



УДК 579.234

## ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM HALOPRAEFERENS* Au4

Е. Н. Сигида<sup>1</sup>, Ю. П. Федоненко<sup>1</sup>, М. П. Чернышова<sup>1</sup>,  
В. С. Гринёв<sup>1</sup>, С. А. Коннова<sup>1,2</sup>, В. В. Игнатов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

<sup>2</sup>Саратовский государственный университет

E-mail: room308@ibppm.sgu.ru



Проведено исследование состава липополисахарида почвенных галотолерантных бактерий *Azospirillum halopraeferens* Au4. Выявлена более высокая электрофоретическая подвижность S-форм ЛПС *A. halopraeferens* Au4 в полиакриламидном геле, по сравнению с типовым штаммом *A. brasilense* Sp7. Установлено, что состав ЖК ЛПС штамма Au4 незначительно отличался от ЛПС большинства изученных штаммов *A. brasilense* и *A. lipoferum*. В коровой области ЛПС отмечено преобладание глюкозы. С использованием методов иммунохимии и структурного анализа показано, что ОПС *A. halopraeferens* Au4 характеризуется уникальной структурой повторяющихся звеньев, не встречавшейся ранее у других штаммов азоспирилл. В составе ОПС обнаружены метилированная 6-дезоксигексоза, L-рамноза, D-фукоза, D-ксилоза и D-глюкоза.

**Ключевые слова:** *Azospirillum*, липополисахарид, выделение, структура.

### Characterization of the Composition of the Lipopolysaccharide from Halotolerant Bacteria *Azospirillum halopraeferens* Au4

E. N. Sigida, Yu. P. Fedonenko, M. P. Chernyshova,  
V. S. Grinev, S. A. Konnova, V. V. Ignatov

The composition of the lipopolysaccharide of soil halotolerant bacteria *Azospirillum halopraeferens* Au4 was studied. S-LPS of *A. halopraeferens* Au4 demonstrated higher electrophoretic mobility compared to the type strain *A. brasilense* Sp7. Fatty acid composition of the LPS did not significantly differ from that of LPS of most studied strains of *A. brasilense* and *A. lipoferum*. Glucose was shown to be the predominate sugar of the core region of the LPS. Serological and structural studies of the LPS of *A. halopraeferens* Au4 revealed the presence of the structurally unique repeating units in their OPS that had never been found previously in the OPS of other *Azospirillum* sp. strains. The OPS was found to contain methylated 6-deoxyhexose, L-rhamnose, D-fucose D-xylose and D-glucose.

**Key words:** *Azospirillum*, lipopolysaccharide, isolation, structure.

Неотъемлемой составляющей почвенных экосистем являются обитающие в прикорневой зоне растений микроорганизмы. Среди многообразия заселяющих ризосферу видов особый интерес представляют бактерии, способные образовывать взаимовыгодные ассоциации с растениями. Обоюдная польза этих ассоциаций обусловлена тем, что корневые экссудаты растений являются источниками углерода и энергии

для бактерий, которые, в свою очередь, синтезируют фитогормоны и антибиотики, способствуют солибилизации соединений фосфора, железа и других минеральных веществ [1, 2].

Типичными представителями ризосферной микрофлоры являются  $\alpha$ -протеобактерии рода *Azospirillum*. К настоящему моменту род *Azospirillum* насчитывает 18 видов, большинство из которых были выделены из ризосферы и ризопланы различных злаков, однако физиологические аспекты взаимодействия этих бактерий с растениями изучены в основном на примере трех видов – *A. brasilense*, *A. lipoferum* и *A. irakense*. Показано, что в растительно-микробных взаимодействиях с участием азоспирилл важная роль принадлежит углеводсодержащим гликополимерам поверхности этих бактерий, участвующих в начальных стадиях формирования ассоциаций [3, 4]. Среди них особое место занимают липополисахариды (ЛПС), которые формируют внешний слой наружной мембраны и поступают в бактериальное микроокружение в составе липополисахарид-белковых и полисахарид-липидных комплексов [5]. Известно об участии поверхностных гликополимеров в преодолении азоспириллами неблагоприятных факторов внешней среды – высокой и низкой температуры, экстремальных значений pH, снижения влажности [6]. Кроме того, показана способность некоторых штаммов азоспирилл к использованию собственных ЛПС в качестве единственного источника углерода в среде [7, 8].

Молекула ЛПС является гликолипидом, который включает гидрофобный домен липид А, погруженный в мембрану остатками жирных кислот (ЖК), и гидрофильный домен, экспонированный в окружающую среду и состоящий из гетероолигосахарида кора и O-специфического полисахарида (ОПС), построенного из повторяющихся звеньев. Биосинтез липидной и полисахаридной составляющих ЛПС происходит независимо друг от друга, поэтому в мембранном пуле одновременно могут содер-



жаться как S-формы ЛПС, включающие все вышеперечисленные компоненты, так и R-формы, лишенные ОПС. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что азоспириллы продуцируют преимущественно S-формы ЛПС, разнообразные по структуре ОПС [9–11].

Бактерии *A. halopraeferens*, в отличие от представителей других видов этого рода, являются галотолерантными и были выделены из ризопланы злака *Leptochloa fusca* L., используемого для восстановления непригодных для сельского хозяйства солончаковых почв в Пакистане [12]. Известно, что в условиях абиотического стресса, в том числе солевого загрязнения, когда происходит лимитирование роста растений, почвенные бактерии также способны комплексно воздействовать на физиологические аспекты их жизнедеятельности, изменяя фитогормональный статус, поддерживая ионный гомеостаз и улучшая минеральное питание [13, 14].

Актуальность исследования гликополимеров этих бактерий обусловлена отсутствием литературных данных об их составе и структуре, необходимых для выяснения молекулярных механизмов коммуникаций, происходящих в ризосфере между микроорганизмами и растениями, с перспективой повышения эффективности биоремедиации неплодородных почв.

#### Материалы и методы

Использованный в работе бактериальный штамм *A. halopraeferens* Au4 был предоставлен коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов). Для выращивания бактерий использовали жидкую малатно-солевую среду с витаминами [5], содержащую 5 г/л NaCl. Бактерии культивировали до окончания экспоненциальной фазы роста при температуре 41 °С, перемешивая на вибростенде. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 0.15 М растворе NaCl и смывали с поверхности капсульный материал механическим перемешиванием в течение 5 сут со сменой отмывающего раствора каждые 12 ч.

ЛПС выделяли из высушенных ацетоном бескапсульных клеток горячим 45% водным раствором фенола без разделения слоев [15]. Примеси белков осаждали из раствора ЛПС добавлением 40%  $\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$  до конечного значения pH 2.7.

Деградиацию ЛПС проводили 2%  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  при 100 °С в течение 4–5 ч. Образовавшийся осадок липида А отделяли центрифугированием. Водорастворимую фракцию разделяли гель-хроматографией на колонке с Sephadex G-50

в 0.05 М пиридин-ацетатном буфере (pH 4.5), контролируя элюцию с помощью дифференциального проточного рефрактометра Кнауер (Германия).

О-дезацелирование ЛПС проводили в 12% растворе  $\text{NH}_4\text{OH}$  при температуре 37 °С в течение 16 ч. Модифицированный ЛПС выделяли колоночной хроматографией с носителем TSK HW-40 («Toyosoda», Япония), в качестве элюента использовали 1%  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ .

Денатурирующий электрофорез с додецилсульфатом натрия выполняли в 15% полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) [16]. Визуализацию углеводсодержащих компонентов осуществляли окрашиванием гелей красителем на основе нитрата серебра [17]. Колориметрическое определение содержания в препаратах ЛПС углеводов, КДО и фосфора проводили известными методами, описанными нами ранее [5]. Измерения выполняли на Specord 40 («Analytik Jena AG», Германия).

В иммунохимических исследованиях использовали полученные ранее антитела (Ат) к О-антигенам азоспирилл. Иммуноферментный анализ (ИФА) выполняли в полистирольных 96-луночных планшетах («Медполимер», Россия). Для визуализации взаимодействия антигенов и первичных антител использовали козьи антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Sigma»). В качестве субстратного реагента использовали перекись водорода с *o*-фенилендиамином. Измерения оптического поглощения исследуемых проб проводили на иммуноферментном анализаторе Multiscan Ascent («Thermo scientific», Финляндия) при  $\lambda = 492$  нм.

Состав жирных кислот (ЖК) ЛПС в виде метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) определяли с помощью ГЖХ на хроматографе GC-2010 («Shimadzu», Япония), снабженном капиллярной колонкой DB-5 («Agilent», США). Метилирование выполняли методом, описанным в работе [18]. Анализ моносахаридного состава и установление абсолютных конфигураций нейтральных сахаров проводили методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов [19] и ацетилированных гликозидов с оптически активным спиртом (R)-2-октанолом [20] соответственно.

Спектры ЯМР записывали на спектрометре DRX-500 («Bruker», Германия) в растворе 99.96%-ной  $\text{D}_2\text{O}$  при 30 °С (внутренний стандарт – ацетон,  $\delta_{\text{C}}$  31.45 и 3-триметилсилилпропаноат- $d_4$ ,  $\delta_{\text{H}}$  0.0. Образцы предварительно лиофилизовали дважды из 99.9%-ной  $\text{D}_2\text{O}$ .



### Результаты и их обсуждение

Выделенный водно-фенольной экстракцией из сухих бескапсульных клеток препарат ЛПС *A. halopraeferens* Au4 содержал все характерные для этих молекул компоненты: углеводы (67.4±3.6%), в том числе КДО (1.3±0.2%), фосфор (1.9±0.1%) и 3-гидроксиалкановые кислоты.

Результаты электрофореза в ДСН-ПААГ препарата ЛПС с последующей визуализацией углеводов содержащих компонентов свидетельствовали о его гетерогенности по молекулярной массе, обусловленной присутствием как S-, так и R-форм ЛПС (рис. 1). По сравнению с данными электрофореза для ЛПС других штаммов азоспирилл (к примеру, типового штамма *A. brasilense* Sp7), S-формы ЛПС Au4 обладали большей электрофоретической подвижностью

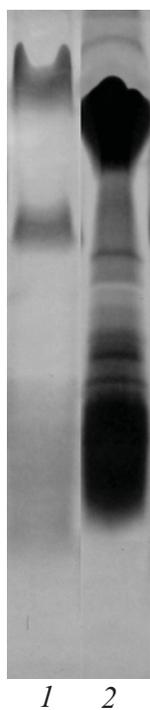


Рис. 1. Результат ДСН-ПААГ электрофореза ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp7 и *A. halopraeferens* Au4

в ПААГ. Наблюдаемое явление может быть вызвано структурными особенностями этого препарата, а именно, меньшим количеством повторяющихся звеньев в ОПС либо большим значением эффективного отрицательного заряда молекулы.

Исследование структуры ЛПС осложняется амфифильностью этих соединений, обуславливающей их способность образовывать мицеллы в растворах. В связи с этим для установления полного строения ЛПС проводят структурный анализ каждого из компонентов ЛПС в отдельности. Мягкий кислотный гидролиз ЛПС, приводящий к разрушению кислотолабильной молекулы КДО, соединяющей липид А с олигосахаридом кора, позволил получить все составляющие компоненты ЛПС. Осадок липида А был отделен центрифугированием, а растворимые в воде ОПС и олигосахарид кора были фракционированы с помощью гель-проникающей хроматографии (рис. 2). Выходы полученных фракций приведены в табл. 1.

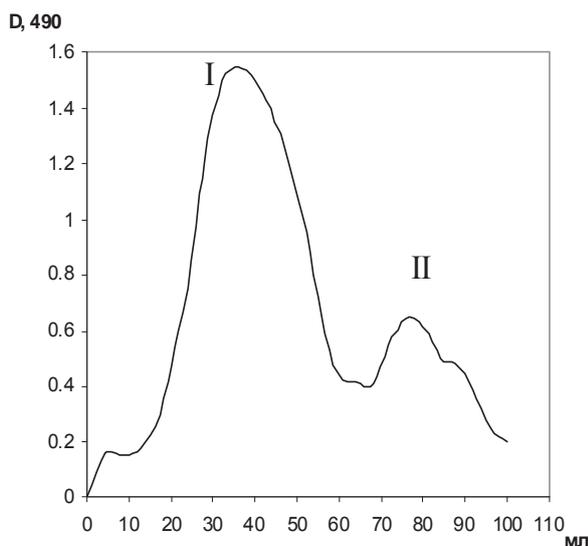


Рис. 2. Профиль элюции на Sephadex G-50 деградированного ЛПС *A. halopraeferens* Au4: I – O-специфический полисахарид; II – коровый олигосахарид

Таблица 1

Состав моносахаридов ОПС и олигосахарира кора *A. halopraeferens* Au4

Препарат	Выход, % от массы ЛПС	Моносахариды, % от суммы площадей пиков идентифицированных ацетатов полиолов								
		6dHex2OMe	Rha	Fuc	Xyl	Glc	Man	GlcNAc	ManNAc	Hep
ОПС	44	9	18	26	21	21	—	—	—	—
Коровый ОС	11	—	9	6	7	48	15	5	3	7

Примечание. «—» – содержание компонента менее 3%.



Наличие отрицательно заряженных группировок, ориентация и распределение жирных кислот липида А обуславливает биологические свойства ЛПС. Известно, что *A. lipoferum* и *A. irakense* продуцируют нетоксичные или слаботоксичные ЛПС, проявляющие антагонистические по отношению к классическим эндотоксинам свойства [21, 22]. Анализ состава ЖК препарата ЛПС *A. halopraeferens* Au4 не выявил значительных качественных отличий от ЛПС различных штаммов *A. brasilense* и *A. lipoferum* [23]. По данным ГЖХ МЭЖК, преобладающи-

ми кислотами являлись 3-гидрокситетрадекановая (3-ОН-С<sub>14:0</sub>), 3-гидроксигексадекановая (3-ОН-С<sub>16:0</sub>) и октадеценная (С<sub>18:1</sub>), доля которых составляла более 85% от суммы идентифицированных кислот (рис. 3, а, табл. 2). В минорных количествах также были обнаружены гексадекановая (С<sub>16:0</sub>) и нонадекановая кислоты (С<sub>19:0</sub>). Для ЛПС *A. halopraeferens* Au4, так же, как и для других видов азоспирилл, было выявлено высокое содержание (~40%) непредельной кислоты С<sub>18:1</sub>, редко встречающейся в составе липида А других бактерий.

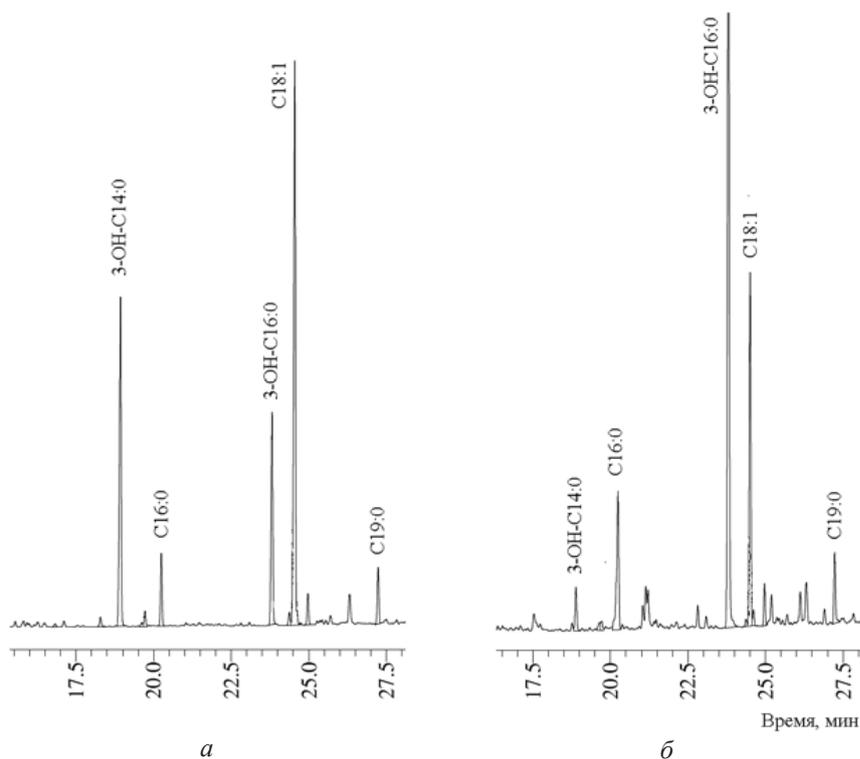


Рис. 3. Хроматограмма ГЖХ МЭЖК препаратов ЛПС (а) и О-деацелированного ЛПС\* (б) *A. halopraeferens* Au4

Таблица 2

Состав ЖК нативного ЛПС и О-деацелированного ЛПС\* *A. halopraeferens* Au4 (% от суммы площадей пиков МЭЖК ЛПС)

Препарат	ЖК				
	3-ОН-С <sub>14:0</sub>	С <sub>16:1</sub>	3-ОН-С <sub>16:0</sub>	С <sub>18:1</sub>	С <sub>19:0</sub>
ЛПС	35.3	1.3	14.0	39.5	4.8
ЛПС*	3.3	0.5	54.9	25.4	5.0

О-деацелирование липида А является одним из этапов при установлении его структуры, позволяющим определить, какие из жирных кислот в его составе являются амидосвязанными. В процессе О-деацелирования происходит

гидролиз сложноэфирной связи и отщепление жирных кислот, этерифицирующих глюкозамин или гидроксикислоты, при этом амидосвязанные кислоты остаются незатронутыми. Гидролиз ЛПС в мягких щелочных условиях позволил



получить О-деацилированный препарат (ЛПС\*), отличающийся от исходного ЛПС возрастом доли 3-ОН-С<sub>16:0</sub> и снижением доли 3-ОН-С<sub>14:0</sub> (см. рис. 3, б, табл. 1). Эти данные свидетельствовали о том, что 3-ОН-С<sub>16:0</sub> является N-связанной, а 3-ОН-С<sub>14:0</sub> – O-связанной. Информация о характере связей маркерных жирных кислот в ЛПС *A. halopraeferens* Au4 согласуется с данными о структуре липида *A. lipoferum* SpBr17, для которого было установлено, что первичная 3-ОН-С<sub>16:0</sub> кислота присоединена амидной связью, первичная 3-ОН-С<sub>14:0</sub> – эфирной, а гексадекановая и октадеценная кислоты являются вторичными [24]. Наличие общих структурных особенностей гидрофобной части ЛПС у штаммов различных видов бактерий рода *Azospirillum* может свидетельствовать о консервативном характере строения их липида А.

Известно о том, что строение полисахаридной части ЛПС ассоциативных и симбиотических бактерий оказывает влияние на процесс колонизации поверхности клеток хозяина [25]. Ранее на основании анализа структур O-специфических полисахаридов и иммунохимических тестов была разработана схема серотипирования азоспирилл [10, 11, 26]. ИФА с использованием Ат

к ЛПС азоспирилл различных серогрупп выявил только для некоторых из них слабое взаимодействие с ЛПС *A. halopraeferens* Au4, (данные не приведены), что могло свидетельствовать о наличии в его ОПС структурно отличных от других видов азоспирилл полисахаридных цепей.

Моносахаридный состав ОПС и корового олигосахариды, определенный ГЖХ ацетатов полиолов, был различным (рис. 4, см. табл. 1). В составе ОПС 2-Ме-6-дезоксигексоза (2-Ме-6dHex), рамноза (Rha), фукоза (Fuc), ксилоза (Xyl) и глюкоза (Glc) были обнаружены в приблизительно равных количествах. В олигосахариде кора преобладающим сахаром являлась Glc, а количества Rha, Fuc и Xyl были приблизительно равными (возможно, из продукта, образовавшегося после деградации молекул SR- формы ЛПС, т.е. молекул, содержащих одно звено O-цепи). Кроме того, в составе корового ОС были идентифицированы манноза (Man), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и гептоза (Hep). 2-Ме-6dHex в коровом ОС отсутствовала, помимо этого на хроматограмме наблюдался пик неидентифицированного моносахарида, время удерживания которого было близко к таковому для Fuc.

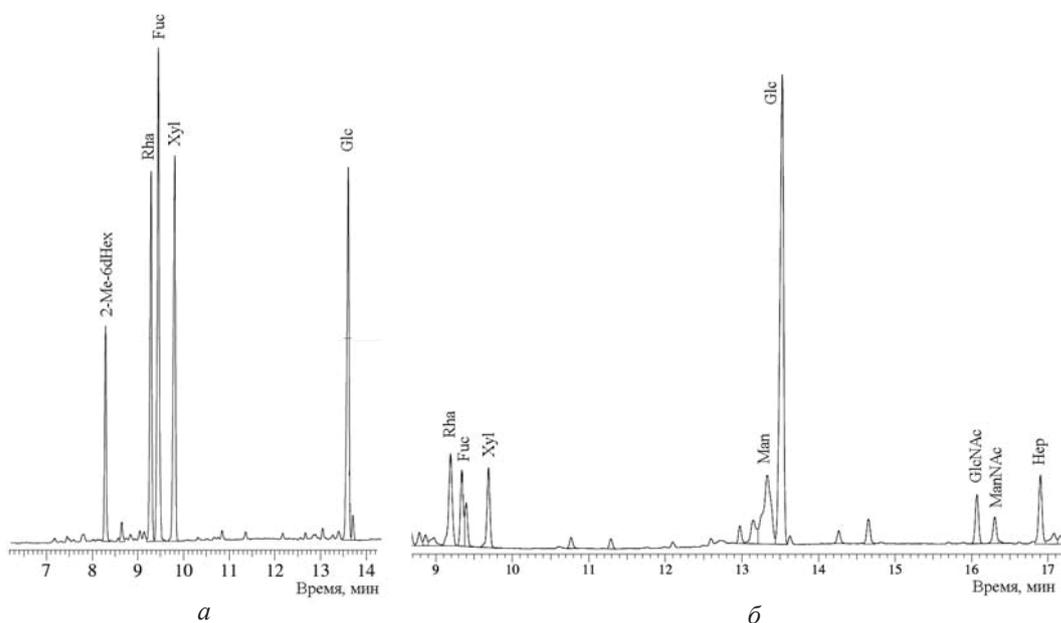


Рис. 4. Хроматограмма ГЖХ ацетатов полиолов, полученных после гидролиза ОПС *A. halopraeferens* Au4 (а) и олигосахариды кора (б)

Определение абсолютных конфигураций моносахаридов, входящих в состав ОПС, выявило L-конфигурацию Rha и D-конфигурацию Fuc, Xyl и Glc.

В результате анализа основной серии сигналов ГЖХ-МС частично метилированных ацета-

тов полиолов было установлено наличие в ОПС 3,4-дизамещенной 6-дезоксигексапиранозы, терминальной глюкозы и производного, соответствующего 2-замещенной ксилопиранозе или 4-замещенной ксилопиранозе. В минорной серии присутствовали 2-замещенная 6-дезоксигексапи-



раноза, 3-замещенная 6-дезоксигексапираноза и 3-замещенная-2-ОМе-6-дезоксигексапираноза. Таким образом, исследуемый ОПС является разветвленным с терминальной глюкозой и 3,4-дизамещенной 6-дезоксипиранозой в точке ветвления.

<sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР спектры содержали сигналы разной интенсивности, что свидетельствовало о структурной гетерогенности ОПС. В связи с наличием нескольких серий сигналов в спектрах ЯМР их отнесение на данном этапе работы произвести не удалось ввиду их перекрывания. Гетерогенность ОПС может быть вызвана как нерегулярным строением полисахаридной цепи, в том числе чередованием достаточно длинных фрагментов, так и нестехиометрическим метилированием остатка 6-дезоксигексозы.

Известно, что наличие нестехиометрических заместителей значительно влияет на серологические свойства ОПС, создавая новые или маскируя существующие антигенные детерминанты. Такие заместители довольно часто встречаются в составе ОПС патогенных и ассоциативных бактерий. Для бактерий рода *Rhizobium* при культивировании в условиях симбиоза показано увеличение доли ацетилированных и метилированных полисахаридов, повышающее липофильные свойства ЛПС [27].

На основании имеющихся в литературе данных о структурах ОПС азоспирилл можно утверждать, что повторяющиеся звенья штамма *A. halopraeferens* Au4 отличаются от таковых азоспирилл других видов. L-Rha, присутствующая в ОПС *A. halopraeferens* Au4, была обнаружена в октасахаридном повторяющемся звене ОПС *A. brasilense* SR55 [8], а тетрасахаридные повторяющиеся звенья, состоящие из L-Rha в основной цепи и терминальной D-Glc, формируют ОПС азоспирилл, отнесенных к серогруппе III [11]. D-Fuc ранее не встречалась в составе ОПС азоспирилл, а L-Fuc и D-Xyl были обнаружены в ОПС *A. brasilense* SR80, Sp7 и Jm6B2 [28–30].

Таким образом, было установлено, что ЛПС *A. halopraeferens* Au4 незначительно отличается по составу липида А, но характеризуется большей, по сравнению с ЛПС других видов азоспирилл, электрофоретической подвижностью в ДСН-ПААГ и имеет уникальную структуру ОПС, не обнаруженную ранее в составе ЛПС других штаммов азоспирилл. Учитывая, что ОПС является наиболее варибельным фрагментом ЛПС, можно предположить, что его строение является результатом адаптации бактерий

к существованию в уникальной экологической нише – в засоленных почвах.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-01658).*

#### Список литературы

1. *Bhattacharyya P. N., Jha D. K.* Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) : emergence in agriculture // *World J. Microb. Biot.* 2012. Vol. 28. P. 1327–1350.
2. *Lugtenberg B., Kamilova F.* Plant-growth-promoting rhizobacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* 2009. Vol. 63. P. 541–556.
3. *Skvortsov I. M., Ignatov V. V.* Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species : properties and the possible role in interaction with plant roots // *FEMS Microbiol. Lett.* 1998. Vol. 165. P. 223–229.
4. *Evseeva N. V., Matora L. Y., Burygin G. L., Dmitrienko V. V., Shchyogolev S. Y.* Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells // *Plant Soil.* 2011. Vol. 346. P. 181–188.
5. *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 interaction // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. Vol. 118. P. 93–99.
6. *Коннова С. А., Брыкова О. С., Сачкова О. А., Егоренкова И. В., Игнатов В. В.* Исследование защитной роли полисахаридных компонентов капсулы бактерий *Azospirillum brasilense* // *Микробиология.* 2001. Т. 70. С. 503–508.
7. *Kefalogianni I., Aggelis G.* Modeling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. // *Appl. Microbiol. Biot.* 2002. Vol. 58. P. 352–357.
8. *Boyko A. S., Konnova S. A., Fedonenko Y. P., Zdorovenko E. L., Smol'kina O. N., Kachala V. V., Ignatov V. V.* Structural and functional peculiarities of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR55, isolated from the roots of *Triticum durum* // *Microbiol. Res.* 2011. Vol. 166. P. 585–593.
9. *Fedonenko Y. P., Konnova O. N., Zatonsky G. V., Shashkov A. S., Konnova S. A., Zdorovenko E. L., Ignatov V. V., Knirel Y. A.* Structure of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1 // *Carbohydr. Res.* 2004. Vol. 339. P. 1813–1816.
10. *Бойко А. С., Смолькина О. Н., Федоненко Ю. П., Здорovenko Э. Л., Качала В. В., Коннова С. А., Игнатов В. В.* Особенности структуры О-полисахаридов азоспирилл серогруппы I // *Микробиология.* 2010. Т. 79, № 2. С. 219–227.
11. *Федоненко Ю. П., Бойко А. С., Здорovenko Э. Л., Коннова С. А., Шашков А. С., Игнатов В. В., Книрель Ю. А.* Структурные особенности О-специфических по-



- лисахаридов бактерий *Azospirillum* серогруппы III // Биохимия. 2011. Т. 76, № 7. С. 976–982.
12. Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thielemans S., De Ley J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) // Inter. J. Syst. Bacteriol. 1987. Vol. 37. P. 43–51.
  13. Dodd I. C., Perez-Alfocea F. Microbial amelioration of crop salinity stress // J. Exp. Bot. 2012. Vol. 63. P. 3415–3428.
  14. Mendes R., Garbeva P, Raaijmakers J. M. The rhizosphere microbiome : significance of plant-beneficial, plant-pathogenic and human-pathogenic microorganisms // FEMS Microbiol. Rev. 2013. Vol. 37. P.634–663
  15. Кульшин В. А., Яковлев А. П., Аваева С. Н., Дмитриев Б. А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. № 5. С. 44–46.
  16. Hitchcock P. J., Brown T. M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stain polyacrylamide gels // J. Bacteriol. 1983. Vol. 154. P. 269–277.
  17. Tsai C. M., Frasch C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // Anal. Biochem. 1982. Vol. 119. P. 115–119.
  18. Mayer H., Tharanathan R. N., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria // Methods Microbiol. 1985. Vol. 18. P. 157–207.
  19. Sawardecker J. S., Sloneker J. H., Jeans A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // Anal. Chem. 1965. Vol. 37. P. 1602–1603.
  20. Leontein K., Lindberg B., Lonngren J. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols // Carbohydr. Res. 1978. Vol. 62. P. 359–362.
  21. Komaniecka I., Zdzisinska B., Kandefer-Szerszen M., Choma A. Low endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, and *Azospirillum* strains // Microbiol. Immunol. 2010. Vol. 54. P. 717–725.
  22. Суркина А. К., Коннова С. А., Федоненко Ю. П., Игнатов В. В. Гликополимеры бактерий рода *Azospirillum* как перспективные антагонисты классических эндотоксинов // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 2. С. 78–85.
  23. Игнатов В. В., Коннова О. Н., Бойко А. С., Фомина А. А., Федоненко Ю. П., Коннова С. А. Характеристика состава жирных кислот липидов А липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2009. Т. 9, вып. 1. С. 36–41.
  24. Choma A., Komaniecka I. Characterization of a novel lipid A structure isolated from *Azospirillum lipoferum* lipopolysaccharide // Carbohydr. Res. 2008. Vol. 343. P. 799–804.
  25. Lerouge I., Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions // FEMS Microbiol. Rev. 2002. Vol. 26. P. 17–47.
  26. Коннова О. Н., Бойко А. С., Бурьгин Г. Л., Федоненко Ю. П., Матора Л. Ю., Коннова С. А., Игнатов В. В. Химические и серологические исследования бактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. 2008. Т. 77, № 3. С. 350–357.
  27. Kannerberg E. L., Carlson R. W. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development // Mol. Microbiol. 2001. Vol. 39. P. 379–391.
  28. Boyko A. S., Dmitrenok A. S., Fedonenko Yu. P., Zdorovenko E. L., Konnova S. A., Knirel Y. A., Ignatov V. V. Structural analysis of the O-polysaccharide from *Azospirillum brasilense* Jm6B2 containing 3-O-methyl-D-rhamnose (D-acofriose) // Carbohydr. Res. 2012. Vol. 355. P. 92–95.
  29. Sigida E. N., Fedonenko Y. P., Zdorovenko E. L., Konnova S. A., Shashkov A. S., Ignatov V. V., Knirel Y. A. Structure of repeating units of a polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR80 // Carbohydr. Res. 2013. Vol. 371. P. 40–44.
  30. Sigida E. N., Fedonenko Yu. P., Shashkov A. S., Zdorovenko E. L., Konnova S. A., Ignatov V. V., Knirel Y. A. Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7 // Carbohydr. Res. 2013. Vol. 380. P. 76–80.