

SELECTAREA COORDONATĂ A ASOCIAȚIILOR DE MICROORGANISME CU POTENȚIAL SANOBOTIC

Maria TIMOȘCO, Natalia FLOREA, Radu COJOCARU**,
Aliona VELCIU, Victoria BOGDAN*

Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM

**USMF „Nicolae Testemițanu”*

***Centrul Național de Sănătate Publică*

În experimente asupra animalelor model (cobailor) a fost constatat că rezultatele obținute la testarea unor asociații microbiene alcătuite în premieră (în baza monotulpinilor autohtone) au condiționat selectarea celor mai active. Ele au inclus monotulpini de microorganisme – reprezentante ale tractului gastrointestinal uman (cu Nr.26, 41, 59, 144 sau 14, 105, 133). Este argumentată recomandarea asociațiilor microbiene selectate pentru includere în componența unor preparate cu destinație sanogenă. Ele vor favoriza constituirea bacteriocenozei intestinale la copii și nou-născuți, de asemenea o vor reconstitui în cazul dismicrobismului și disfuncțiilor intestinale diareice, deoarece au demonstrat existența potențialului sanobiotic.

Cuvinte-cheie: probiotic, dismicrobism, tract gastrointestinal.

SELECTION OF ASSOCIATIONS OF MICRO COORDINATE BODIES WITH POTENTIAL SANOBOTIC

In experiments on animal models (rats) it has been found that the results of the testing of microbial associations made the first (based on local monotulpinilor) have resulted in selection of the most active. They included monotulpini of microorganisms - representatives of the human gastrointestinal tract (with No.26,41,59,144 or 14105133). It reasoned recommendation microbial associations selected for inclusion in the composition of preparations intended for sanogenic. They will gut favorites establishment bacterial microflora of children and babies, also will restore her if dismicrobism and diarrheal bowel dysfunction because they demonstrated potential sanobiotic.

Keywords: probiotic, dismicrobism, gastrointestinal tract.

Introducere

Cercetările științifice efectuate până la etapa actuală au constatat că dereglările funcționale ale tractului gastrointestinal uman, inclusiv dismicrobismul, sunt cauzate, într-o măsură considerabilă, de influența stresogenă excesivă asupra macroorganismului a diverșilor factori ai mediului ambiant (climaterici [18,21], alimentari [2,5-6,11,16], microbieni [15,18]).

Prin aceasta și s-a lămurit răspândirea largă a disfuncțiilor intestinale diareice, fiind supuse tratamentului, preponderent, cu utilizarea remediilor medicamentoase de origine microbială. Se cunoaște că ultimele sunt de două categorii, fiindcă exercită asupra macroorganismului influență directă sau indirectă. Dacă primele se consideră și de acțiune probiotică, iar la baza lor stau monotulpini, politulpini și polispecii de microorganisme din genurile obligative tubului digestiv [17-18,27,29], apoi la baza celor de categoria a doua – numai tulpini specifice mediului ambiant sau surselor alimentare [10 ș.a.].

Cu luarea în considerare a cerințelor sanocreatologiei, în practica medicală ar trebui să fie utilizate, preponderent, preparatele microbiene de influență directă sau cele ce conțin reprezentanți ai genurilor *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ș.a. Anume aceste combinații de probiotice, constituie bacteriocenoza obligativă a tractului gastrointestinal [7,12,18 ș.a.]. Însă, în ultima vreme tot mai des se prescriu cele pregătite în baza microorganismelor din genul *Bacillus* (pe exemplul „Subtylului” sau „Bactisubtylului” ș.a.), care exercită numai influență indirectă. În această ordine de idei, ținem să menționăm că cea mai mare sensibilitate față de acțiunea factorilor mediului ambiant asupra macroorganismului a fost depistată la reprezentanții florei microbiene intestinale din genurile obligative: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ș.a. [7,15-16]. Concomitent este de menționat că în literatura de specialitate tot mai des se atrage atenție la faptul prezenței la ele a multiplelor proprietăți utile pentru macroorganism, demonstrând activitate antagonistă față de provocatorii maladiilor intestinale [3,10,18,26], capacitate adezivă [4,10,18,26], diversitate [24], specificitate [23], semnificație în supraviețuire și sănătate [1,5,10,14,19-20,28,30-31].

Cele expuse confirmă opinia, potrivit căreia se cere continuarea scriningului compozițiilor pentru includerea în preparatele microbiene autohtone de acțiune directă. De aceea, multe lucrări precedente, inclusiv ale noastre, au fost dedicate evidențierii proprietăților utile sau sanobiotice ale monotulpinilor și asociațiilor de reprezentanți ai genurilor obligative tubului digestiv [5,6,8-9,13,22-24,25-26].

Aceasta a argumentat ca scopul prezentei lucrări să prevadă selectarea, în mod coordonat și în condiții *in vivo*, asociațiilor de microorganisme cu potențial sanobiotic sau cu o perspectivă prolongată prin experimentarea pe animale-model.

Material și metode

Pentru atingerea scopului nominalizat au fost realizate cercetări experimentale pe cobai divizați în șase loturi, dintre care primul a servit în calitate de lot-martor, iar II-VI – experimentale. Cobaii din lotul-martor n-au primit tulpini de bacterii, iar celor din lotul II li s-a administrat peroral suspensia microbială a asociației alcătuite din două tulpini de bifidobacterii (26 și 14) și una de lactobacili (72); celor din lotul III – de asemenea asociația a două tulpini de bifidobacterii și una de lactobacili (respectiv, cu nr.41, 33 și 105); celor din lotul IV – două tulpini de bifidobacterii (nr.14 și 47) și două de lactobacili (nr.72 și 59); celor din lotul V – de asemenea asociația a două tulpini de bifidobacterii (nr. 26 și 41) cu una de lactobacili (nr. 59) și una de lactococi (144); celor din lotul VI – o tulpină de bifidobacterii (nr.14) cu una de lactobacili (nr.105) și una de enterococi (nr.133).

În procesul investigațional de la toate animalele au fost colectate mostre de conținut intestinal (rectal) care au fost supuse diluării (de la 10^{-1} până la 10^{-9}) și inoculării (pe medii nutritive electiv pentru fiecare gen de microorganisme).

Rezultate și discuții

Cercetările mostrelor au fost efectuate la începutul și la finalele experimentelor cu determinarea indicilor cantitativi ai microorganismelor din genurile obligative (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*) și facultative (genurile *Escherichia*, *Proteus* și familia *Streptococcaceae*). Calcularea datelor finale s-a realizat prin înmulțirea cantității de colonii de bacterii (crescute pe medii de cultură agarizate) la valoarea diluției și logaritma-rea zecimală.

Rezultatele obținute, exprimate în logaritmi zecimali (log), sunt relatate în Tabelul 1.

Tabelul 1

Indicii cantitativi ai unor reprezentanți ai bacteriocenozei intestinale la cobai fără și cu administrarea asociațiilor microbiene în baza monotulpinilor autohtone de microorganisme

Lotul animalelor	Genurile microorganismelor	Cantitatea celulelor microbiene la 1g de conținut intestinal, logaritmi zecimali (log)		Deosebirea față de inițial	
		Inițial	Final	Log	%
I	1	4,34±0,14	4,50±0,13	+0,16	< 3,68
	2	4,17±0,15	4,59±0,14	+0,42	<10,07
	3	8,83±0,16	8,88±0,15	+0,05	< 0,56
	4	5,11±0,15	5,23±0,14	+0,12	< 2,34
	5	8,74±0,14	8,92±0,13	+0,18	< 2,05
II	1	4,46±0,15	7,64±0,12	+3,18	<71,78
	2	4,30±0,16	8,53±0,13	+4,23	<98,37
	3	9,04±0,14	6,38±0,11	-2,66	>29,42
	4	6,07±0,13	3,11±0,09	-2,96	>48,76
	5	9,11±0,15	7,60±0,13	-1,51	>16,57
III	1	4,43±0,12	7,50±0,11	+3,07	<69,30
	2	4,23±0,13	8,34±0,10	+4,11	<97,16
	3	8,90±0,15	6,46±0,13	-2,44	>27,41
	4	5,20±0,14	3,23±0,12	-1,97	>37,88
	5	8,86±0,16	7,43±0,14	-1,43	>16,13

IV	1	4,50±0,16	7,86±0,10	+3,36	<74,66
	2	4,41±0,14	8,74±0,12	+4,33	<98,18
	3	8,84±0,15	6,20±0,13	-2,64	>29,86
	4	5,00±0,13	3,07±0,08	-1,93	>38,60
	5	8,92±0,17	7,53±0,11	+1,39	>15,58
V	1	4,47±0,12	8,36±0,11	+3,89	< 87,02
	2	4,32±0,15	8,64±0,08	4,32	<100,00
	3	8,81±0,13	5,73±0,15	-3,08	> 34,96
	4	5,04±0,11	1,17±0,07	-3,87	> 76,78
	5	8,80±0,16	6,49±0,13	-2,31	> 26,25
VI	1	4,53±0,15	9,04±0,09	4,51	< 99,55
	2	4,43±0,13	9,17±0,07	+4,47	<100,00
	3	8,90±0,16	5,32±0,14	-3,58	> 40,22
	4	5,20±0,12	1,07±0,08	-4,13	> 79,42
	5	8,77±0,14	6,41±0,11	-2,36	> 26,90

Notă: Lotul animalelor: I – martor; II-VI – experimentale.

Genurile microorganismelor: 1 – *Bifidobacterium*; 2 – *Lactobacillus*; 3 – *Escherichia*; 4 – *Proteus* și 5 – familia *Streptococcaceae*.

Analizând datele obținute putem afirma că toate asociațiile microbiene testate au demonstrat o influență benefică asupra microbiocenozei intestinale, contribuind la intensificarea procesului de multiplicare a bacteriilor din genurile obligative *Bifidobacterium* și *Lactobacillus* (respectiv, în loturile II-VI cu 71,78 și 98,37%; cu 69,30 și 97,16%; cu 74,66 și 98,18%; cu 87,02 și 100,00%; cu 99,55 și 100,00%), precum și la reducerea intensității ei la cele facultative (respectiv, a genurilor *Escherichia*, *Proteus* și a familiei *Streptococcaceae*). Valoarea numerică a acestora la animalele din aceleași loturi era mai mică față de datele inițiale (respectiv, a genurilor *Escherichia*, *Proteus* și a familiei *Streptococcaceae* cu 29,42; 48,76 și 16,57%; cu 27,41; 37,88 și 16,13%; cu 29,86; 38,60 și 15,58%; cu 34,96; 76,78 și 26,25%; cu 40,22; 79,42 și 26,90%). Deci, în baza acestor date, asociațiile monotulpinilor de microorganisme administrate cobailor din loturile V și VI (Nr.26, 41, 59, 144 și 14, 105, 133) s-au dovedit a fi cele mai de perspectivă.

În continuare (după decapitarea animalelor experimentale) s-a atras atenția la valoarea numerică a celulelor microbiene aderente la 1g de omogenat de mucoasă a intestinului subțire, iar datele studiului indicilor capacității adezive a asociațiilor microbiene experimentate sunt incluse în Tabelul 2.

Tabelul 2

Indicii cantitativi ai unor reprezentanți ai bacteriocenozei intestinale aderați la mucoasa colonului la cobai fără și cu administrarea compozițiilor microbiene în baza tulpinilor autohtone de microorganisme selectate în cadrul prezentului proiect

Lotul	Microorganismele	Cantitatea celulelor microbiene aderente la 1g de omogenat intestinal, logaritmi zecimali (log)	Deosebirea față de lotul martor	
			log	%
I	1	3,59±0,14		0
	2	3,77±0,12		0
	3	7,92±0,15		0
	4	4,20±0,16		0
	5	7,83±0,14		0
II	1	5,60±0,10	+2,01	< 55,98
	2	7,54±0,12	+3,77	<100,00
	3	5,80±0,13	-2,12	>26,76
	4	2,30±0,11	-1,90	> 45,23
	5	6,62±0,12	-14,21	>15,45

III	1	5,53±0,12	+1,94	<54,03
	2	7,62±0,11	+3,85	<102,12
	3	5,77±0,14	-2,15	>27,14
	4	2,50±0,10	-1,70	>40,47
	5	6,65±0,11	-1,18	>15,07
IV	1	5,88±0,11	+2,29	<63,78
	2	7,79±0,13	+4,02	<106,63
	3	5,86±0,12	-2,06	>26,01
	4	2,32±0,10	-1,88	>44,76
	5	6,80±0,14	-1,03	>13,15
V	1	6,38±0,09	+2,79	<77,71
	2	7,69±0,10	+3,92	<103,97
	3	4,59±0,11	-3,33	>42,04
	4	0	-4,20	>100,00
	5	5,60±0,12	-2,23	>28,48
VI	1	6,92±0,08	+3,33	<92,75
	2	7,98±0,09	+4,21	<111,67
	3	4,64±0,13	-3,28	>41,41
	4	0	-4,20	>100,00
	5	5,54±0,11	-2,29	>29,24

Notă: Lotul – loturile de cobai și genurile de microorganisme sunt adecvate celor din Tabelul 1 .

Datele sistematizate în Tabelul 2 demonstrează că toate asociațiile microbiene administrate cobailor peroral au contribuit la sporirea capacității adezive a microorganismelor din genurile obligative tubului digestiv (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*) și la diminuarea acesteia la cele facultative (genurile *Escherichia*, *Proteus* și la familia *Streptococcaceae*). Asemenea fapt este confirmat prin creșterea valorii numerice a bifidobacteriilor și lactobacililor, fiind mai mare la animalele din loturile experimentale (II-VI) față de cele din lotul-martor (respectiv, cu 55,98, 54,03, 63,78, 77,71, 92,75%), precum și prin scăderea indicilor cantitativi ai escherichiilor, proteilor și streptococilor la 1g de omogenat intestinal (respectiv cu 26,76, 45,23 și 15,45%; cu 27,14; 40,47 și 15,07%; cu 26,01, 44,76 și 13,15%; cu 42,04, 100,00 și 28,48%; cu 41,41; 100,00 și 29,24%). Deci, conform și acestor rezultate asociațiile microbiene administrate cobailor din loturile V și VI pot fi recomandate spre includere în componența a două remedii medicamentoase predestinate pentru constituirea, reconstituirea și menținerea bacteriocenozei intestinale la nivel optim.

Concluzii

1. Realizarea cercetărilor planificate au contribuit la selectarea celor mai active și perspective asociații de microorganisme – reprezentante ale tractului gastrointestinal uman (prima în baza monotulpinilor cu Nr.26, 41, 59, 144 și a doua – cu Nr.14, 105, 133).
2. Cercetările realizate în cadrul prezentei lucrări argumentează recomandarea asociațiilor selectate spre includere în componența unor preparate microbiene cu destinație sanogenă (pentru constituirea bacteriocenozei gastrointestinale la nou-născuți, precum și pentru reconstituirea ei în cazul dismicrobismului și disfuncțiilor intestinale diareice).
3. În mod experimental în condiții *in vivo* pe animalele-model s-a considerat rațional de a selecta în mod coordonat și a recomanda pentru practică asociații microbiene cu proprietăți utile (antagoniste și adezive), considerându-se în același timp și ca potențial sanobiotic al acestora.

Bibliografie:

1. AHMED, M., PRASAD, J., GILL, H. et al. Impact of consumption of different levels of Bifidobacterium lactis HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects. In: *J. Nutr. Health Aging*, 2007, 11(1):26-31.
2. ALVARO E., ANDRIEUX C. et al. Composition and metabolism of the intestinal microbiota in consumers and non-consumers of yogurt. In: *Br. J Nutr.*, 2007, 97(1):126-133.
3. BOGDAN, V., TIMOȘCO, M. Unele proprietăți probiotice ale microorganismelor genului Enterococcus – reprezentant al bacteriocenozei intestinale. În: *Creșterea impactului cercetării și dezvoltarea capacității de inovare*. Materialele Conferinței științifice cu participare internațională, 21-22 septembrie, USM. Chișinău, 2011, vol.I, p.111.
4. COLLADO, M.C, GUEIMONDE, M. et al. Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. In: *J. Food Prot.*, 2006, 69(7):1675-1679.
5. COLLADO, M.C., MERILUOTO, J., SALMINEN, S. Development of new probiotics by strain combinations: is it possible to improve the adhesion to intestinal mucus? In: *J. Dairy Sci.*, 2007, 90(6):2710-2716.
6. DE ANGELIS, M., SIRAGUSA, S. et al. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. In: *Res. Microbiol.* 2006, 157(8):792-801.
7. EGERVÄRN, M., DANIELSEN, M., ROOS, S. et al. Antibiotic susceptibility profiles of Lactobacillus reuteri and Lactobacillus fermentum. In: *J. Food Prot.*, 2007, 70(2):412-418.
8. FIGLER, M., MOZSIK, G., SCHAFFER, B. et al. Effect of special Hungarian probiotic kefir on faecal microflora. In: *World J. Gastroenterol.*, 2006, 12(7):1129-1132.
9. FLOCH, M.H., MADSEN, K.K., JENKINS, D.J. et al. Recommendations for probiotic use. In: *J. Clin Gastroenterol.*, 2006, 40(3):275-278.
10. GUO, X., LI, D., LU, W. et al. Screening of Bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of Bacillus subtilis MA139 in pigs. In: *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 2006, 90(2):139-146
11. KIM, P.I., JUNG, M.Y., CHANG, Y.H. et al. Probiotic properties of Lactobacillus and Bifidobacterium strains isolated from porcine gastrointestinal tract. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74(5):1103-1111
12. KLINGBERG, T.D., BUDDE, B.B. The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. In: *Int. J. Food Microbiol.*, 2006. 109(1-2):157-159.
13. MARUO, T., SAKAMOTO, M., TODA, T., BENNO, Y. Monitoring the cell number of Lactococcus lactis subsp. cremoris FC in human feces by real-time PCR with strain-specific primers designed using the RAPD technique. In: *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, 110(1):69-76.
14. MARZOTTO, M., MAFFEIS, C., PATERNOSTER, T. et al. Lactobacillus paracasei A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. In: *Res. Microbiol.*, 2006, 157(9):857-866.
15. PENDERS, J., THIJS, C., VINK, C. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. In: *Pediatrics*, 2006, 118(2):511-521.
16. STRUTINSCHI, T., TIMOȘCO, M., VELCIU, A. ș.a. Influența rațiilor alimentare cu diversă structură calorică asupra unor reprezentanți ai microflorei intestinale condiționat-patogene. În: *Sănătate Publică și Management în Medicină*, 2012. nr.5, (44):138-140.
17. TIMMERMAN, H.M., NIERS, L.E., et al. Design of a multispecies probiotic mixture to prevent infectious complications in critically ill patients. In: *Clin. Nutr.*, 2007, 26(4):450-459.
18. TIMOȘCO, M. *Stresul și flora microbială intestinală*. Chișinău, 2005, 172 p.
19. TIMOȘCO, M., BOGDAN, V., VELCIU, A.. Semnificația unor genuri de microorganisme ale familiei Streptococcaceae în activitatea vitală a macroorganismului. În: *Buletin de perinatologie*, 2013, nr.1(57), p.8-11
20. TIMOȘCO, M., FLOREA, N. ș.a. Starea de dismicrobism intestinal – factor amenințător în sănătate. În: *Sănătate Publică și Management în Medicină*, 2012, nr.5(44):141-144.
21. TIMOȘCO, M., FLOREA, N., PERDE, D. Dismicrobismul intestinal cauzat de acțiunea unor factori ai mediului ambiant asupra macroorganismului – consecință negativă în sănătate. În: *Analele Științifice ale UȘMF N.Testemițanu*, ed.XIV. vol.2, 2013, p.54-60.
22. TIMOȘCO, M., FLOREA, N., VELCIU, A. Nivelul compatibilității unor specii de microorganisme aparținente la genurile obligative tubului digestiv uman. În: *Arta Medica*, 2010, nr.4(43), p.31-34
23. TIMOȘCO, M., FLOREA, N., VELCIU, A. ș.a. Bifidobacteriile specifice tubului digestiv uman. În: *Arta Medica*, 2011, nr.4(47), p.49-52.
24. TIMOȘCO, M., VELCIU, A., FLOREA, N., BOGDAN, V. Diversitatea lactobacteriilor și rolul speciilor obligatorii tubului digestiv în menținerea optimală a statusului funcțional intestinal. În: *Sănătate Publică și Management în Medicină*, 2011, nr.4, p.19-22.
25. TIMOȘCO, M., VELCIU, A., FLOREA, N., BOGDAN, V.. Microorganismele din genurile obligatorii tractului gastrointestinal uman cu unele proprietăți potențiale sanobiotice. În: *Imfo-med.*, 2010, 1 (16):36-39; TIMOȘCO, M.,

- VELCIU, A., FLOREA, N.. *Proprietățile de bază ale unor reprezentanți obligativi ai bacteriocenozei intestinale la copii (cercetări clinico-experimentale)*. În: *Buletin de perinatologie. Revistă științifico-practică*, 2010, nr.1, p.32-35.
26. TUOHY, K.M., PINART-GILBERGA, M., JONES, M. et al. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. În: *J. Appl. Microbiol.*, 2007, 102(4):1026-1032.
27. VELCIU, A., TIMOȘCO, M. Starea sănătății și microbiocenozei intestinale la copii de vârstă timpurie postnatală în dependență de modul de alimentare. În: *Buletin de perinatologie*, 2013, nr.6(57), p.34-37.
28. VELCIU, A., TIMOȘCO, M., CIOCHINĂ, V. ș.a. *Diferențierea dismicrobismului și disfuncțiilor intestinale diareice*. Chișinău, 2011, 38 p.
29. VELCIU, A., TIMOȘCO, M., SAINSUS, N., PROCA, V. Bacteriocenoza intestinală a copiilor cu divers mod de constituire. În: *Analele Științifice ale USMF „N.Testemițanu”*. Chișinău, 2008, Ediția IX, vol.2, p.61-64.
30. VELCIU, V., TIMOȘCO, M., SAINSUS, N. Dinamica particularităților bacteriocenozei intestinale la copiii de vârstă fragedă în condițiile presingului ecologic. În: *Analele Științifice ale USMF „N.Testemițanu”*. Chișinău, 2006, Ediția VII, vol.II, p.38-42.

Prezentat la 11.05.2015