

СПОСОБНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К NO-СИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

А.С. Губейко

Научный руководитель – В.И. Дунай, к.б.н., доцент

Полесский государственный университет

Монооксид азота (NO) –газообразное соединение без запаха, который обладает высокой проницаемостью через мембраны клеток и субклеточные структуры за счет малого размера и отсутствие заряда у молекулы [1, 2]. Согласно литературным данным NO является редокс-активной молекулой, которая является универсальным регулятором клеточного и тканевого метаболизма у организмов разного уровня организации. В отличие от эукариот синтез и функции NO у прокариот изучены слабо.

NO в клетках у прокариот обеспечивается за счет высвобождения из L-аргинина и нитрирования L-триптофана ферментом NO-синтазой.

Bacillus и *Lactobacillus* – это одни из немногих микроорганизмов, у которых обнаружена NO-синтаза [3]. Бактерии рода *Bacillus*, *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* представляют собой важный компонент в нормальной микрофлоре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека, которые эффективно угнетают рост патогенных микроорганизмов в ЖКТ, регулирует поступление желчи в кишечник и т.д.

Целью работы является изучение способности к NO-синтазной активности пробиотических бактерий.

Объект исследования – *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus weihenstephansensis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium infantis*.

Определяли способность пробиотических бактерий к высвобождению оксида азота из L-аргинин и триптофана через ближайший стабильный метаболит NO – нитрит (NO₂) [3].

Для обнаружения и определения количества NO₂ был использован спектрофотометрический метод определения, основанный на реакции нитритов с реактивом Грисса [4]. Содержание нитритов находили согласно калибровочному графику и визуально сравнивая интенсивность окраски пробы со шкалой растворов определённой концентрацией нитритов с реактивом Грисса. Нитропруссид натрия (SNP) брали в качестве контроля, так как в водном растворе SNP спонтанно разлагается с образованием NO, который, в свою очередь, вступает в реакцию с молекулярным кислородом воздуха с образованием NO₂.

Для определения способности к NO-синтазной активности исследуемые культуры прокариот выращивали 1-3 суток при 37°C в ГРМ-бульоне с добавлением 1 % аргинина или 1 % триптофана.

Оценку выживаемости штаммов бактерий в ГРМ-бульоне с L-аргинином или с L-триптофаном определяли по динамике роста бактерий спектрофотометрическим методом при длине волны 600 нм (ссылка).

Согласно результатам работы *Bacillus weihenstephanensis* обладает способностью к NO-синтазной активности в отношении аргинина в первые и вторые сутки культивирования, на 3-и сутки данная активность уже отсутствует (таблица 1).

Таблица 1. – Концентрации образовавшихся в процессе NO-синтазной активности нитритов у пробиотических бактерий из аргинина

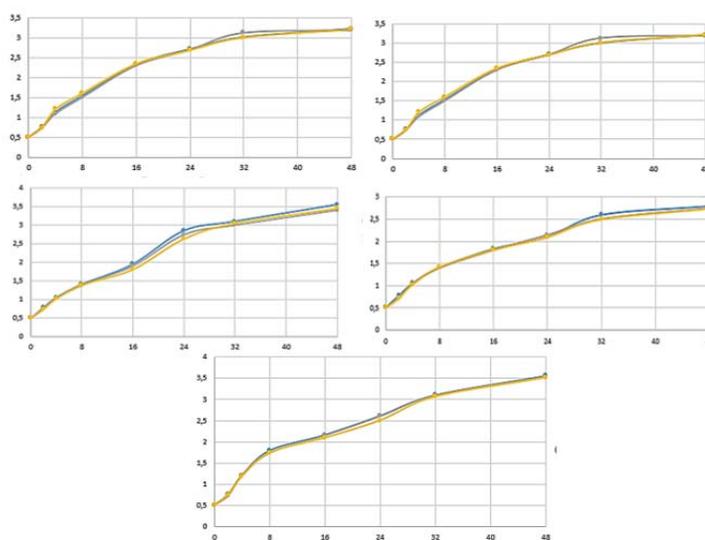
Кол-во суток инкубации	Концентрация нитритов по калибровочному графику, мкг/мл				
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. infantis</i>
1	нет	нет	0,25±0,18	нет	нет
2	нет	нет	0,18±0,02	нет	нет
3	нет	нет	нет	нет	нет

Bifidobacterium infantis обладает способностью к NO-синтазной в отношении триптофана (таблица 2).

Таблица 2. – Концентрации образовавшихся в процессе NO-синтазной активности нитритов у пробиотических бактерий из триптофана

Кол-во суток инкубации	Концентрация нитритов по калибровочному графику, мкг/мл				
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. infantis</i>
1	нет	нет	нет	нет	1,43±0,40
2	нет	нет	нет	нет	1,33±0,34
3	нет	нет	нет	нет	1,23±0,31

По результатам спектрофотометрии не было обнаружено ингибирующее действие L-аргинином и L-триптофаном в отношении исследуемых пробиотических бактерий, на это указывает отсутствие значительного уменьшения оптической плотности опытных проб по сравнению с контрольными (рисунок).



По оси x – время инкубации, ч; по оси y – оптическая плотность D(λ) при 600 нм;

1. *Lactobacillus delbrueckii*, 2. *Lactobacillus acidophilus*, 3. *Bacillus weihenstephanensis*, 4. *Bacillus subtilis*, 5. *Bifidobacterium infantis*

Рисунок – Оценка выживаемости штаммов бактерий в отсутствии и присутствии донора оксида азота

Таким образом, полученные результаты указывают на способность *Bacillus weihenstephanensis* и *Bifidobacterium infantis* к NO-синтазной активности и отсутствия цитотоксического действия исследуемых аминокислот на бактерии.

Обнаружение высвобождения монооксида азота у *Bacillus weihenstephanensis* и *Bifidobacterium infantis* имеет огромное значение как для биотехнологии, так и для и медицины. Проведенное исследование открывает перспективы использования пробиотических препаратов на основе штаммов бактерий *Bacillus weihenstephanensis* и *Bifidobacterium infantis* для поддержания уровня NO у человека и животных, когда есть заболевания, связанные с отклонениями в образовании NO у организма.

Список использованных источников

1. Кузнецова, В. Л. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия / В. Л. Кузнецова, А. Г. Соловьева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 1-11.
2. Гуманова, Н. Г. Оксид азота, его циркулирующие метаболиты NOx и их роль в функционировании человеческого организма и прогнозе риска сердечно-сосудистой смерти (часть I) / Н. Г. Гуманова // Профилактическая медицина. – 2021. – Т. 24, № 9. – С. 102-109.
3. Xu, J.W. Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli. / J. Xu, W. Verstraete // Appl Microbiol Biotechnol – 2001. – № 56 – P. 504–507 (2001).