выделенный из бактерий, выращенных в течение 24 ч на стандартной малатно-солевой среде. Для получения модифицированных производных гликополимеров бактерии культивировали на жидкой синтетической среде в течение 24 и 72 часов с фруктозой в качестве источника углерода и с KNO_3 или NH_4Cl – наиболее часто используемыми источниками азота при выращивании азоспирилл (табл. 1).

Таблица 1

Препараты гликополимеров, используемые в работе

Параметры	Препараты				
	Исходный	Модифицированные			
Источники и соотношение углерода / азота в среде	Малат/NH_4Cl 2/1	Fru/KNO_3 10/1	Fru/KNO_3 10/1	Fru/NH_4Cl 10/1	Fru/NH_4Cl 10/1
Время культивирования, ч	24	24	72	24	72
Условное обозначение препаратов	$ЛПС_{исх}$	$_{24}ЛПС_{KNO3}$ $_{24}ЛПБК_{KNO3}$	$_{72}ЛПС_{KNO3}$ $_{72}ЛПБК_{KNO3}$	$_{24}ЛПС_{NH4Cl}$ $_{24}ЛПБК_{NH4Cl}$	$_{72}ЛПС_{NH4Cl}$ $_{72}ЛПБК_{NH4Cl}$

ЛПС выделяли из внешней мембраны бактерий водно-фенольной экстракцией по методу Вестфаля [11]. С поверхности клеток 0.15М раствором NaCl смывали капсулу, из которой гель-фильтрацией на Sepharose CL-4B получали липополисахарид-белковый комплекс (ЛПБК).

Электрофорез исследуемых препаратов проводили в 12.5% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ). Визуализацию ЛПС осуществляли окрашиванием гелей на углеводы красителем на основе азотнокислого серебра после периодатного окисления.

Полученные препараты анализировали на содержание углеводов, белков и 2-кето-3-дезоксиоктоновой кислоты (КДО) стандартными колориметрическими методами, описанными ранее [12].

Анализ жирных кислот (ЖК), входящих в состав липида А исследуемых биополимеров, проводили методом ГЖХ на хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония) с капиллярной колонкой HP-5. Метилирование проводили по методу, описанному в работе Mayer [13].

Эксперименты по определению биологической активности гликанов *A. lipoferum* Sp59b проведены на самцах нелинейных лабораторных белых мышей в возрасте 2−2.5 месяца, вес 18−20 г. Из организма животных выделяли перитонеальные макрофаги (ПМФ) и спленоциты стандартными методиками. Активность миелопероксидазы (МПО) в лизате ПМФ оценивали спектрофотометрически при 495 нм. Интенсивность продукции NO мышиными спленоцитами определяли методом Грисса по накоплению в инкубационной среде ионов NO_2^- [14]. Концентрация препаратов составила 1 мкг/мл.

Венозную кровь условно здоровых доноров-добровольцев разделяли на аликвоты по 0.5 мл и разводили равным объемом среды 199, содержащей исследуемые препараты в конечной концентрации 0.1 мкг/мл, и инкубировали 24 ч при 37°С. В качестве препарата сравнения был выбран коммерческий ЛПС клинического штамма *E. coli* O55:B5 ($ЛПС_{E.\ coli}$) (Sigma).

Содержание цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1β) в супернатантах определяли иммуноферментным

методом с тест-системами на основе моноклональных антител производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Размер мицелл биополимеров определяли в среде 199 при 37°С на дзета-сайзере (Malvern, Великобритания).

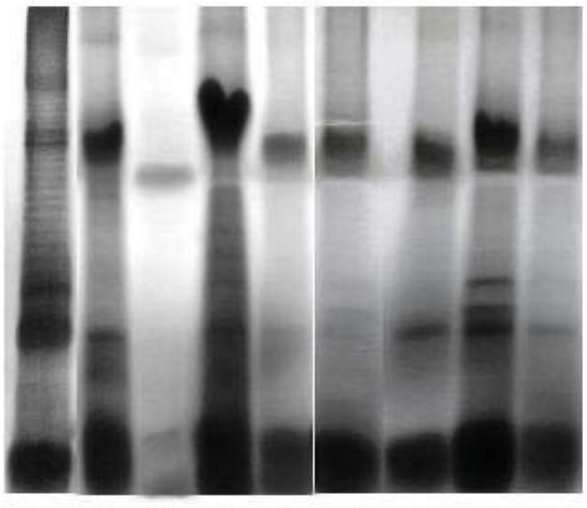
Результаты и их обсуждение

Молекула ЛПС состоит из трех компонентов, отличающихся по структуре и отвечающих за различные биологические свойства молекулы – О-специфического полисахарида (ОПС), олигосахарида кора и липида А.

Уникальная химическая структура эндотоксина опосредует механизм его действия, обеспечивающий возможность взаимодействия гликополимера как с растворимыми компонентами биологических жидкостей, так и с рецепторным аппаратом поверхности различных клеток, что приводит к активации реакций естественной резистентности макроорганизма [1]. Поэтому на первом этапе работы мы исследовали структурные особенности гликополимеров бактерий, выращенных при различных условиях культивирования.

Изучение биополимерного состава выявило присутствие во всех препаратах КДО, неотъемлемой структурной единицы ЛПС. Наличие КДО в исследуемых ЛПБК свидетельствует от том, что данные гликаны представляют собой связанную с белком экстраклеточную форму ЛПС. Содержание фосфора в полученных производных не отличалось от $ЛПС_{исх}$ и составило приблизительно 3%. Увеличение времени выращивания бактерий до 72 ч приводило к накоплению углеводов как в ЛПС, так и в ЛПБК, при этом самое высокое содержание углеводов было отмечено для $_{72}ЛПС_{KNO_3}$ и $_{72}ЛПБК_{KNO_3}$ (~82%). При использовании NH_4Cl в качестве источника азота содержание белка в ЛПБК было в два раза выше (~14%) по сравнению с ЛПБК бактерий, выращенных на среде с KNO_3.

Нативные препараты ЛПС часто проявляют высокую гетерогенность по длине ОПС, что подтверждается данными электрофореза исследуемых препаратов в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, результаты которого представлены на рис. 1. Установлено, что варьирование условий выращивания бактерий приводило к существенным изменениям в соотношении молекулярных фракций гликополимеров. Увеличение времени культивирования до 72 ч в значительной мере снижало гетерогенность ЛПС (см. рис. 1, дорожки *3* и *5*). Кроме того, большая часть молекул $_{72}ЛПС_{KNO_3}$ была сосредоточена в верхней части электрофоретического трека, что указывало на преобладание в данном препарате молекул S-формы, в отличие от остальных гликанов, для которых было характерно приблизительно равное содержание S- и R-форм. Исследуемые ЛПБК характеризовались сходной подвижностью в геле, однако $_{24}ЛПБК_{NH_4Cl}$ (см. рис. 1, дорожка *8*) отличался наличием в середине трека дополнительных интенсивно окрашенных полос.



1 *2* *3* *4* *5* *6* *7* *8* *9*

Рис. 1. Электрофорез в ПААГ препаратов $ЛПС_{исх}$ (*1*), $_{24}ЛПС_{KNO3}$ (*2*), $_{72}ЛПС_{KNO3}$ (*3*), $_{24}ЛПС_{NH4Cl}$ (*4*), $_{72}ЛПС_{NH4Cl}$ (*5*), $_{24}ЛПБК_{KNO3}$ (*6*), $_{72}ЛПБК_{KNO3}$ (*7*), $_{24}ЛПБК_{NH4Cl}$ (*8*), $_{72}ЛПБК_{NH4Cl}$ (*9*). Окрашивание геля на углеводы проводили раствором азотнокислого серебра после периодатного окисления

Методом ГЖХ после метанолиза в составе исследуемых гликанов были идентифицированы предельные, непредельные алкановые и гидроксиалкановые жирные кислоты (ЖК). В модифицированных производных полностью отсутствовали короткоцепочечные додекановая, 2-гидроксидодекановая и 3-гидроксидодекановая ЖК, а основными по содержанию были 3-гидрокситетрадекановая, 3-гидроксигексадекановая и октадеценовая ЖК.

В гликополимерах, выделенных из суточных культур, были идентифицированы небольшие количества нонадекановой кислоты, а в $_{24}ЛПБК_{NH4Cl}$ содержание ее достигало почти 10% (табл. 2).

Показанные вариации в структуре данных препаратов сделали эти биополимеры удобной моделью для изучения их структурно-функциональных свойств.

Таблица 2

Содержание жирных кислот в исследуемых препаратах гликополимеров бактерий *A. lipoferum* Sp59b, % от суммы площадей всех пиков

Препарат	C12:0	2-OH-C12:0	3-OH-C12:0	3-OH-C14:0	C16:0	3-OH-C16:0	C18:1	C19:0
$ЛПС_{исх}$	15.5±1.7	12.8±1.2	39.7±2.1	15.3±2.5	13.6±1.6		4.5±1.3	
$_{24}ЛПС_{KNO3}$				58.7±2.1	8.3±1.8	19.5±0.6	12.0±0.1	3.8±0.2
$_{72}ЛПС_{KNO3}$				57.6±2.5	10.8±0.8	25.6±1.3	6.0±0.2	
$_{24}ЛПС_{NH4Cl}$				50.2±4.9	10.6±1.0	21.6±1.9	19.0±0.1	4.9±1.1
$_{72}ЛПС_{NH4Cl}$				53.4±0.2	10.4±0.3	17.2±1.2	18.0±1.0	
$_{24}ЛПБК_{KNO3}$				38.1±0.6	15.4±1.2	16.6±1.6	23.6±0.2	5.2±0.8
$_{72}ЛПБК_{KNO3}$				44.6±1.4	16.1±0.3	20.3±0.9	19.0±1.1	
$_{24}ЛПБК_{NH4Cl}$				36.4±1.5	8.1±0.9	17.6±0.3	28.4±1.3	9.5±1.1
$_{72}ЛПБК_{NH4Cl}$				37.5±1.8	18.0±0.5	17.8±0.1	26.9±1.3	

Учитывая ведущую роль макрофагов в активации защитных реакций и поддержания гомеостаза, мы оценивали продукцию NO, МПО мышиными фагоцитами в присутствии исследуемых биополимеров. МПО является одним из ведущих ферментов кислородзависимого аппарата макрофагов и разрушает токсическую перекись водорода, образующуюся внутриклеточно в процессе жизнедеятельности клеток [15]. В результате проведенных экспериментов показано, что гликополимеры, выделенные из бактерий *A. lipoferum* Sp59b, выращенных на модифицированных средах, не оказывали выраженного влияния на активность фермента. Исключение составил $_{24}ЛПС_{KNO3}$, чей стимулирующий эффект был идентичен $ЛПС_{исх}$. Добавление данных препаратов в концентрации 1 мкг/мл в среду инкубации ПМФ приводило к увеличению активности МПО на 20% по сравнению с контролем.

В настоящее время показана важность исследования еще одного метаболита активированных клеток – оксида азота [16]. Установлено, что модифицированные биополимеры оказывали умеренный стимулирующий эффект на индуцибельную NO-синтазу мышиных спленоцитов (табл. 3). Как и в эксперименте с ПМФ только $_{72}ЛПС_{KNO3}$ проявлял идентичную с $ЛПС_{исх}$ индуцирующую активность, при этом продукция NO в среде культивирования в присутствии данных гликанов возрастала в 2 раза по сравнению с контролем.

При добавлении в культуру спленоцитов остальных модифицированных гликополимеров опытные значения достоверно увеличивались в среднем в 1.3–1.5 раза, за исключением $_{72}ЛПС_{NH4Cl}$, который не оказывал выраженного действия на активность фермента.

Таблица 3

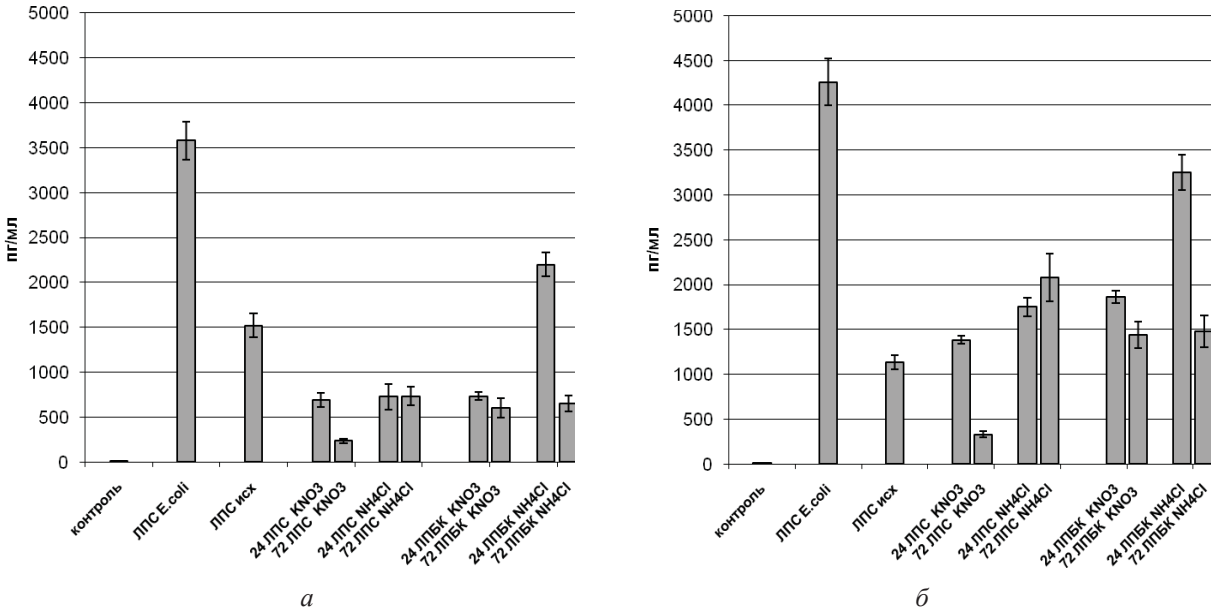
Индукция синтеза NO в мышиных спленоцитах под влиянием исследуемых гликанов, мкМ

Препарат	Содержание NO, мкМ
Контроль	11.2±0.5
$ЛПС_{исх}$	20.4±1.3
$_{24}ЛПС_{KNO3}$	16.5±0.0
$_{72}ЛПС_{KNO3}$	20.3±1.3
$_{24}ЛПС_{NH4Cl}$	15.0±0.1
$_{72}ЛПС_{NH4Cl}$	11.2±0.0
$_{24}ЛПБК_{KNO3}$	17.5±0.0
$_{72}ЛПБК_{KNO3}$	16.7±0.0
$_{24}ЛПБК_{NH4Cl}$	14.6±0.0
$_{72}ЛПБК_{NH4Cl}$	16.7±0.0

Учитывая, что цитокины являются универсальными медиаторами клеточного ответа на бактериальные ЛПС, оценивали влияние исследуемых препаратов на индукцию основных провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО-α клетками цельной крови человека (*in vitro*). Показано, что модифицированные производные оказывали схожее влияние на синтез ФНО-α: присутствие их в среде инкубирования увеличивало содержание цитокина до 600−700 пг/мл против 1500 пг/мл, показанных для $ЛПС_{исх}$ (рис. 2, *а*). Исключение составил $_{24}ЛПБК_{NH4Cl,}$, стимулирующий эффект которого был выше $ЛПС_{исх}$. Тем не менее цитокининдуцирующая активность данного препарата была ниже в ~1.5 раза в сравнении с действием $ЛПС_{E.\ coli}$ (3600 пг/мл).

Показано, что среди всех исследуемых гликанов $_{72}$ЛПС$_{KNO3}$ оказался самым слабым индуктором клеток цельной крови человека (230 пг/мл).

В отличие от ЛПС$_{исх}$, модифицированные гликополимеры в большей степени стимулировали синтез ИЛ-1β, чем ФНО-α (см. рис. 2, *б*). При этом $_{24}$ЛПБК$_{NH4Cl}$ обладал еще большей активностью, чем в тесте по определению ФНО-α. В присутствии данного гликана концентрация ИЛ-1β в супернатанте достигала 3250 пг/мл, что можно считать значительным стимулирующим эффектом, учитывая, что ЛПС$_{E. coli}$ индуцировал синтез цитокина до 4260 пг/мл. Как и в предыдущем эксперименте $_{72}$ЛПС$_{KNO3}$ обладал самой слабой цитокинстимулирующей активностью (330 пг/мл). При этом, как было сказано выше, данный биополимер, как и ЛПС$_{исх}$, являлся активным индуктором мышиных лейкоцитов.



а *б*

Рис. 2. Влияние исследуемых биополимеров на синтез ФНО-α (*а*) и ИЛ-1β (*б*) клетками цельной крови человека

На сегодняшний день не вызывает сомнения, что именно липид А является эндотоксическим центром молекулы ЛПС, и за проявляемую гликополимером биологическую активность отвечает преимущественно данная компонента. Любое отклонение в сторону увеличения или уменьшения длины цепей ЖК, а также степени ацилирования липидного домена ЛПС приводит к значительному изменению его эндотоксических свойств [3–5]. Согласно данным ГЖХ, среди всех исследованных производных только в $_{72}$ЛПС$_{KNO3}$ обнаружено идентичное с ЛПС$_{исх}$ содержание октадеценовой (~5.5%) ЖК. Вероятно, количество данной ЖК в гликополимерах, выращенных на фруктозе, является критическим для проявления их способности активировать МПО и NO-синтазу. Кроме того, результаты ПААГ электрофореза и значительное содержание углеводов в $_{72}$ЛПС$_{KNO3}$ указывают на преобладание в нем молекул S-формы с длинными ОПС. Присутствие длинной цепи ОПС в составе ЛПС может приводить к незначительному снижению суммарного отрицательного заряда и изменению специфической конформации молекулы биополимера и, как следствие, к изменению его эндотоксических свойств [16]. В связи с этим был проведен эксперимент по определению размера мицелл ЛПС$_{исх}$, $_{24}$ЛПС$_{KNO3}$, $_{72}$ЛПС$_{KNO3}$, $_{24}$ЛПБК$_{NH4Cl}$ и $_{72}$ЛПБК$_{NH4Cl}$. Как видно на рис. 3, $_{72}$ЛПС$_{KNO3}$ формировал значительно более компактные агрегаты (20–250 нм), по сравнению с ЛПС$_{исх}$, размеры мицелл которого находились в диапазоне от 100 до 1000 нм. Данный факт подтверждает наличие различий в конформации молекулы $_{72}$ЛПС$_{KNO3}$, что, возможно, послужило причиной его сниженной цитокинстимулирующей активности.

Примечательно, что распределение интенсивности по размеру конгломератов $_{24}$ЛПС$_{KNO3}$, $_{72}$ЛПБК$_{NH4Cl}$ и $_{24}$ЛПБК$_{NH4Cl}$ полностью совпадало. Тем не менее способность индуцировать

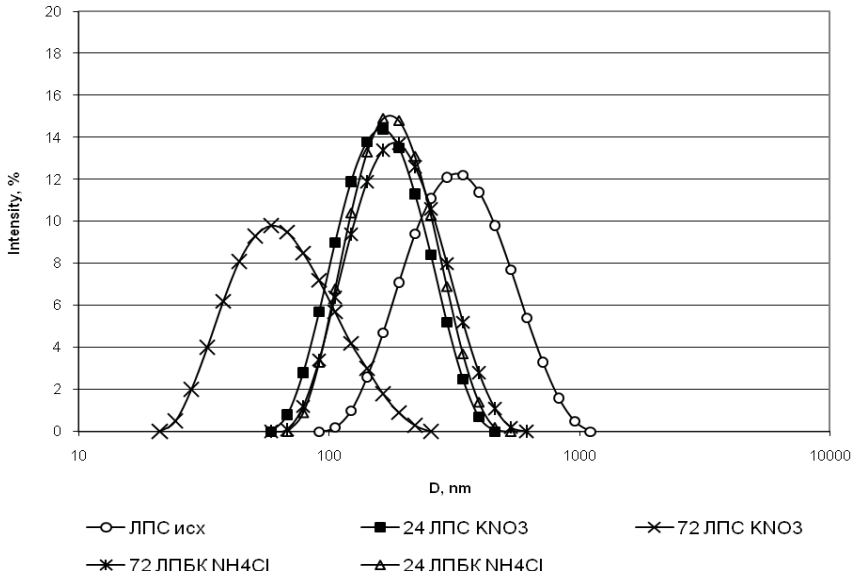


Рис. 3. Распределения интенсивности сигнала по размеру агрегатов $ЛПС_{исх}$, $_{24}ЛПС_{KNO3}$, $_{72}ЛПС_{KNO3}$, $_{24}ЛПБК_{NH4Cl}$ и $_{72}ЛПБК_{NH4Cl}$

синтез цитокинов у первых двух препаратов была абсолютно идентична, а $_{24}ЛПБК_{NH4Cl}$ был активнее более, чем в 2 раза. Из чего можно сделать вывод, что для данных гликанов конформация не является решающей в проявлении эндотоксических свойств. $_{24}ЛПБК_{NH4Cl}$ отличался большим содержанием нонадекановой кислоты (10%), а также присутствием характерных только для данного препарата полос на электрофореграмме. Возможно, эти особенности строения послужили структурным базисом для проявления гликополимером характерной для него биологической активности.

Таким образом, полученные в ходе выполнения данной работы результаты свидетельствуют о том, что условия выращивания бактерий *A. lipoferum* Sp59b в значительной мере определяют состав и строение их гликополимеров. Смена источника углерода с малата на фруктозу, а также изменение соотношения C/N приводили к значительному смещению профиля ЖК в липидах А в сторону увеличения длины углеродной цепи. Показано, что источник азота в среде оказывает влияние на количество белка и углеводов в ЛПБК и ЛПС. Увеличение времени выращивания микроорганизмов способствовало повышению содержания углеводной компоненты в гликополимерах, снижению их микрогетерогенности, а также приводило к утрате нонадекановой ЖК в составе липида А [17].

Установлено, что содержание нонадекановой и октадеценовой жирных кислот в составе гликополимеров бактерий *A. lipoferum* Sp59b вносит существенный вклад в реализацию их стимулирующего потенциала в отношении иммунокомпетентных клеток человека и животных.

Указанные манипуляции с условиями выращивания бактерий позволили получить нам препараты биополимеров, чья биологическая активность была отлична не только от стандартного ЛПС, но и варьировалась в пределах всего ряда.

Список литературы

1. *Holst O., Ulmer A., Brade H., Flad H. D., Rietschel E. T.* Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins // EMS Immunol. Med. Microbiol. 1996. Vol. 16. P. 83–104.
2. *Moresco E., LaVine D., Beutler B.* Toll-like receptors // Curr. Biol. 2011. Vol. 21, №13. P. 488–493.
3. *Heumann D., Roger T.* Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria // Clin. Chim. Acta. 2002. Vol. 323. P. 59–72.
4. *Alexander C., Rietschel E.* Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity // J. Endotoxin. 2001. Vol. 7, № 3. P. 167–202.
5. *Rietschel E., Kirikae T., Schade F., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A., Zähringer U., Seydel U., Di Padova F., Schreier M., Brade H*. Bacterial endotoxin : molecular relationships of structure to activity and function // FASEB J. 1994. Vol. 8. P. 217–225.
6. *Slocum C., Coats S. R., Hua N., Kramer C., Papadopoulos G., Weinberg E. O., Gudino C. V., Hamilton J. A., Darveau R. P., Genco C.A*. Distinct lipid A moieties contribute to pathogen-induced site-specific vascular inflammation // PLoS Pathog. 2014. Vol. 10. e1004215.
7. *Суркина А. К., Бойко А. С.* Характеристика липополисахаридов бактерий *Azospirillum brasilense* 54, выращенных на средах с разными источниками

азота // Симбиоз-Россия 2010 : III Всерос. с междунар. участием конгресс студентов и аспирантов-биологов (Н. Новгород, 24–28 мая 2010 г.). Н. Новгород, 2010. С. 76.

8. *Sadasivan L., Neyra C. A.* Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* : exopolysaccharides and cyst formation // J. Bacteriol. 1985. Vol. 163, № 2. P. 716–723.
9. *Коннова С. А., Федоненко Ю. П., Макаров О. Е., Игнатов В. В.* Исследование влияния условий выращивания бактерий *Azospirillum brasilense* на состав внеклеточных полисахаридсодержащих материалов // Изв. Рос. академии наук. Сер. Биологическая. 2003. № 4. С. 430–437.
10. *Суркина А. К., Коннова С. А., Федоненко Ю. П., Игнатов В. В.* Гликополимеры бактерий рода *Azospirillum* как перспективные антагонисты классических эндотоксинов // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 2. С. 78–85.
11. *Вестфаль О., Янн К.* Бактериальные липополисахариды // Методы химии углеводов / под ред. Н. К. Кочеткова. М. : Мир, 1967. С. 325–332.
12. *Konnova S. A., Makarov O. E., Skvortsov I. M., Ignatov V. V.* Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interactions // FEMS Microbiol. Lett. 1994. Vol. 118. P. 93–100.
13. *Mayer H., Tharanathan R., Weckesser J.* Analysis of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria // Meth. Microbiol. 1985. Vol.18. P. 157–207.
14. Иммунология. Практикум : учеб. пособие / под ред. Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатьевой, Л. В. Ганковской. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. 176 с.
15. *Huang J., Milton A., Arnold R.D., Huang H., Smith F., Panizzi J. R., Panizzi P.* Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems // J. Leukoc Biol. 2016. Vol. 99, № 4. P. 541–548.
16. *Wu C. H., Chen T. L., Chen T. G., Ho W. P., Chiu W. T., Chen R. M.* Nitric oxide modulates pro- and anti-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-activated macrophages // J. Trauma. 2003. Vol. 55, № 3. P. 540–545.
17. *Кабанов Д. С., Прохоренко И. Р.* Связь между физико-химическими характеристиками и биологической активностью липополисахаридов // Биологические мембраны. 2011. Т. 28, № 5. С. 323–338.

Образец для цитирования:

Суркина А. К., Коннова С. А., Федоненко Ю. П. Влияние условий выращивания бактерий *Azospirillum lipoferum* Sp59b на биологическую активность их гликополимеров // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 2. С. 177–183. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-2-177-183.

Cite this article as:

Surkina A. K., Konnova S. A., Fedonenko Yu. P. The Influence of Growth Conditions of Bacteria *Azospirillum lipoferum* Sp59b on the Biological Activity of Their Glycopolymers. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 2, pp. 177–183 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-2-177-183.