

СПОСОБНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К ДЕНИТРИФИКАЦИИ**А.С. Губейко**, магистрантНаучный руководитель – **О.Н. Жук**, к.б.н.; **В.И. Дунай**, к.б.н., доцент**Полесский государственный университет**

Монооксид азота (NO) – бесцветный газ без запаха, обладающий высокой реакционной способностью [1]. Этот легко диффундирующий свободнорадикальный газ способен легко и быстро проникать сквозь биологические мембраны, достигая внутриклеточных мишеней без лишних энергетических затрат, что позволяет ему наилучшим образом справляться с задачей сигнальной регуляции. NO вовлечен в регуляцию практически всех органов и систем организма млекопитающих и рассматривается как регулятор основных систем жизнеобеспечения: сердечно-сосудистой, системы свертывания крови, иммунной, нервной систем и др. [2–4]. Отклонения в гомеостазе NO обуславливают патофизиологию многих заболеваний, связанных либо с недостаточной биодоступностью NO, либо с его гиперпродукцией, обуславливающей его цитотоксичность. Малые концентрации NO оказывают цитопротекторное действие, высокие концентрации NO – цитотоксическое, антибактериальное, противогрибковое, способствуют развитию воспалительного процесса, усилению апоптоза клеток, повреждают ДНК, ингибируют митохондриальное дыхание [1, 5].

Концентрация циркулирующего NO в организме млекопитающих является суммарным результатом различных путей его метаболизма, включая синтез активными NO-синтазами эндогенного NO, реакции денитрификации экзогенных нитратов и нитритов, поступающих с продуктами питания и др.

Изучению процесса и особенностей синтеза оксида азота активными NO-синтазами уделяется большое внимание в силу выработки его в конкретном органе и по конкретному требованию. Например, изучению нейрональной NO-синтазы уделяется внимание при исследовании тех или иных реакций нервной системы, а эпителиальной NO-синтазы – при проблемах сердечно-сосудистой. Процесс денитрификации хорошо изучен у почвенных микроорганизмов, играющих значительную роль в круговороте азота в природе. О роли нормальной микрофлоры млекопитающих и человека в процессе денитрификации поступающих, например, с пищей нитратов и нитритов, сведений крайне мало.

Целью работы явилось изучение способности к денитрификации пробиотических бактерий.

Объект исследования – бактерии, которые представлены в нормальной микрофлоре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium infantis*.

Бактерии культивировали в питательной среде ГРМ-бульон с 10% NaNO₃. NO определяли через образование ближайшего стабильного метаболита – NO₂. Для обнаружения формирования NO₂ использовали спектрофотометрический метод определения нитрит-иона в культуральной среде при длине волны 540 нм [4], основанный на реакции нитритов с реактивом Грисса.

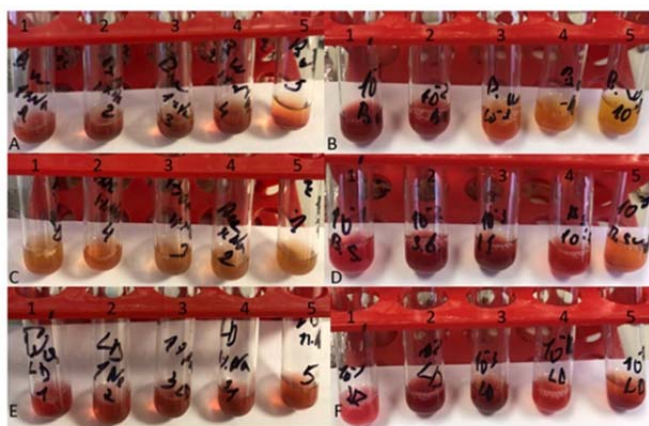
Подсчет концентрации NO₂ произвели по формуле Бугера-Ламберта-Бера:

$$C = \frac{A}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot b},$$

где C – концентрация вещества в г/100 мл; A – оптическая плотность испытуемого раствора; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения вещества; b – длина оптического пути или толщина слоя, в сантиметрах.

В качестве контроля использовали питательную среду ГРМ-бульон с содержанием 10 % нитропруссид натрия (SNP) и ГРМ-бульон с исследуемыми микроорганизмами. Нитропруссид натрия (SNP) в водном растворе при физиологическом значении pH (7,4) спонтанно разлагается с образованием NO, который, в свою очередь, вступает в реакцию с молекулярным кислородом воздуха с образованием нитрит-ионов. Последние детектировали с помощью реактива Грисса по красному цвету раствора [6].

Все исследованные бактерии обладают способностью к денитрификации на что указывает изменение цветности раствора с прозрачно желтого цвета на красный после добавления реактива Грисса (рисунок).



А. контроль (с содержанием 10% нитропруссид натрия)

В. *Bacillus weihenstephanensis*, С. *Lactobacillus delbrueckii*, D. *Bifidobacterium infantis*, E. *Bacillus subtilis*, F. *Lactobacillus acidophilus*.

Рисунок – Изменение цветности питательной среды ГРМ-бульон с 10% NaNO₃ после добавления реактива Грисса

У *Bacillus weihenstephanensis* (В) наибольшая окраска питательных сред обнаружена в разведении от 10⁻¹ до 10⁻², цветность раствора прозрачно-красная, *Lactobacillus delbrueckii* (С) – в разведении от 10⁻² цветность раствора оранжево-красного цвета, *Bifidobacterium infantis* (D) – в разведении от 10⁻² до 10⁻³ цветность раствора темно-красная, *Bacillus subtilis* (E) – в разведении от 10⁻² цветность раствора прозрачно-красного цвета, *Lactobacillus delbrueckii* – в разведении 10⁻² до 10⁻³ цветность раствора темно-красная.

Концентрация суммарных NO₂ у *Lactobacillus delbrueckii* составила 0,049±0,003 мкг/мл, *Lactobacillus acidophilus* – 0,070±0,004 мкг/мл, *Bacillus weihenstephanensis* – 0,059±0,003 мкг/мл, *Bacillus subtilis*– 0,054±0,002 мкг/мл, *Bifidobacterium infantis*– 0,06±0,005 мкг/мл.

Таким образом, полученные результаты указывают на способность исследованных пробиотических бактерий к денитрификации, что предполагает их роль в повышении общего количества NO в организме, в поддержание уровня NO при его нехватке в конкретной ситуации или при нарушении NO-синтазной активности в организме человека.

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. Nitric oxide: what's new to NO? / K. Ghimire [и др.] // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2017. – V. 312 – № 3. – С. 254-262.
3. Herbst, S. Interferon Gamma Activated Macrophages Kill Mycobacteria by Nitric Oxide Induced Apoptosis / S. Herbst, U. E. Schaible, B. E. Schneider // *PLOS ONE*. – 2011. – V. 6 – № 5. – С. 1-8
4. Гуманова, Н. Г. Оксид азота, его циркулирующие метаболиты NO_x 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.
5. Урясьев, О. М. Роль оксида азота в регуляции дыхательной системы / О. М. Урясьев, А. И. Рогачиков // «Наука молодых» – 2014. – С. 133-140.
6. Терешко Е. В. Спектрофотометрическое определение NO-акцепторной активности аскорбиновой кислоты / Е. В. Терешко // 79-я научная конференция студентов и аспирантов Белорусского государственного университета, Минск, 10–21 мая 2022 г. / БГУ – Минск, 2022. – 517-520 с.