

Булыгина Т.В., Варбанец Л.Д., Пасичник Л.А.

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

ЛИПОПОЛИСАХАРИД *PANTOEA AGGLOMERANS* 7604: ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Целью настоящей работы было выделить липополисахарид (ЛПС) из *Pantoea agglomerans* 7604, химически охарактеризовать, исследовать его биологическую активность, а также установить серологические взаимосвязи с другими штаммами данного вида. **Методы.** Количественное содержание углеводов определяли методом Дюбуа; нуклеиновых кислот – методом Спирина; белка – методом Лоури; 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты – методом Осборна. Моносахаридный и жирнокислотный состав анализировали на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973. Чувствительность микробных культур *P. agglomerans* к полимиксину В определяли диско-диффузионным методом. Антигенную активность ЛПС исследовали методом двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони. Адгезивную активность определяли экспресс-методом по Брилису. **Результаты и выводы.** Липополисахарид *P. agglomerans* 7604 был очищен и химически охарактеризован. Преобладающими моносахаридами были манноза (69.9%) и арабиноза (17.0%). Исследование жирнокислотного состава ЛПС показало присутствие жирных кислот, содержащих в цепи от 12 до 18 атомов углерода. Кроме насыщенных кислот, выявлены также мононенасыщенные кислоты: пальмитолеиновая, олеиновая, ее цис- и трансизомеры. Поскольку штамм *P. agglomerans* 7604 был чувствителен к полимиксину В, можно сделать вывод, что ЛПС не содержит в структуре липида А такой заменитель, как 4-амино-4-дезоксид-арабиноза. Результаты термометрии показали, что исследуемый ЛПС проявляет пирогенное действие. Антисыворотка к исследуемому штамму, кроме гомологичного ЛПС, реагировала с ЛПС штаммов 8606 и 8674, что указывает на присутствие у них общих антигенных детерминант. Это может свидетельствовать о принадлежности этих штаммов к одной и той же серогруппе. Исследуемый ЛПС снижает индекс адгезивности, что свидетельствует о возможной конкуренции между молекулами ЛПС *P. agglomerans* 7604 и адгезинами *E. coli* F-50, задействованными на эритроцитах кроля.

Ключевые слова: *Pantoea agglomerans*, липополисахарид, моносахаридный и жирнокислотный состав, 4-амино-4-дезоксид-арабиноза, адгезия.

Представители *Pantoea agglomerans* широко распространены в природе как комменсалы, эпифиты или эндофиты, а иногда и как патогены, существование которых ассоциировано со многими растениями, теплокровными и насекомыми.

Известно [1], что важную роль во взаимодействиях хозяин-патоген, как у животных, так и у растений, играют липополисахариды (ЛПС) – основные компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий – амфифильные молекулы, образованные уникальной структурой липида А и полисахаридным компонентом, каждый из которых вносит определенный вклад в общую биологическую активность молекулы ЛПС.

Так, известно [2,3], что липид А является эндотоксическим центром, ответственным за все виды биологической активности, включая токсичность, пирогенность, тахикардию, лейкопению или лейкоцитоз, пониженное кровяное давление, синдром десеминированного внутрисосудистого свертывания, лихорадку, местную реакцию Шварцманна и мультиорганную недостаточность, которые в тяжелых случаях могут привести к смерти. Антигенная специфичность бактерии определяется О-специфическим полисахаридом (ОПС) – наиболее вариабельной частью молекулы ЛПС, тонкие вариации в структуре которого используются для создания внутривидовых серологических классификационных схем.

Специфические структурные особенности ЛПС с успехом были использованы в хемотаксономии ряда видов грамотрицательных бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae* и др. Что касается *P. agglomerans*, то его представителей на протяжении многих лет относили к различным родам и видам бактерий: *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*. И только в 1989 г. [4] в семействе *Enterobacteriaceae* был описан новый род *Pantoea*, в который включен вид *P. agglomerans*, являющийся гетерогенным видом, в систематике которого остается много нерешенных проблем. Вместе с тем до настоящего времени в литературе сведения относительно выделения и характеристики липополисахаридов фитопатогенных представителей *P. agglomerans* крайне ограничены [5].

Поэтому целью данной работы было изолировать ЛПС из *P. agglomerans*, выделенного из семян ржи, провести его химическую идентификацию, изучить биологические свойства, а также установить серологические взаимосвязи *P. agglomerans* 7604 с другими штаммами этого вида.

Материалы и методы исследования. Объектом исследований был штамм *P. agglomerans* 7604 из коллекции отдела фитопатогенных бактерий ИМВ НАН Украины, изолированный из семян ржи (Киевская обл., Украина). Бактерии выращивали на картофельном агаре в течение 36 ч при 28-30°C. Клетки собирали центрифугированием (20 мин, 5000 g), высушивали обработкой ацетоном и эфиром.

Выделение ЛПС. Липополисахариды экстрагировали из высушенных клеток 45%-м водным раствором фенола при 65-68°C. Полученные водные фракции диализовали против водопроводной, а затем дистиллированной воды для удаления фенола [6]. ЛПС очищали от нуклеиновых кислот ультрацентрифугированием (104 000 g, 4 ч), а также их осаждением 50%-м раствором трихлоруксусной кислоты.

Определение содержания углеводов, нуклеиновых кислот и белка. Количество нейтральных углеводов определяли методом Dubois [7]. Оценку результатов осуществляли по изменению окраски при реакции фенола с серной кислотой на спектрофотометре при 490 нм. Содержание углеводов определяли в соответствии со стандартными калибровочными кривыми, предварительно построенными по глюкозе.

Содержание нуклеиновых кислот оценивали по методу Спирина [8], белков - по методу Лоури с использованием реактива Фолина [9], 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты – методом Осборна [10].

Идентификацию нейтральных моносахаридов проводили после гидролиза препаратов в 2 N HCl (5 ч, 100°C). Моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов [11] на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973 inert. Моносахариды идентифицировали, сравнивая время удерживания ацетатов полиолов исследуемых образцов со стандартами, а также используя компьютерную базу данных ChemStation. Количественные соотношения отдельных моносахаридов выражали в % от общей суммы площадей пиков.

Определение жирнокислотного состава осуществляли после гидролиза образца в 1.5% растворе хлористого ацетила в метаноле (100°C, 4 ч), метиловые эфиры жирных кислот анализировали на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973 inert. Идентификацию жирных кислот проводили с помощью базы данных персонального компьютера, а также стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот. Количественные соотношения отдельных жирных кислот выражали в % от общей суммы площадей пиков [12].

Определение чувствительности бактерий P. agglomerans к полимиксину В проводили диско-диффузионным методом [13]. При учете результатов измеряли зоны задержки роста бактериальной культуры вокруг диска с антибиотиком.

Пирогенность исследовали на кроликах (весом 2.0 – 3.5 кг) путем внутривенного введения минимальной пирогенной дозы $7.5 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл, установленной в серии разведений ЛПС, с последующей термометрией животных на протяжении 3-х часов. ЛПС не считали пирогенным, если сумма повышения температур у трех кролей была меньше или равной 1.4°C; если эта сумма превышала 2.2°C – ЛПС считали пирогенным [14].

Участие ЛПС в процессах адгезии исследовали при влиянии разных концентраций ЛПС *P. agglomerans* 7604 на адгезию клеток *E. coli* F-50 к нативным эритроцитам кроля (развернутый метод Брилиса и соавт.) [15], которую выражали в индексах адгезивности (ИАМ) – среднее количество микробных клеток, адгезированных на одном эритроците, которое берет участие в адгезивном процессе. Этот показатель определяли на пятидесяти эритроцитах, просматривая все предметное стекло.

Иммунологические исследования. О-антисыворотку получали к прогретым (2.5 ч, кипящая водяная баня) клеткам *P. agglomerans*. Кролей иммунизировали внутривенно пятикратно с интервалом в 4 суток, концентрация клеток составляла $2 \cdot 10^9$ /мл (от 0.1 до 1 мл). Антигенную активность ЛПС исследовали методом двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони [16].

Результаты. Химическая идентификация очищенного препарата липополисахарида показала, что он характеризовался наличием углеводов (31.0%), незначительного количества белка и нуклеиновых кислот (табл. 1). Все ЛПС независимо от их бактериального происхождения содержат, по меньшей мере, один остаток 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) или ее производное, которые являются обязательным компонентом ЛПС. Содержание КДО в молекуле исследованного ЛПС (0.55%) было выше, чем в молекуле ЛПС типовых штаммов *P. agglomerans* 8674 и *Rahnella aquatilis* 33071, однако ниже, чем у *Pragia fontium* 20125 DRL.

Необходимо отметить, что, в отличие от других представителей энтеробактерий, выход ЛПС (3.4%) у исследуемого штамма *P. agglomerans* был значительно меньше.

Таблица 1

Химическая характеристика ЛПС представителей энтеробактерий

Показатели (% к сухой массе ЛПС)	<i>Pantoea agglomerans</i> 7604	<i>Pantoea agglomerans</i> 8674 (типовой)	<i>Rahnella aquatilis</i> 33071 (типовой)	<i>Pragia fontium</i> 20125 DRL (типовой)
Углеводы	31.0	42.0	67.2	78.7
КДО	0.55	0.4	0.24	1.02
Нуклеиновые кислоты	1.36	7.7	6.8	6.5
Белок	Следы	Следы	0.6	0.9
Выход ЛПС	3.4	6.8	13.0	10.44

Анализ (рис. 1) показал, что преобладающими нейтральными моносахаридами были манноза (69.9%) и арабиноза (17.0%). Также идентифицированы галактоза (3.3%), глюкоза (1.4%), гептоза (3.5%), фукоза (2.9%) и ксилоза (2.0%). Выделенный липополисахарид отличается от исследованных нами ранее ЛПС других штаммов *P. agglomerans* [17] наличием арабинозы.

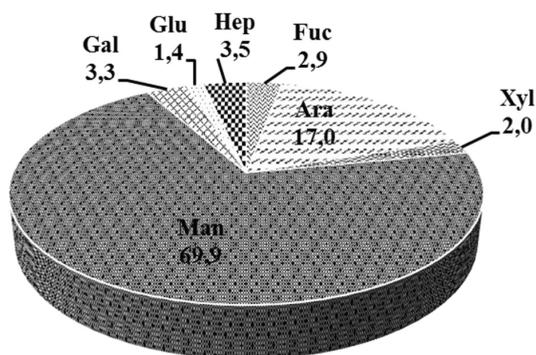


Рис. 1. Моносахаридный состав ЛПС *Pantoea agglomerans* 7604

Поскольку особенности состава жирных кислот липида А могут быть использованы как дополнительный хемотаксономический критерий в систематике микроорганизмов, нами был исследован жирнокислотный состав ЛПС (рис. 2), который показал присутствие жирных кислот, содержащих в цепи от 12 до 18 атомов углерода. Доминирующей была 3-ОН-С_{14:0}, которая является своеобразным маркером для всего семейства энтеробактерий. Кроме насыщенных кислот выявлены также мононенасыщенные кислоты: пальмитолеиновая, олеиновая и ее цис- и трансизомеры. Также в небольшом количестве была обнаружена пентадекановая кислота с разветвленной цепью в антеизоформе с локализацией метиловой группы у 3-го от конца атома углерода.

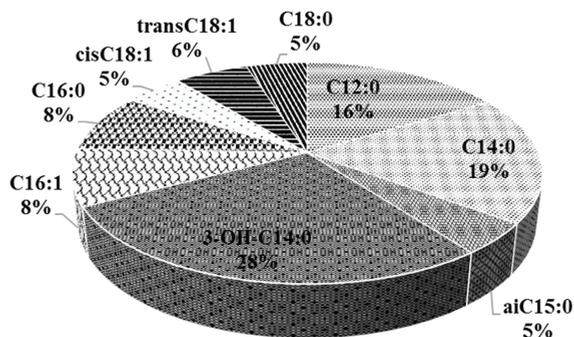


Рис. 2. Жирнокислотный состав липида А ЛПС *P. agglomerans* 7604

В липидах А некоторых бактерий могут присутствовать заместители, которые изменяют биологические свойства не только ЛПС, но и всей бактериальной клетки. В частности, в присутствии 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозы в молекуле липида А клетки бактерий становятся резистентными к полимиксину В [18]. Поскольку исследованный штамм *P. agglomerans* 7604 оказался чувствительным к действию полимиксина В, что выражается диаметром зоны задержки роста ($d=16$ мм), то можно сделать вывод, что липополисахарид, экстрагированный из этой бактерии, не содержит в составе липида А такой заместитель, как 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабиноза.

Для оценки пирогенных характеристик была установлена минимальная пирогенная доза ЛПС, которая составляла $7.5 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл апилогенного изотонического раствора. Результаты термометрии (рис. 3) показали повышение температуры на 1-й и 3-й час у экспериментальных животных более, чем на 0.5°C , что составляет грань физиологической нормы здоровых животных. Повышение температуры на 3-ий час было выше, чем при введении раствора ЛПС типового штамма *P. agglomerans* 8674 и пирогенала (липополисахарид, выделенный из клеток *Salmonella typhi*), но значительно ниже, чем при введении растворов ЛПС типовых штаммов

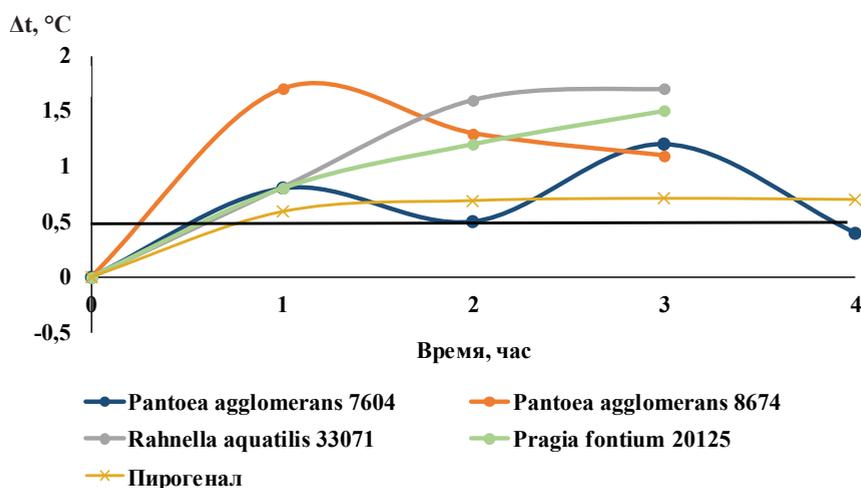


Рис. 3. Пирогенное действие ЛПС *P. agglomerans* 7604

Pragia fontium 20125 и *Rahnella aguatis* 33071, которые были взяты нами для сравнения.

Известно, что тонкие вариации в структуре О-цепей липополисахаридов определяют серологическую специфичность грамотрицательных бактерий, а также используются как молекулярная основа серологических классификационных схем. При проведении серологических исследований в качестве антител использовали поликлональные О-антисыворотки, а антигенами служили ЛПС *P. agglomerans*.

Исследование серологической активности ЛПС *P. agglomerans* 7604 реакцией двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони свидетельствует о том, что в гомологичной системе он проявляет активность антигена (рис. 4).

Как один из подходов в классификации разных бактерий могут быть использованы перекрестные серологические реакции. Так, нами было установлено (рис. 4), что из 13 исследованных ЛПС антисыворотка к *P. agglomerans* 7604 реагирует с ЛПС только двух штаммов: 8606 и 8674 (типовой штамм). Это свидетельствует о наличии у них общих антигенных детерминант и о принадлежности данных штаммов к одной серогруппе.

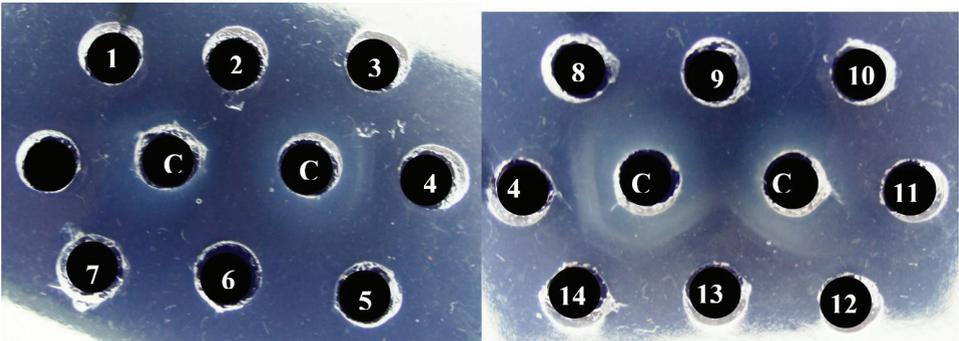


Рис. 4. Реакция двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони антисыворотки к *P. agglomerans* 7604 с ЛПС *P. agglomerans* П1а (1), П324 (2), 7460 (3), 7604 (4), 9637 (5), 9649 (6), 9668 (7), 7960а (8), 7969 (9), 8456 (10), 8488 (11), 8490 (12), 8606 (13), 8674 (14).

Полученные результаты свидетельствуют об иммунохимической гетерогенности вида *P. agglomerans*.

Поскольку липополисахариды являются основными адгезинами грамотрицательных бактерий, нами было исследовано влияние их различных концентраций на адгезию клеток *E. coli* F-50 к нативным эритроцитам кроля. Выявлено, что исследуемый ЛПС *P. agglomerans* 7604 понижал индекс адгезивности: чем выше концентрация липополисахарида в реакционной смеси, тем меньше удачных взаимодействий между поверхностными структурами эритроцитов и клетками *E. coli*. Индекс адгезивности микроорганизма при концентрации ЛПС в реакционной смеси 3 мг/мл составлял 2.61.

Исследуемый ЛПС проявил такое же ингибирующее влияние на процесс адгезии, как и ЛПС типового штамма *Pragia fontium* 20125 DRL [21], выделенного из питьевой воды (Чехия).

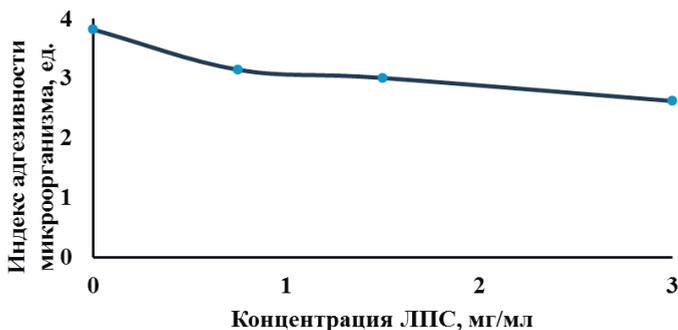


Рис. 5. Влияние различных концентраций липополисахарида *P. agglomerans* 7604 на процесс адгезии *E.coli*.

Обсуждение. Ранее [17] нами из 7 штаммов *P. agglomerans*, изолированных из различных растений, были выделены и охарактеризованы ЛПС, выход которых составил от 5.2 до 14.0%. Выход ЛПС *P. agglomerans* 7604 составил 3.4%, что несколько меньше, чем у других штаммов этого вида. Этот показатель, наряду с данными, полученными по идентификации моносахаридного и жирнокислотного составов, дает нам основания предположить, что обнаруженные нами различия являются штаммовыми, а не характерными только для представителей вида *P. agglomerans*.

Несмотря на общую структурную консервативность, липид А характеризуется значительной микрогетерогенностью, которая зависит от различных факторов, включая бактериальную адаптацию к изменяющимся условиям окружающей среды, незавершенность биосинтеза, химические модификации, возникающие при изолировании липидов А. Так, фосфатные группы могут быть замещены полярными или другими группами. Наиболее общими полярными заместителями фосфатных групп, которые обычно присутствуют в нестехиометрических количествах, являются: вторичный фосфат (с образованием дифосфатной группы), водород, гептоза, галактуроновая кислота, фосфоэтанолламин, а также 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабиноза (*L*-Ara4N) [3, 19]. Эти заместители изменяют биологические свойства не только ЛПС, но и всей бактериальной клетки. Установлено, что заместители при 4'-фосфате глюкозамина II являются ответственными за резистентность бактерий к некоторым поликатионным антибиотикам, в частности полимиксинам. Если ОН-группа при 4'-фосфате глюкозамина II не замещена, к ней присоединяется полимиксин, и такие бактерии будут чувствительны к нему. Если ОН-группа несет заместитель, такой, как 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабиноза, полимиксин не может присоединиться. Такая бактерия будет резистентной к полимиксинам. Поскольку исследованный штамм *P. agglomerans* 7604 оказался чувствительным к действию полимиксина В, то можно предположить, что липополисахарид, экстрагированный из этого штамма, не содержит в составе липида А такой заместитель, как 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозу. Поскольку из 14 исследованных штаммов только 1 проявил устойчивость к полимиксину В [20], можно сделать вывод, что структура липида А также является свойством, характерным для определенного штамма.

ЛПС *P. agglomerans* 7604, как и другие представители *Enterobacteriaceae* (*Pragia fontium* 20125 и *Rahnella aguatis* 33071), проявлял умеренное пирогенное действие [21, 22].

Результаты перекрестных серологических реакций свидетельствуют об иммунохимической гетерогенности вида *P. agglomerans*.

Исследуемый ЛПС проявил такое же ингибирующее влияние на процесс адгезии, как и ЛПС изученных нами ранее [17] штаммов *P. agglomerans*.

Таким образом, впервые выделен и химически охарактеризован липополисахарид *Pantoea agglomerans* 7604, изолированной из семян ржи. Исследуемый ЛПС отличался от ранее изученных нами ЛПС других штаммов *P. agglomerans* по моносахаридному составу наличием арабинозы, а по жирнокислотному – наличием олеиновой кислоты, ее цис- и транс-изомеров, пентадекановой кислоты с разветвленной цепью в антеизоформе и отсутствием 2-ОН-С_{14:0}. Непрямым методом было установлено, что липополисахарид не содержит в составе липида А заместитель 4-амино-4-дезоксид-арабинозу.

Исследуемый липополисахарид был более пирогенным, чем пирогенал и ЛПС типового штамма *P. agglomerans* 8674, но значительно менее пирогенным, чем растворы ЛПС типовых штаммов *Pragia fontium* 20125 и *Rahnella aguatis* 33071. Для дальнейшего использования ЛПС *P. agglomerans* 7604 как основы для потенциальных и высокоактивных лечебных и профилактических препаратов нужно провести химическую детоксикацию с целью получения непирогенных производных (аналогов).

Антисыворотка к *P. agglomerans* 7604 реагировала с ЛПС только двух штаммов 8606 и 8674 (типовой штамм), что свидетельствует о наличии у них общих антигенных детерминант и о принадлежности к одной серогруппе. Эти данные могут быть использованы при разработке серологической классификационной схемы.

Исследуемый ЛПС *P. agglomerans* 7604 снижал количество адгезированных клеток *E. coli* F-50 на эритроцитах кроля, что обусловлено блокированием сайтов взаимодействия бактерий на поверхности эритроцитов.

Булигіна Т.В., Варбанець Л.Д., Пасічник Л.А.

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

ЛПОПОЛІСАХАРИД *PANTOEA AGGLOMERANS* 7604: ХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

Резюме

Метою цієї роботи було виділити ліпополісахарид (ЛПС) із *Pantoea agglomerans* 7604, хімічно охарактеризувати, дослідити його біологічну активність, а також встановити серологічні взаємозв'язки з іншими штамми даного виду. **Методи.** Кількісний вміст вуглеводів визначали методом Дюбуа; нуклеїнових кислот – методом Спіріна; білок – методом Лоурі; 2-кето-3-дезоксіоктонової кислоти – методом Осборна. Моносахаридний та жирнокислотний склад аналізували на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert. Чутливість мікробних культур

P. agglomerans до поліміксину В визначали диско-дифузійним методом. Антигенну активність ЛПС досліджували методом подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні. Адгезивну активність ЛПС визначали експрес-методом по Брілісу. **Результати та висновки.** Ліпополісахарид *P. agglomerans* 7604 був очищений і хімічно охарактеризований. Переважаючими моносахаридами були маноза (69.9%) і арабіноза (17.0%). Дослідження жирнокислотного складу ЛПС показало присутність жирних кислот, що містять у ланцюгу від 12 до 18 атомів вуглецю. Крім насичених кислот, виявлені також мононенасичені кислоти: пальмітолеїнова, олеїнова і її цис- і трансізомери. Оскільки штам *P. agglomerans* чутливий до поліміксину В, можна зробити висновок, що ЛПС не містить в структурі ліпиду А такий замітник, як 4-аміно-4-дезоксид-Л-арабіноза. Результати термометрії показали, що досліджуваний ЛПС проявляє пірогенну дію. Антисироватка до досліджуваного штаму, крім гомологічного ЛПС, реагувала з ЛПС штамів 8606 і 8674, що свідчить про присутність у них загальних антигенних детермінант. Це може свідчити про приналежність цих штамів до однієї серогрупи. Досліджуваний ЛПС знижує індекс адгезивності, що свідчить про можливу конкуренцію між молекулами ЛПС *P. agglomerans* 7604 і адгезинами *E. coli* F-50, задіяними на еритроцитах кроля.

Ключові слова: *Pantoea agglomerans*, ліпополісахарид, моносахарид і жирнокислотний склад, 4-аміно-4-дезоксид-Л-арабіноза, адгезія.

Bulyhina T.V., Varbanets L. D., Pasichnyk L.A.

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
Str. Academician Zabolotny, 154, Kyiv 03143, Ukraine*

LIPOPOLYSACCHARIDE OF PANTOEA AGGLOMERANS 7604: CHEMICAL IDENTIFICATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Summary

The **goal** of the present work was isolation, chemical characterization of the lipopolysaccharide (LPS) of *P. agglomerans* 7604, investigation of its biological activities and also estimation of serological relationships with other strains of this species. **Methods.** The amounts of the following components were determined: carbohydrates by the Dubois method; nucleic acids by the method of Spirin; protein by the Lowry method; 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid by the Osborn method. Monosaccharide and fatty acid composition were analyzed on an Agilent 6890N/5973 inert chromatography-mass spectrometry system. The sensitivity of microbial cultures of *P. agglomerans* to polymyxin B was determined by disco-diffusion method. The antigenic activity of LPS was studied by the method of double immunodiffusion in agar according to Ouchterlony. Adhesive activity was determined by express-method for Briles. **Results and conclusions.** Lipopolysaccharide (LPS) of *Pantoea agglomerans* 7604 was purified and characterized chemically. The predominant monosaccharides were mannose (69.9 %) and arabinose (17.0 %). The LPS included fatty acids with chain lengths from 12 to 16 carbon atoms. In addition to saturated acids, monounsaturated acids have also been detected: palmitoleic, oleic and its cis- and trans-isomers. Since the studied strain of *P. agglomerans* was sensitive to polymyxin B, it can be concluded that the LPS didn't contain in the structure of lipid A such a substitute as 4-amino-4-deoxy-L-arabinose. The results of thermometry showed that the investigated

LPS displays a pyrogenic effect. The antisera to the test strain reacted with LPS strains of 8606 and 8674, indicating the presence of the common antigenic determinants. This may indicate that these strains belong to one and the same serogroup. The studied LPS reduces the index of adhesiveness, suggesting a possible competition between molecules of *P. agglomerans* 7604 LPS and adhesions of *E. coli* F-50, involved on the erythrocytes of the rabbit.

Keywords: *Pantoea agglomerans*, lipopolysaccharide, monosaccharide and fatty acid composition, 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, adhesion.

1. Down JM, Newman MA., von Roepenack A. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Ann. Rev. Phytopathology*. 2000; 38: 241-261.
2. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 1994; 8 (2): 217-225.
3. Holst O, Molinaro A. *Microbial Glycobiology: Structures Relevance and Applications*. San Diego: Elsevier; 2009. P. 565.
4. Gavini FJ, Beji MA, Mielcarek C, Izard D, Kerster K, De Ley J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1988) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1989; 39(3): 337-345.
5. Cimmino A, Marchi G, Surico G, Hanuszkiewicz A, Evidente A, Holst O. The structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Pantoea agglomerans* strain FL1. *Carbohydrate Research*. 2008; 343(2): 392-396.
6. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide -extraction with phenol. *Methods Carbohydr. Chem*. 1965; 5: 83-91.
7. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*. 1956; 28(3): 350-356.
8. Spirin AS. Spectrophotometric determination of total nucleic acids. *Biokhimiia*. 1958; 23(5): 656-62.
9. Lowry OH., Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951; 193(5): 265-275.
10. Osborn MJ. Studies on the gram-negative cell wall. I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1963; 50(3): 499.
11. Sawardeker JS, Sloneker JH, Jeans A. A quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. *Anal. Chem*. 1965; 37(5): 1602-1603.
12. Albersheim P, Nevis DJ, English P D, Karr A. A method for analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res*. 1976; 3: 340-345.
13. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement. *Clinical and Standards Institute*. 2005; 25(1): 87-151.
14. Bennett IL. A study of the relationship between the fevers caused by bacterial pyrogens and by the intravenous injection of the sterile exudates of acute inflammation. *J. Exp. Med*. 1948; 88(3): 279-284.

15. *Brilis V, Briline T, Lencner H, Lencner A.* Metodika izucheniya adgezivnogo processa mikroorganizmov. Laboratornoe delo. 1968; 4: 210-212. Russian.
16. *Ouchterlony O.* Diffusion in gel methods for immunological analysis Prog. Allergy. 1962; 6: P. 3-15
17. *Varbanets LD, Brovarkaya OS, Bulyhina TN, Garkavaya EG, Zhitkevich NV.* Characterisation of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide. Microbiology. 2014; 83(6): 754-763.
18. *Knirel YA.* Structure of O-antigens. In: Chemical Synthesis, Biogenesis and Interactions with Host Cells. Eds. Y.A. Knirel, M.A. Valvano. Wien N.Y.: SpringerVerlag; 2011. 433 p.
19. *Silipo A, Molinaro A.* Lipid A structure. In: Bacterial Lipopolysaccharides. Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interactions with Host Cells. Eds. Y.A. Knirel, M.A. Valvano. Wien N.Y.: SpringerVerlag; 2011. 433p.
20. *Bulyhina TV, Varbanets LD, Pasichnyk L.A., Zhitkevych NV.* [Antibiotic resistance of *Pantoea agglomerans*]. Microbiology and biotechnology. 2016; 1: 68-75. Ukrainian.
21. *Shubchynskyy VV, Varbanets LD, Brovarkaya OS.* [Endotoxic activity of lipopolysaccharide of *Pragia fontium*]. Modern toxicology problems. 2007; 4: 35-38. Ukrainian.
22. *Ostapchuk AN, Varbanets LD.* [Biological activity of native and modified lipopolysaccharides *Rahnella aquatilis*] Mikrobiol Z. 2004; 66(6): 31-36. Ukrainian.

Отримано 23.12.2016