

Город Бородино

КРАЕВОЙ МОЛОДЕЖНЫЙ ФОРУМ
«НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СИБИРИ»

НОМИНАЦИЯ «НАУЧНЫЙ КОНВЕНТ»

Направление: Биология / микробиология

«Влияние микрофлоры ротовой полости человека на метаболизм нитратных соединений»

Позднякова Ксения Алексеевна
МБОУ СОШ №3, 10 класс

Ефимкина Анна Ионовна,
МБОУ СОШ №3, учитель биологии и химии

С условиями Конкурса ознакомлен(-а) и согласен(-а). Организатор конкурса оставляет за собой право использовать конкурсные работы в некоммерческих целях, без денежного вознаграждения автора (авторского коллектива) при проведении просветительских кампаний, а также полное или частичное использование в методических, информационных, учебных и иных целях в соответствии с действующим законодательством РФ.

Бородино, 2023

ТЕЗИСЫ

Продукты метаболизма нитратов в организме могут заметно влиять на физиологию организма в целом. Для анаэробных микроорганизмов ротовой полости характерно нитратное дыхание, при котором нитрат-ион (NO^{3-}) служит конечным акцептором электронов, т.е. идёт процесс денитрификации (восстановления нитратов).

В ходе исследования выявлено действие микрофлоры ротовой полости человека на метаболизм нитратных соединений, попадающих в организм с продуктами питания, и определены некоторые условия, изменяющие данный процесс. Процесс метаболизма нитратов в ротовой полости изучался с помощью цифрового оборудования «РобикЛаб» посредством работы с нитратселективным электродом.

Данное исследование показало, что анаэробные микроорганизмы, населяющие ротовую полость, способны утилизировать поступающие с пищей нитраты. Для человека это имеет значение как положительное, так и отрицательное. При повышенной температуре тела человека процесс денитрификации происходит гораздо быстрее. Антибиотики и антиоксиданты растительного происхождения замедляют процесс восстановления нитратов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дерягина В.П., Жукова Г.Ф., Хотимченко С.А. Содержание в продуктах питания нитратов и нитритов и оценка их поступления с суточным рационом // Вопросы питания. — 1993. — №4. — С.47-52
2. <https://uchitel.pro/нитраты-соли-азотной-кислоты/> Нитраты (соли азотной кислоты) <22.12.22>
3. <https://eduherald.ru/article/view?id=20995> Влияние нитратов и нитритов на организм человека<22.12.2022>
4. <https://www.dissercat.com/content/metabolizm-nitratov-rotovoi-zhidkosti-cheloveka> <12.03.2023>
5. https://www.invitro.ru/upload/docs/sluyna_PCR.pdf Инструкция по сбору слюны <12.03.2023>

ВВЕДЕНИЕ

Организм животного не способен восстанавливать нитраты, поскольку ткани животных не содержат нитрат- и нитрит восстанавливающих ферментов. Это справедливо лишь в отношении организма животного в чистом виде. Реально же организм человека и любого животного следует рассматривать как комплексную систему «макроорганизм + микроорганизмы, населяющие организм хозяина». В ходе микробной трансформации исходный субстрат превращается через каскад биохимических реакций в продукт, обладающий той или иной биологической или фармакологической активностью.

Нитраты вовлекаются микрофлорой человека в метаболические процессы. Масса поступающих с пищей и водой нитратов может быть достаточно значительна [1]. Поэтому продукты метаболизма нитратов в организме могут заметно влиять на физиологию организма в целом.

Проблемный вопрос: участвует ли микрофлора ротовой полости в преобразовании нитратных соединений, попадающих в организм с продуктами питания и какие условия могут влиять на данный процесс?

Цель: изучить действие микрофлоры ротовой полости человека на метаболизм нитратных соединений, попадающих в организм с продуктами питания, и выявить условия, изменяющие данный процесс.

Гипотеза: под воздействием микрофлоры ротовой полости нитратные соединения превращаются в вещества, оказывающие влияние на здоровье человека; на метаболизм нитратов в ротовой полости оказывают влияние различные факторы (антибиотики, антиоксиданты, температура).

Объект исследования: слюна, содержащая микрофлору ротовой полости.

Предмет исследования: влияние микрофлоры ротовой полости на нитратные соединения.

Практическая значимость: получение информации о метаболизме нитратов в организме человека и механизме влияния полученных веществ на здоровье; выполнение профилактических научно-обоснованных рекомендаций.

Задачи:

1. Изучить информацию об использовании нитратов человеком и их роль для производства продуктов питания.
2. Изучить микроорганизмы, живущие в ротовой полости и выявить их роль в метаболизме.
3. Исследовать вопрос об оказании нитратами вреда здоровью человека и узнать, за счёт какого механизма это происходит.

- 4.** Провести практическое исследование на цифровом оборудовании «РобикЛаб»: экспериментальным путём определить факт метаболизма нитратов в ротовой полости; рассмотреть влияние различных факторов (температура, антибиотики, антиоксиданты) на скорость метаболизма нитратов.
- 5.** Сделать выводы о влиянии микрофлоры ротовой полости на нитратные соединения, попадающие в организм с продуктами питания, и условиях, изменяющих данный процесс.

Методы исследования:

1. Работа с информационными источниками.
2. Эмпирические методы: эксперимент, сравнение.
3. Работа с цифровым оборудованием и программным обеспечением «РобикЛаб»
4. Работа на компьютере (оформление исследования, подготовка доклада и презентации)

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ПРОБЕМЫ

1.1 Использование нитратов человеком и их роль для производства продуктов питания

Основное применение нитратов — удобрения (селитры), взрывчатые вещества (аммониты), получение стекла, производство лекарств, пищевые добавки при производстве колбас, в пиротехнике, компоненты ракетного топлива.

Больше всего нитратов попадает в организм с растительной пищей — до 70%. Азот — основной строительный материал для любого растения, поэтому для нормального развития растений и получения хороших урожаев используются органические и неорганические азотосодержащие удобрения: аммиачная селитра, калиевая, натриевая селитра, сернокислый аммоний и др. Особенно активно растения накапливают нитраты в период роста и созревания, а к моменту сбора урожая их количество обычно уже не превышает нормы. Чтобы исключить возможность превышения норм нитратов в овощах и фруктах, инструкции запрещают вносить удобрения незадолго до сбора урожая.

Нитраты и нитриты также могут использоваться в качестве добавок в пищевых продуктах животного происхождения. Нитриты (нитрит натрия — E249, нитрит калия — E250) и нитраты (нитрат натрия — E251, нитрат калия — E252) разрешены в качестве пищевых добавок в Европейском Союзе в соответствии с Регламентом Комиссии (ЕС) № 1129/2011. Они используются в пищевых продуктах для стабилизации переработанного мяса и сыра. Регламент определяет максимальное количество нитритов и нитратов, которое может быть добавлено в качестве пищевой добавки во время обработки пищевых продуктов. Нитриты используются при копчении, солении, мариновании в качестве консерванта, антибактериального и подсаливающего ингредиента. Термообработка и высокое содержание белка способствуют превращению нитритов в канцерогены-нитрозамины. Количество нитрита, разрешенное для использования в переработанном мясе, в настоящее время составляет 150 мг/кг, за исключением стерилизованных мясных продуктов, для которых ограничение составляет 100 мг/кг. Нитриты добавляют к мясу в качестве консерванта, так как они предотвращают окисление жирных кислот, предотвращая прогоркость и контролируя *Clostridium botulinum*. Воздействие нитритов от обработанного мяса составляет лишь относительно небольшое количество общего воздействия нитритов с пищей (5-7%)[2].

1.2. Микроорганизмы, живущие в ротовой полости и их роль в метаболизме

Ряд исследований показал высокие уровни нитратов в слюне после введения нитратов добровольцам. Высокие концентрации нитратов в слюне возникают благодаря активному поглощению системно поглощенных нитратов слюнными железами и секреции в слюну. Количественная оценка состоит в том, что около 25% поглощенных нитратов секретируется

обратно в слону. Доля нитратов в слюне восстанавливается до нитрита комменсальными бактериями, расположенными главным образом у основания языка. По-видимому, существует прямая связь между концентрациями нитратов и нитритов в слюне и нитратами, поступающими в организм человека с пищей, так что около 20% нитратов слюны восстанавливается до нитрита в полости рта.

Аutoхтонную флору полости рта образуют резидентные (постоянно обитающие) и транзиторные (временно присутствующие) микробы. Последние наиболее часто включают условно-патогенные и патогенные виды и проникают в полость рта прежде всего из окружающей среды; эти микроорганизмы не вегетируют в полости рта и быстро удаляются из неё. Аллохтонные микробы попадают в полость рта из других микробных биотопов (например, из кишечника или носоглотки).

Среди бактерий, обитающих в полости рта, доминируют маловирулентные зеленящие стрептококки; *S. hominis* и *S. mitis* обитают на слизистой оболочке, а *S. sanguis* и *S. mutans* колонизируют поверхность зубов. Микроорганизмы разлагают углеводы, вызывая закисление pH, что приводит к декальцинации эмали зубов, а также образуют из сахарозы полисахариды. Из полисахаридов образуются декстран, способствующий образованию зубных бляшек, и леван, разлагающийся в дальнейшем до кислот.

Среди прочей аэробной флоры полости рта второе место занимают нейссерии, составляющие до 5% от общего количества аэробных бактерий. В частности, *N. sicca* выделяют у 45% лиц, *N. perflava* — у 40%, *N. subflava* — у 7%, *N. cinerea* — у 3%. Нейссерии обычно колонизируют носоглотку и поверхность языка. В состав микробных сообществ могут входить *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius* и др. Лактобактерии способствуют развитию кариозного процесса, образуя большое количество молочной кислоты.

Среди анаэробных грамположительных кокков из полости рта выделяют пептококки (*P. niger*) и пептострептококки (чаще *P. prevotii*). Бактерии не ферментируют углеводы, а для получения энергии разлагают пептоны и аминокислоты. Грам-отрицательные анаэробные бактерии представлены бактероидами, фузобактериями и лепто-трихиями. Они ферментируют углеводы до газа и разлагают пептоны до аминокислот, нередко имеющих гнилостный запах; чаще обитают в десневых карманах. До 1% анаэробной флоры составляют фузобактерии (*F. plauti*, *F. nucleatum* и др.). В ассоциациях со спирохетами они входят в состав аutoхтонной флоры десневых карманов; при ферментации углеводов в большом количестве образуют молочную кислоту; вызывают ульцеромембранный стоматит, корневые гранулёмы и воспаление тканей десны.

Нормальная микрофлора человека.

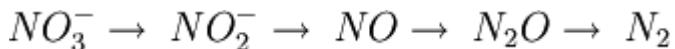
Leptotrichia buccalis — строгий анаэроб, не проявляет тенденции к ветвлению и в качестве основного метаболита образует молочную кислоту. *L. buccalis* — центр осаждения зубного налёта и зубного камня. Доказано их участие в развитии кариеса за счёт значительного кислотообразования, причём *L. buccalis* является синергистом лактобацилл и участвует в процессах деминерализации тканей зуба.

Ветвящиеся анаэробные грамположительные бактерии полости рта представлены актиномицетами и бифидобактериями. Актиномицеты ферментируют углеводы с образованием кислот, способствующих повреждению эмали зубов, и проявляют умеренную протеолитическую активность. [3]

1.3 Процессы денитрификации у бактерий

Денитрификация (восстановление нитрата) — сумма микробиологических процессов восстановления нитратов до нитритов и далее до газообразных оксидов и молекулярного азота. Осуществляется только прокариотами (причём как бактериям, так и археям) в анаэробных условиях и связана с получением ими энергии.

Диссимиляционное восстановление нитрата является процессом анаэробного дыхания, то есть использования нитратов и продуктов их частичного восстановления вместо кислорода для окисления веществ (у разных микроорганизмов как органических, так и минеральных) в ходе метаболизма с выделением энергии. Поэтому денитрификация — процесс анаэробный. Энергетическая эффективность процесса при восстановлении нитратов до молекулярного азота составляет около 70 % от аэробного дыхания с использованием кислорода.



Катализируют реакции нитратредуктаза, NO-образующая нитритредуктаза, редуктаза окиси азота и редуктаза закиси (гемиоксида) азота соответственно. [7]

1.4 Механизм оказания нитратами вреда здоровью человека

Влияние на здоровье людей из-за воздействия на человека нитратов и нитритов с пищей может варьироваться в зависимости от образа жизни (статус курения, физическая подготовка, характер питания), физиологических факторов (возраст, кислотность желудка, риск атеросклероза, ожирение) и факторов окружающей среды (концентрация нитратов в воде, состояние почвы, методы приготовления и хранения пищи). [3]

Выделяют первичную токсичность собственно нитрат-иона; вторичную, связанную с образованием нитрит-иона, и третичную, обусловленную образованием из нитритов и аминов нитрозаминов. Кроме того, одним из конечных продуктов метаболизма нитратов в организме является NO, роль которого в качестве «клеточного гормона» активно изучается.

Трансформация нитратов в пищеварительном тракте начинается в ротовой полости. Эти превращения изучены мало. Хотя именно ферментативной активностью ротовой жидкости объясняется присутствие ксенобиотиков в ротовой полости человека.

Протекающие в полости рта воспалительные процессы оказывают влияние на определяемый уровень нитритов и нитратредуктазную активность. [4]

Смертельная доза нитратов для человека 8 — 15 г, допустимое суточное потребление — 5 мг/кг. Многие растения способны накапливать большие количества нитратов, например: капуста, кабачки, петрушка, укроп, свекла столовая, тыква и др. Такие растения называют нитрато-накопителями. В организм человека 70% нитратов поступает с овощами, 20% — с водой, 6% — с мясом и рыбой. Попадая в организм человека, часть нитратов всасывается в желудочно-кишечном тракте в неизмененном виде, другая часть, в зависимости от присутствия микроорганизмов, значения pH и других факторов, может превращаться в более ядовитые нитриты, аммиак, гидроксиламин NH_2OH ; в кишечнике из нитратов могут образоваться вторичные нитрозамины $\text{R}_2\text{N}-\text{N}=\text{O}$, обладающие высокой мутагенной и канцерогенной активностью. Признаки небольшого отравления — слабость, головокружение, тошнота, расстройство желудка и т. д. Снижается работоспособность, возможна потеря сознания.[2]

Нитриты играют особую роль в физиологии человека. Некоторые из физиологических свойств, связанных с NO, полученным из нитрита у человека, связаны с артериальным давлением, иммунным ответом, образованием биопленки. Однако в кислой среде или в условиях окислительного стресса он может быть преобразован в ряд активных форм азота. К активным формам азота относятся оксид азота (NO), диоксид азота (NO_2) и пероксинитрит (ONOO^-), NO_2 и ONOO — наиболее реакционноспособные соединения. В живых системах их образование регулируется за счет того, что они участвуют в разнообразных биологических функциях. Однако его неконтролируемое внутриклеточное присутствие вызывает значительную токсичность, поскольку он может воздействовать на различные биомолекулы, включая белки, ДНК, липиды и углеводы. Таким образом, появление нитритов и NO на относительно высоких уровнях в условиях нитрозативного стресса может быть связано с рядом неблагоприятных событий, таких как мутагенез, канцерогенез.[3]

ГЛАВА 2. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

2.1 Методика сбора слюны

Для исследования необходима порция слюны. Контейнер для сбора биоматериала можно также приобрести в аптеке. Сбор слюны должен проводиться строго до начала применения антибактериальных препаратов или не ранее, чем через 10-14 дней после их отмены (для

местных антибиотиков), и не ранее, чем через один месяц после применения антибиотиков перорально.

Необходимо собрать порцию слюны в стерильный контейнер с крышкой.

Как собирать слюну.

1. Перед сбором слюны рекомендуется провести трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором или кипяченой водой.
 2. Сбор слюны у детей можно проводить стерильным шприцем объемом 2-5 мл (без иглы!) из защечного пространства в микропробирку, наполнив ее слюной до половины.
 3. Следует собрать не менее 1 мл слюны.
 4. Плотно закрыть контейнер крышкой для предотвращения вытекания биоматериала.
- Микропробирку закрыть плотно до щелчка.

Материал может быть сохранен при температуре +2...+8°C не более 10-12 часов. [5]

2.2 Изучение процесса метаболизма нитратов в ротовой полости с помощью цифрового оборудования «РобикЛаб»

Особенности нитратселективного электрода

Нитратселективный электрод типа ХС-НО3-001 предназначен для измерения активности (при обеспечении условия постоянства ионной силы растворов - концентрации) нитрат-ионов NO_3^- в водных растворах. Основные области применения электрода: экологический мониторинг природных, сбросных и сточных вод, контроль технологических процессов, медико-биологические исследования, геология и т.д. Измерения могут проводиться как в лабораторных, так и в полевых условиях. Электрод рассчитан для работы в качестве индикаторного в паре с любым электродом сравнения (например, ЭВЛ-1МЗ, либо с солевым мостиком) в комплекте с цифровым милливольтметром, иономером с входным сопротивлением не менее 10^{10} Ом.

Принцип работы и применение

Ионоселективный электрод типа ХС.001 является ионоселективным электрохимическим датчиком, потенциал которого зависит от концентрации в растворе ионов определенного сорта. Под селективностью понимается способность электрода реагировать практически только на концентрацию потенциалопределяющих (основных) ионов в сложных по составу растворах в присутствии других (мешающих) ионов.

Ионоселективный электрод отмывают дистиллированной водой, а затем проводят калибровочное измерение в приготовленных стандартных растворах, последовательно меняя концентрацию раствора от меньшей к большей.

Измерения потенциала при калибровке и последующем определении концентрации нитрата в анализируемом растворе целесообразно проводить в стандартизованных условиях:

- при постоянном перемешивании с фиксированной скоростью,
- при постоянном времени измерения, например - 2 мин.

По окончании измерений электрод промывают дистиллированной водой.

По полученным данным строят график зависимости потенциала электрода от отрицательного логарифма концентрации ионов нитрата в растворе.

Проведение измерений

Измеряем потенциала электрода в анализируемом растворе. Сравниваем полученное значение потенциала с калибровочным графиком определяют концентрацию нитрат-ионов в анализируемой пробе.[6]

2.3 Влияние различных факторов (температура, антибиотики, антиоксиданты растительного происхождения) на скорость метаболизма нитратов

1. Определяем концентрацию (C) нитрат-ионов в слюне.

$C=0$ моль/л

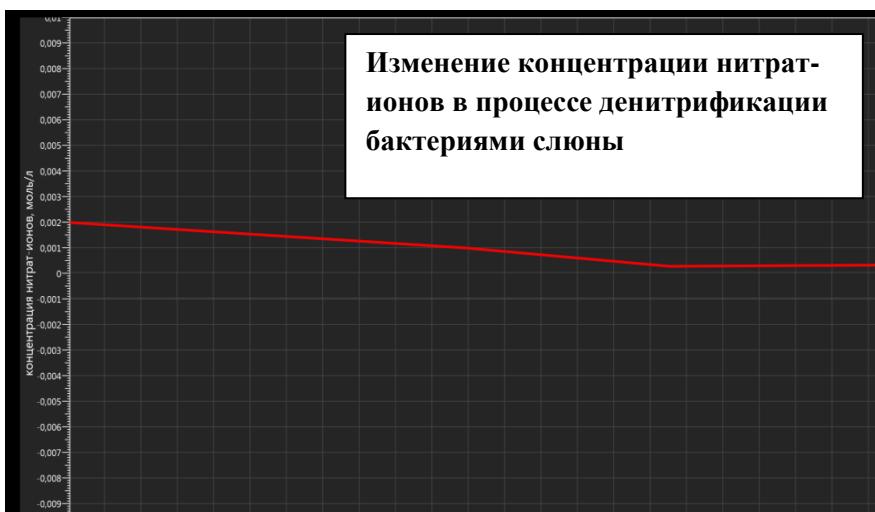


2. К порции слюны объёмом 4 мл добавляем 0,5 мл раствора нитрата натрия и определяем концентрацию (C) полученной смеси. (Необходимый объём нитратов рассчитан на основе возможного количества потребления нитратов с продуктами питания). $C=0,002$ моль/л



3. Определяем концентрацию (С) нитрат-ионов в слюне через 2ч.

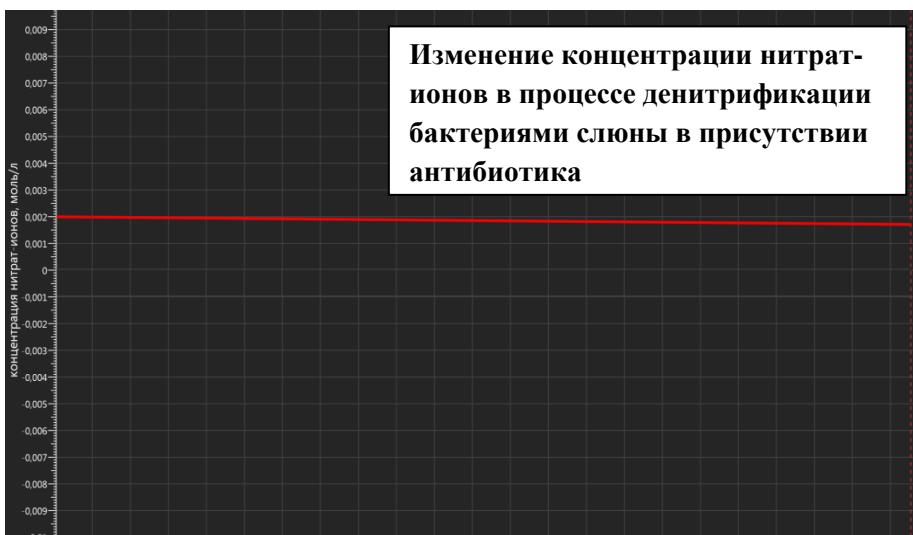
$C=0,0003$ моль/л. Прошёл процесс денитрификации бактериями ротовой полости (слюны).



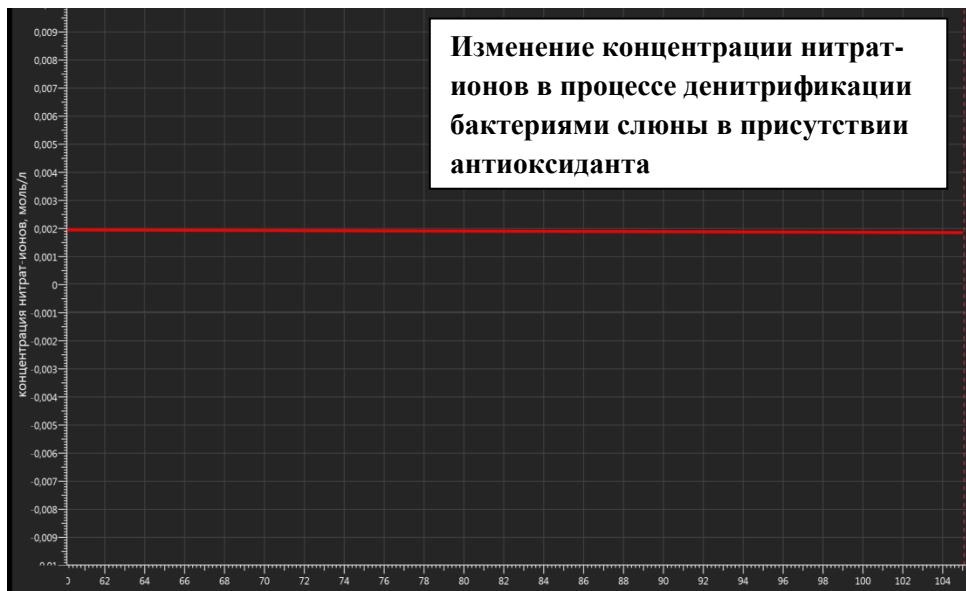
4. В новую порцию слюны объёмом 4 мл с такой же исходной концентрацией нитрат-ионов (0,002 моль/л) добавляем небольшое число гранул **антибиотика** амоксиклава, ждём полного растворения лекарства.

Через 2ч проверяем концентрацию (C) нитрат-ионов. C=0,0018 моль/л.

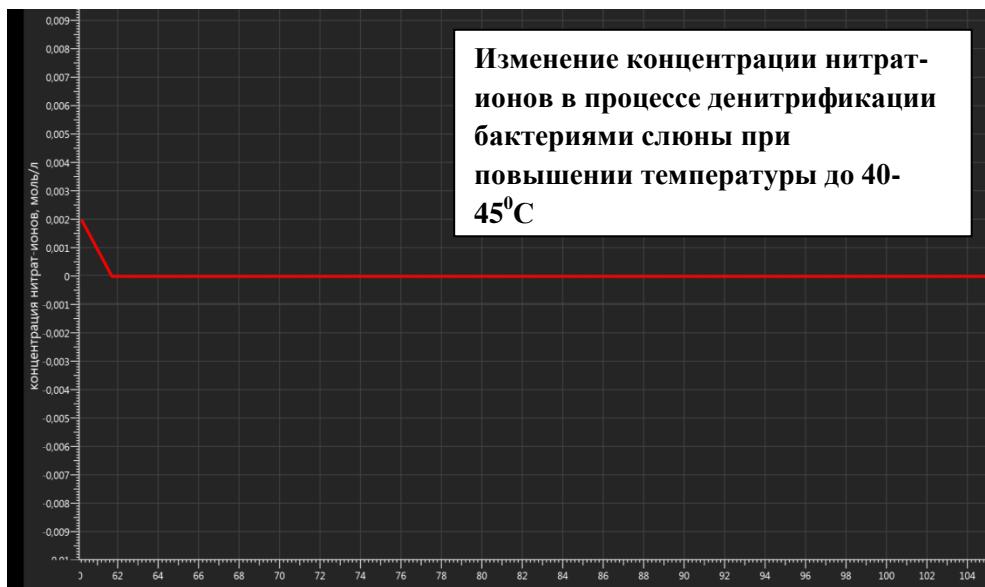
Заметно торможение процесса денитрификации (восстановления нитратов).



5. В новую порцию слюны объёмом 4 мл с такой же исходной концентрацией нитрат-ионов (0,002 моль/л) добавляем половину содержимого одной капсулы **антиоксиданта растительного происхождения** – витамина Е (альфа-токоферола ацетат). Через 2ч проверяем концентрацию (С) нитрат-ионов. С=0,0019 моль/л. Заметно торможение процесса денитрификации (восстановления нитратов).



6. Новую порцию слюны объёмом 4 мл с такой же исходной концентрацией нитрат-ионов (0,002 моль/л) нагреваем до 40-45°C. Через 2 мин. концентрация снижается практически до 0 моль/л. Заметно активное влияние повышения температуры на процесс денитрификации (восстановление нитратов). Денитрификация происходит практически полностью в течение короткого периода времени (1-2 мин.)



ВЫВОДЫ

1. Метаболическое превращение нитратов (их восстановление) осуществляется микробами жидкости ротовой полости (в слюне образуются продукты метаболизма нитратов – нитриты и др.)
2. Ферментативный комплекс восстановления нитратов имеет оптимальные показатели: рН-оптимум слюны в обычном здоровом состоянии 6,9 - 7,1 и активный температурный оптимум 40-45°C.

4. Антибиотики, использующиеся в медицинской практике, тормозят восстановление нитратов в ротовой жидкости.
5. Антиоксиданты растительного происхождения (витамин Е) и продукты, их содержащие, вызывают торможение восстановления нитратов в ротовой жидкости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Организм человека (и животных) характеризуется неспособностью к реакциям восстановления нитратного азота. Но это справедливо лишь при рассмотрении человека (животного) без населяющей его микрофлоры. Для анаэробных микроорганизмов ротовой полости характерно нитратное дыхание, при котором нитрат-ион (NO_3^-) служит конечным акцептором электронов, т.е. идёт процесс денитрификации (восстановления нитратов).

Данное исследование показало, что анаэробные микроорганизмы, населяющие ротовую полость, способны утилизировать поступающие с пищей нитраты.

Для человека это имеет значение как положительное, так и отрицательное.

положительное значение:

- а) процесс нитратного дыхания анаэробов ротовой полости ограничивает рост патогенной микрофлоры;
- б) с помощью процесса денитрификации, происходящего в ротовой полости, происходит частичное усвоение минерального азота (нитратов);
- в) процесс денитрификации противодействует смещению pH в опасную для зубов кислую (за счёт молочнокислого брожения) область;

отрицательное значение:

образующиеся в процессе восстановления нитратов метаболиты (нитриты, нитроксины, оксид азота, нитрозамины), всасываясь через слизистую, оказывают негативное влияние на макроорганизм, т.е. организм человека; эти соединения способствуют интоксикации организма и протеканию в клетках канцерогенных процессов.

По результатам проведённых экспериментов можно сделать заключение, что при повышенной температуре тела человека процесс денитрификации происходит гораздо быстрее, следовательно, токсичные нитратные метаболиты более быстро поступают в клетки организма.

Антибиотики замедляют процесс восстановления нитратов по причине негативного влияния на организм бактерий ротовой полости.

Антиоксиданты растительного происхождения способствуют замедлению процесса денитрификации, из-за чего метаболиты-токсины (нитриты, нитроксины, оксид азота, нитрозамины) не имеют возможности попасть в клетки организма. Данный факт подтверждает положительное значение растительных антиоксидантов для организма человека.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дерягина В.П., Жукова Г.Ф., Хотимченко С.А. Содержание в продуктах питания нитратов и нитритов и оценка их поступления с суточным рационом // Вопросы питания. — 1993. — №4. — С.47-52
2. <https://uchitel.pro/нитраты-соли-азотной-кислоты/> Нитраты (соли азотной кислоты) <22.12.22>
3. <https://eduherald.ru/article/view?id=20995> Влияние нитратов и нитритов на организм человека<22.12.2022>
4. <https://www.dissercat.com/content/metabolizm-nitratov-rotovoi-zhidkosti-cheloveka> <12.03.2023>
5. https://www.invitro.ru/upload/docs/slunya_PCR.pdf Инструкция по сбору слюны <12.03.2023>
6. Нитратселективный электрод ХС-NO₃-001 // Паспорт и руководство по эксплуатации ООО «Сенсорные системы». – С.-Пб – 2018
7. <https://bibliotekar.ru/2-7-55-biologiya-pochv/48.htm> <16.03.2023>