

**ОЦЕНКА NO-СИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ У ПРОКАРИОТ И НИЗШИХ ЭУКАРИОТ****А.С. Губейко, О.Н. Жук, В.И. Дунай**Полесский государственный университет, [asagubejko@gmail.com](mailto:asagubejko@gmail.com), [nadulich@mail.ru](mailto:nadulich@mail.ru)

**Аннотация.** В эксперименте использовался непрямой метод определения NO-синтазной активности прокариот и эукариот. В ходе работы выявили, что *Bacillus weihenstephanensis*, *Bifidobacterium infantis*, *Spirulina platensis* и *Chlorella vulgaris* являются NO-продуцентами в ходе NO-синтазной активности.

**Ключевые слова:** монооксид азота, NO-синтазная активность, нитрит, прокариоты, эукариоты, спектрофотометрия.

Оксид азота (NO) является важной сигнальной молекулой, которая участвует в многочисленных физиологических и патофизиологических процессах в организме млекопитающих [1]. Согласно данным литературы классическим путем синтеза монооксида азота у млекопитающих является синтез NO из L-аргинина NO-синтазами (NOS) [1, 2]. Дополнительное образование NO в кишечнике, для поддержания уровня оксида азота на необходимом для нормальной жизнедеятельности организма уровне, можно обеспечено микроорганизмами, обладающими NO-синтазной активностью. Особый интерес представляет нормальная микрофлора, в первую очередь лактобактерии.

В качестве объектов исследования были выбраны прокариоты: пробиотические бактерии (*Lactobacillus delbrueckii* БИМ В-1802, *Bacillus weihenstephanensis* БИМ В-1279 Г, *Bacillus subtilis* БИМ В-278; *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium infantis* выделенные из пробиотика “Линекс”); цианобактерия *Spirulina platensis* IBCE S-2; эукариоты: микромицеты (*Aspergillus awamori* БИМ F-7, *Aspergillus terreus* БИМ F-17, *Trichoderma sp.* БИМ F-107, *Trichoderma atroviride* БИМ F-819, *Saccharomyces cerevisiae* из упаковки “Дрожжи хлебопекарные сухие быстродействующие Dr. Bakers”); базидиомицеты (*Sterium hirsutum* № 491, *Pleurotus ostreatus* № 492, *Agaricus bisporus*); зеленая микроводоросль *Chlorella vulgaris* IBCE C-19.

NO-синтазную активность прокариот и эукариот определяли через ближайший стабильный метаболит NO – нитрит (NO<sub>2</sub>) с помощью реактива Грисса [3, 4]. В качестве контроля наличия NO<sub>2</sub> использовали нитропруссид натрия (SNP), так как в питательной среде SNP спонтанно разлагается с образованием NO, который, в свою очередь, вступает в реакцию с O<sub>2</sub> с образованием NO<sub>2</sub> [5]. Для определения концентрации нитритов использовали спектрофотометрический анализ. Для определения токсичности донора оксида азота (аргинина или триптофана) на исследуемые организмы прокариот и эукариот использовали спектрофотометрический метод и подсчет клеток в камере Горяева а также макроскопический и микроскопические анализы для микро- и макромицетов.

Было выявлено, что пробиотическая бактерия *Bacillus weihenstephanensis* обладает способностью к NO-синтазной активности в отношении аргинина на первые и вторые сутки культивирования, на третьих сутках данная активность уже не обнаруживается (таблица 1).

Таблица 1. – Концентрация образовавшегося нитрита в процессе NO-синтазной активности 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

Во время проведения эксперимента столкнулись с тем, что у *B. weihenstephanensis* NO-синтазная активность не проявлялась при многократных пассажах, вероятно, это связано с потерей гена, ответственного за NO-синтазу.

Пробиотическая бактерия *Bifidobacterium infantis* обладает способностью к NO-синтазной активности в отношении триптофана на протяжении трех суток инкубации (таблица 2).

Таблица 2. – Концентрация образовавшегося нитрита 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

На свету у цианобактерии *Spirulina platensis* NO-синтазная активность не была обнаружена в отношении аргинина, а у зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* данная активность была обнаружена на четвертые сутки инкубации (таблица 3).

Таблица 3. – Концентрации образовавшихся нитритов в процессе NO-синтазной активности у цианобактерии *Spirulina platensis* и зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* из аргинина на свету

Кол-во суток инкубации	Концентрация нитритов по калибровочному графику, мкг/мл	
	<i>Spirulina Platensis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
1	нет	нет
2	нет	нет
4	нет	3,41±0,34

В темноте у *S. platensis* NO-синтазная активность в отношении аргинина выявлена в первые же сутки и сохранялась на протяжении четырех суток культивирования, тогда как у *Ch. vulgaris* NO-синтазная активность проявилась на четвертые сутки (таблица 4).

Таблица 4. – Концентрация образовавшегося нитрита в процессе NO-синтазной активности у цианобактерии *Spirulina platensis* и зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* из аргинина в темноте

Кол-во суток инкубации	Концентрация нитритов по калибровочному графику, мкг/мл	
	<i>Spirulina Platensis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
1	0,2±0,03	нет
2	1±0,06	нет
4	2±0,05	2,1±0,04

Стоит отметить, что NO-синтазная активность в отношении аргинина у *C. vulgaris* интенсивнее проходит на свету.

NO-синтазная активность в отношении триптофана была обнаружена у *C. vulgaris* как в темноте, так и на свету (таблица 5, 6).

Таблица 5. – Концентрация образовавшегося нитрита в процессе NO-синтазной активности у цианобактерии *Spirulina platensis* и зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* из триптофана на свету

Кол-во суток инкубации	Концентрация нитритов по калибровочному графику, мкг/мл	
	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
1	нет	1±0,15
2	нет	2±0,12
4	нет	5±0,2

У цианобактерии *S. platensis* отсутствует NO-синтазная активность в отношении триптофана, как в темноте, так и на свету на протяжении трех суток (таблица 5, 6).

Таблица 6. – Концентрация образовавшегося нитрита в процессе NO-синтазной активности у цианобактерии *Spirulina Platensis* и зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* из триптофана в темноте

Кол-во суток инкубации	Концентрация нитритов по калибровочному графику, мкг/мл	
	<i>Spirulina Platensis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
1	нет	1±0,16
2	нет	1,5±0,1
4	нет	2±0,14

У микромицетов и макромицетов NO-синтазная активность не была обнаружена в отношении аргинина и триптофана.

Следовательно, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bifidobacterium infantis*, *Spirulina platensis* и *Chlorella vulgaris* обладают NOS.

Согласно результатам спектрофотометрии по оптической плотности и подсчету клеток в камере Горяева аргинин и триптофан не оказывают токсическое действие на *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *B. subtilis*, *B. infantis*, *B. weihenstephanensis*, *S. platensis*, *S. cerevisiae*, *C. vulgaris*, так как цитотоксический индекс не превышает 5 % и минимальная жизнеспособность исследуемых микроорганизмов составила больше 90 % на протяжении 3-4 суток инкубации. По результатам макроскопического и микроскопического анализа мицетов доноры оксида азота (аргинин и триптофан) обладают ингибирующим действием в отношении микро- и макромицетов.

Степень ингибирования триптофаном, установленная по изменению массы культур, составила: *Aspergillus awamori* 29,2±1,2; *Aspergillus terreus* 28,7±1,1; *Trichoderma sp.* 53,4±3,3; *Trichoderma atroviride* – 58,4±3,5, *Agaricus bisporus* 30,9±2,5%, *Sterium hirsutum* 51,7±3,5%, *Pleurotus ostreatus* 75,3±2,5%. Степень ингибирования аргинином – *A. awamori* 39,1±1; *A. terreus* 38,6±1,1; *Tr. sp.* 45,4±2,3%; *Tr. atroviride* 58,6±3,1%, *A. bisporus* 42,4±3,3%, *St. hirsutum* 100%, *Pl. ostreatus* 100%.

Таким образом, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bifidobacterium infantis*, *Spirulina platensis* и *Chlorella vulgaris* обладают системой защиты от токсического действия синтезируемого ими оксида азота. *B. weihenstephanensis*, *B. infantis*, *S. platensis* и *C. vulgaris* являются NO-продуцентами в ходе NO-синтазной активности. Проведенное исследование открывает перспективы использования этих организмов в качестве пробиотиков и биологически активных веществ, которые могут способствовать биомодуляции NO для поддержания гомеостаза в организме человека

#### Список использованных источников

1. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract / T. Sobko [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2006. – V. 41, № 6. – P. 985-991
2. Циклический гуанозинмонофосфат и сигнальные системы клеток растений / Л.В. Дубовская [и др.]. – Минск : Белорусская наука, 2014. – 279 с.  
Циклический гуанозинмонофосфат и сигнальные системы клеток растений / Л.В. Дубовская [и др.]. – Минск : Белорусская наука, 2014. – 279 с.
3. Мажитова, М. В., Спектрофотометрическое определение уровня метаболитов монооксида азота в плазме крови и ткани мозга белых крыс / Мажитова М. В. // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 3. – С. 1-7.
4. Методика определения нитритов с реактивом Грисса [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://portal.tpu.ru/SHARED/t/TRETYAKOV/Ucheb\\_rabota/mips/Tab2/Nitrites.pdf](https://portal.tpu.ru/SHARED/t/TRETYAKOV/Ucheb_rabota/mips/Tab2/Nitrites.pdf) – Дата доступа: 01.05.2024.
5. Терешко, Е. В. Спектрофотометрическое определение NO-акцепторной активности аскорбиновой кислоты // 79-я научная конференция студентов и аспирантов Белорусского государственного университета : материалы конф., Минск, 10–21 мая 2022 г. В 3 ч. Ч. 1 / Белорус. гос. ун-т ; редкол.: В. Г. Сафонов (гл. ред.) [и др.]. – Минск : БГУ, 2022. – С. 517-520.