

Maria Timošco, Victoria Bogdan, Aliona Velciu
**ELUCIDAREA OPORTUNITĂȚII INCLUDERII ENTEROCOCILOR AUTOHTONI
ÎN COMPONENTA PREPARATELOR MICROBIENE DESTINATE FORTIFICĂRII SĂNĂTĂȚII**
Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM

SUMMARY

**ELUCIDATION OF RATIONALITY TO BE INCLUSION THE AUTOHTONS ENTEROCOCCHI
IN COMPOUND OF MICROBS PREPARATION INTENDING FOR FORTIFICATION OF HEALTH**

Key-words: Local enterococci, intestinal dysbiosis, probiotic microbial preparations, health fortification.

Background: *On the basis of the obtained results proved that the inclusion of local strains of enterococci in the composition of microbial preparations for health fortification at intestinal dysbiosis and disorder expedient. This is justified by rezultates tested the association of microorganisms, including enterococci, compared with other existing microbial preparations, showed the best regulatory effect.*

Material and metods: *The studies were conducted in three series of experiments. The first and second in conditions "in vitro", and the third – "in vivo" (white mice). From the intestinal contents of humans and animals have been isolated pure cultures of enterococci. Selected strains showed high activity (antagonistic and adhesive). To be created a association of enterococci with bifidobacteria and lactobacilli, which was tested on white mice. In the trial study, was used the classical bacteriological methods and elective nutrient media for each type of microorganisms.*

Results: *In laboratory conditions the expediency inclusion of selected local strains of enterococci in the probiotic microbial preparations intended for health fortification in the case of intestinal dysbiosis and disorder.*

Conclusion: *Enterococci there are specific of human and animals. The local strains of bacteria identified elevated to the body, the useful properties. This is confirmed by a factor inhibiting the growth of E. coli and Salmonella, as well as an indicator of adhesion. Specific to human enterococci were more active compared to those isolated from young farm animals.*

More informative were the results of the fourth group, proving the feasibility of using local strains of enterococci for inclusion in the composition of microbial agents, because the association containing enterococci, compared with the existing microbial agents, contributed to more intense positive effects on the body, on the background of intestinal dysbiosis.

РЕЗЮМЕ

**ВЫЯСНЕНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ВКЛЮЧЕНИЯ МЕСТНЫХ ЭНТЕРОКОККОВ В СОСТАВЕ МИКРОБНЫХ
ПРЕПАРАТОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ УКРЕПЛЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ**

Ключевые слова: местные энтерококки, кишечный дисбактериоз, пробиотические микробные препараты, укрепление здоровья.

Актуальность: *На основе полученных результатов доказано, что включение местных штаммов энтерококков в составе микробных препаратов для укрепления здоровья при дисбактериозе и расстройстве кишечника целесообразно. Это обосновано результатами испытания ассоциации микроорганизмов, включающая энтерококки, сравнительно с другими существующими микробными препаратами, показавшая лучший регулирующий эффект.*

Материал и методы исследований: *Исследования проводились в трех сериях опытов. Первая и вторая в условиях «in vitro», а третья - «in vivo» (на белых мышах). Из содержимого кишечника человека и животных были выделены чистые культуры энтерококков. Отобраны штаммы, показавшие высокую активность (антагонистическую и адгезивную). Создана ассоциация энтерококков с бифидо- и лактобактериями, которая испытывалась на белых мышах. В процессе исследований были использованы классические бактериологические методы и элективные питательные среды для каждого рода микроорганизмов.*

Результаты: *В лабораторных условиях установлена целесообразность включения отобранных местных штаммов энтерококков в состав пробиотических микробных препаратов, предназначенных для укрепления здоровья в случае дисбактериоза и расстройств кишечника.*

Выводы: *Энтерококки были выделены из всех проб содержимого кишечника человека и животных. У местных штаммов таких бактерий выявлены повышенные, для организма, полезные свойства. Это подтвержде-*

но коэффициентом подавления роста эшерихий и сальмонелл, а так же показателем адгезии. Специфические для человека энтерококки были более активными сравнительно с таковыми, выделенными от молодняка сельскохозяйственных.

Более информативными оказались результаты четвертой группы, обосновывая целесообразность использования местных штаммов энтерококков для включения в состав микробных препаратов, потому что ассоциация, содержащая энтерококки, сравнительно с существующими микробными препаратами, способствовала более интенсивному позитивному воздействию на организм, на фоне кишечного дисбактериоза.

Introducere. Studiile noastre precedente au elucidat faptul că enterococii prezintă O parte componentă a microbiocenozei intestinale umane și celei animale, îndeplinind un rol semnificativ în activitatea vitală a organismului [1 3, 6, 12-14].

Analiza surselor bibliografice existente a evidențiat că sănătatea tubului digestiv uman și celui animal, în majoritate, este în stare patologică. Anterior am atenționat că asupra macroorganismului investigat acționa permanent și un șir de factori nefavorabili ai mediului ambiant, inclusiv cei stresogeni [2, 4, 8, 9, 12-14]. Dereglările funcționale ale tubului digestiv cauzate de influența acestora se manifestau aceeași prin dismicrobism sau diaree [9, 12-14].

Actualmente, pentru tratamentul acestor dereglări, în medicină se utilizează unele preparate microbiene, care conțin bifido- și lactobacili, fiind în monocultură sau în asociație. Este cunoscut faptul că microflora intestinală include și bacterii din alte genuri [5, 7, 10, 11, 16]. Prin prisma celor expuse, în lucrările precedente ne-am referit la faptul că enterococii posedă diverse proprietăți utile [15, 16].

De aceea scopul cercetărilor actuale l-a constituit continuarea studiilor asupra microorganismelor din genul Enterococcus, elucidarea oportunității includerii tulpinilor autohtone de streptococi enterici în componența preparatelor microbiene, destinate fortificării sănătății tubului digestiv.

Material și metode. În calitate de material de studiu a servit conținutul intestinal uman și animal. Utilizând metode microbiologice clasice, în condiții *in vitro* s-au izolat, identificat și selectat monotulpini de enterococi autohtoni cu proprietăți antagoniste și adevize sporite (seriile de experimente I și II). În baza lor s-au pregătit asociații de enterococi autohtoni cu bifido- și lactobacili și s-au experimentat comparativ cu alte pre-

parate microbiene existente în condiții de laborator *in vivo* (III). Pentru aceasta 50 șoareci albi au fost divizați în 5 loturi egale (câte 10 animale în fiecare). Loturile I-IV au fost experimentale, primind: I- *Bifidumbacterin* (în baza bifidobacteriilor); II- *Lacidofil-WM* (cu conținut de lactobacterii); III- *Bifi.form* (include bifidobacterii și enterococi); IV- asociația creată în premieră din microorganismele genului Enterococcus (apartenente ale speciei *E.faecium*) cu cele din genurile Bifidobacterium și Lactobacillus (toți reprezentanții, fiind autohtoni), iar V - lot-martor. Toate preparatele s-au administrat pe cale orală, pe fundalul dismicrobismului intestinal, timp de 6 zile, câte 1 ml de suspensie microbiană (1 mlrd celule microbiene) la un animal pe zi (înainte de alimentarea de dimineață). Mostrele de conținut intestinal diluate (10^1 - 10^9) s-au studiat la inițialul și finalul experimentelor, determinând indicii cantitativi ai microorganismelor din genurile: Bifidobacterium, Lactobacillus, Escherichia, Proteus, Enterococcus. Inocularea s-a realizat pe medii nutritive agarizate electiv pentru fiecare gen de bacterii, cu incubarea ulterioară la temperatura de $(37\pm 1)^\circ\text{C}$, pe parcursul a 24-72 ore, în condiții aerobe și anaerobe. Datele obținute sunt exprimate în logaritmi zecimali (log) [13].

Rezultate și discuții. Rezultatele studiilor din prima serie arată că streptococii izolați din conținutul intestinal uman au reprezentat în majoritate genurile Streptococcus, Lactococcus și Enterococcus, iar din cel animal – Streptococcus și Enterococcus.

Investigațiile următoare cu streptococi s-au realizat la fel în condiții *in vitro* (seria II), dar numai cu enterococi, pentru că genul Enterococcus era prezent în toate mostrele, iar celelalte – nu. S-au determinat unele proprietăți utile pentru organism (activitatea antagonistă și capacitatea adezivă), iar rezultatele sunt incluse în tabelele 1 și 2.

Tabelul 1

Activitatea antagonistă a enterococilor autohtoni specifici tubului digestiv uman și animal

Numărul d/r al tulpinilor de enterococi testați	Cantitatea absolută de celule microbiene la 1 ml de suspensie microbiană, logaritmi zecimali (lg) la inocularea în comun cu bacterii din genurile				Coeficientul de combatere a cauzanților maladiilor diareice %	
	Escherichii		Salmo-nele		Escheri-chii	Salmo-nele
	I	F	I	F		
13	4,25±0,09	3,46±0,06	3,84±0,09	3,13±0,14	18,58	18,48
18	3,90±0,12	2,74±0,07	3,46±0,10	2,77±0,07	29,74	19,94
21	3,60±0,07	2,90±0,08	3,41±0,13	2,92±0,08	19,44	14,36
25	3,82±0,08	2,88±0,06	4,07±0,11	3,13±0,12	24,60	23,09
32	3,80±0,08	2,87±,06	3,77±0,05	3,04±0,13	24,47	19,36
37	3,64±0,11	2,98±0,10	4,17±0,13	3,46±0,09	18,13	17,02

43	3,50±0,10	2,90±0,13	3,60±0,07	3,07±0,04	17,14	14,72
46	3,46±0,05	2,70±0,00	3,82±0,04	3,00±0,19	21,96	21,45
49	3,70±0,08	2,84±0,16	3,76±0,17	3,04±0,12	23,24	19,14
55	3,70±0,04	3,00±0,12	3,65±0,06	3,11±0,13	18,91	14,79
58	3,95±0,12	3,07±0,13	3,70±0,12	2,98±0,15	22,27	19,45
64	3,78±0,13	3,11±0,11	3,77±0,07	3,17±0,13	17,72	15,91
67	4,11±0,11	3,23±0,12	3,62±0,26	2,88±0,13	21,41	20,44
70	3,69±0,11	2,72±0,09	3,54±0,14	2,64±0,17	26,28	25,42
74	3,75±0,08	3,14±0,12	3,49±0,08	2,96±0,12	16,26	15,18
77	3,67±0,07	2,96±0,14	3,50±0,04	2,86±0,15	19,34	18,28
82	3,77±0,13	2,87±0,13	3,46±0,08	2,88±0,13	23,87	16,76
85	4,07±0,12	3,04±0,05	3,84±0,09	2,94±0,04	25,30	23,43
89	4,20±0,10	3,32±0,10	3,68±0,11	2,92±0,07	20,95	25,85
93	3,79±0,11	2,88±0,04	3,62±0,13	2,81±0,12	24,01	22,37
97	4,17±0,09	3,43±0,07	3,54±0,14	2,98±0,14	17,74	15,81
101	4,04±0,07	3,46±0,12	3,76±0,08	3,25±0,10	14,35	13,56
108	4,07±0,13	3,14±0,13	3,64±0,12	2,92±0,09	22,85	19,78
112	4,23±0,14	3,20±0,10	3,77±0,15	2,90±0,11	24,34	23,07
116	3,98±0,10	2,70±0,08	3,72±0,13	2,77±0,07	32,16	25,53
129	4,13±0,08	3,41±0,11	3,80±0,10	3,23±0,12	17,43	15,00

Notă: I - inițialul experimentelor; F - finalul testării tulpinilor;

*)-tulpinile cu nr. d/r 18, 25, 32, 46, 49, 58, 67, 70, 82, 85, 89, 93, 108, 112 și 116 sunt specifice tubului digestiv uman, iar 13, 21, 37, 43, 55, 64, 74, 77, 97, 101 și 129 – celui animal.

Datele tabelului 1 demonstrează nivelul activității antagoniste la monotulpinile de enterococi testate și indică faptul că cea mai de perspectivă s-a dovedit a fi tulpina cu numărul d/r 116, pentru că la ea coeficientul de combatere a escherichiilor și salmonelilor a constituit respectiv 32,16 și 25,53%. Concomitent s-a depistat că acest coeficient era mai mare la enterococii specifici tubului digestiv uman, comparativ cu cei specifici tubului digestiv al animalelor (fiind în limitele de 20,95-32,16; 14,35-19,44 și 19,14-25,53; 13,56-18,48% respectiv).

Rezultatele cercetării capacităților adezive ale enterococilor la eritrocitele native umane, porcine și bovine (tab.2) denotă că indicele adeziunii a fost sporit (în limitele de 3,12-4,87 u.c.) la aceleași tulpini de enterococi. Deci enterococii autohtoni posedă o capacitate adezivă sporită, totodată ea era mai pronunțată la genurile specifice tubului digestiv uman. În baza rezultatelor reflectate în tabelele 1 și 2 se poate afirma că la toate tulpinile de enterococi izolate în premieră s-a evidențiat potențial probiotic, exprimat prin nivelul înalt al activității antagoniste și capacitate adezivă sporită.

Tabelul 2

Capacitatea adezivă a enterococilor autohtoni specifici tubului digestiv uman și celui animal

Numărul d/r al tulpinilor de enterococi testați	Cantitatea de celule micro-biene aderate la suprafața a 25 de eritrocite native*)	Indicele adeziunii, u.c.	Numărul d/r al tulpinilor de entero-coci testați	Cantitatea de celule micro-biene aderate la suprafața a 25 de eritrocite native	Indicele adeziunii, u.c.
13	79,50±2,50	3,18	70	104,00±3,00	4,16
18	102,50±3,50	4,10	74	93,00±2,00	3,72
21	89,75±2,25	3,59	77	96,25±1,75	3,85
25	106,75±3,25	4,27	82	102,75±2,25	4,11
32	103,75±1,25	4,15	85	103,50±2,50	4,14
37	86,25±2,75	3,45	89	99,50±3,50	3,98
43	81,00±3,00	3,24	93	103,00±4,00	4,12
46	102,50±2,50	4,10	97	89,25±3,75	3,57
49	103,50±3,50	4,14	101	78,00±3,00	3,12
55	70,25±1,75	2,81	108	102,50±3,50	4,10
58	103,00±2,00	4,12	112	104,00±3,00	4,16
64	86,00±4,00	3,44	116	116,75±2,25	4,67
67	102,00±3,00	4,08	129	91,25±3,75	3,65

Notă: Numărul d/r al tulpinilor de enterococi testați sunt identice celor din tabelul I. *) Eritrocitele native au fost specifice pentru om, porci și viței.

Așadar, a fost confirmat faptul că enterococii studiați au manifestat proprietăți utile pentru organism, pentru că aveau nivel cantitativ esențial. Investigațiile în condiții *in vivo*, pe șoareci albi, au demonstrat valoarea numerică a indicilor cantitativi ai unor reprezentanți microbieni intestinali, peste 6 zile după inițierea experimentelor (tab.3).

Analizând datele tabelului 3, observăm că la animalele loturilor experimentale (I-IV) era sprezență starea de eubioză intestinală, iar la cele din lotul martor - de dismicrobism. Menționăm că toate preparatele

testate au acționat benefic asupra organismului animal, preîntâmpinând apariția și dezvoltarea disfuncțiilor diareice (la 100% de animale), pe când la cele din lotul martor asemenea dereglări au fost înregistrate la 80% din animale, iar la restul 20% - stare de dismicrobism intestinal. Conform rezultatelor obținute în lotul IV (care erau mai avansate ca cele din loturile I-III), se poate afirma că includerea enterococilor autohtoni în componența asociațiilor sau preparatelor microbiene cu acțiune probiotică este argumentată.

Tabelul 3.

Indicii cantitativi ai microbiocenozei intestinale la șoareci cărora li s-au administrat diverse preparate microbiene

Lotul animalelor	Genurile de microorganisme	Numărul de celule microbiene la 1g de conținut intestinal, logaritmi zecimali (lg)		Deosebirea, %	
		Inițial	Final (peste 6 zile)	De inițial	De martor
I	1	7,17±0,08	9,41±0,07	+ 31,24	+ 20,64
	2	6,88±0,12	7,72±0,09	+ 12,20	+ 14,3
	3	8,84±0,13	7,46±0,12	- 15,61	- 21,39
	4	3,11±0,09	2,07±0,10	- 33,44	- 50,00
	5	6,77±0,11	7,90±0,14	+16,69	+ 9,26
II	1	7,53±0,11	8,04 ±0,13	+ 8,05	+ 2,81
	2	6,32±0,12	8,32±0,10	+ 31,64	+ 22,89
	3	8,96±0,10	7,54±0,14	- 15,84	- 20,54
	4.	3,00±0,13	1,23±0,12	- 59,00	- 70,28
	5	6,84±0,15	7,04±0,13	+ 2,92	- 2,62
III	1	7,23±0,13	9,20±0,12	+ 18,03	+ 17,64
	2	6,63±0,11	7,70±0,13	+ 16,13	+ 13,73
	3	8,68±0,12	6,82±0,10	- 21,42	- 28,13
	4.	3,07±0,11	1,17±0,10	- 61,88	- 71,73
	5	6,54±0,14	8,62±0,10	+ 31,80	+ 19,22
IV	1	7,60±0,10	9,47±0,13	+ 24,60	+ 21,09
	2	6,50±0,11	8,65±0,09	+ 33,07	+ 27,76
	3	8,46±0,12	5,79±0,11	- 28,25	- 38,98
	4.	3,17±0,08	0	-100,00	-100,00
	5	6,32±0,13	8, 88±0,12	+ 40,50	+ 22,82
V	1	7,20±0,12	7,82±0,10	+ 8,61	
	2	6,11±0,10	6,77±0,11	+ 10,80	
	3	8,53±0,11	9,49±0,12	+ 11,25	
	4.	3,04±0,10	4,14±0,08	+ 36,18	
	5	6,49±0,12	7,23±0,13	+ 11,40	

Notă: Loturile sunt diferențiate în text.

Genurile de microorganisme: 1–Bifidobacterium, 2–Lactobacillus, 3–Escherichia, 4–Proteus, 5–Enterococcus.

Așadar, în condiții de laborator (*in vivo* pe șoareci albi) s-a constatat că este rațională includerea enterococilor autohtoni în componența asociațiilor sau preparatelor microbiene, destinate fortificării sănătății organismului (profilaxiei dismicrobismului intestinal și disfuncțiilor diareice).

Concluzii

1. Enterococii pot fi considerați ca parte componentă a microbiocenozei tubului digestiv, deoarece au fost izolați din toate mostrele de conținut intestinal studiate.

2. Tulpinile autohtone de enterococi au manifestat proprietăți utile sporite pentru organism, confirmate de indicii sporți ai activității antagoniste și capacității adezive.

3. Monotulpinile de enterococi specifice tubului digestiv uman au demonstrat un nivel mai pronunțat de activitate antagonistă și capacitate adezivă, comparativ cu cele specifice tubului digestiv al animalelor domestice tinere.

4. Experimental, s-a constatat rațional de a include tulpini de enterococi autohtoni în componența asocia-

țiilor sau preparatelor microbiene, destinate fortificării sănătății tubului digestiv (în caz de dismicrobism intestinal și disfuncții diareice).

Bibliografie

1. ALIONA VELCIU, MARIA TIMOȘCO, NATALIA SAINSUS. Constituirea bacteriocenozei intestinale la copii în condiții de maternitate. În: Anale științifice USMF „N. Testemițanu”. Ediția V. Vol. I. Chișinău, 2004, p. 508-512.
2. ALIONA VELCIU, MARIA TIMOȘCO, NATALIA SAINSUS, VICTORIA PROCA. Dinamica particularităților bacteriocenozei intestinale la copii de vârstă fragedă în condițiile presingului ecologic. // Anale științifice USMF „N. Testemițanu”. Ediția VII. Vol. II. Chișinău, 2006, p. 38-42.
3. ALIONA VELCIU, MARIA TIMOȘCO, NATALIA SAINSUS, VICTORIA PROCA. Dinamica constituirii bacteriocenozei intestinale la copii. // Anale științifice USMF „N. Testemițanu”. Ediția VIII. Vol. I. Chișinău, 2007, p. 229-233.
4. ALIONA VELCIU, MARIA TIMOȘCO, NATALIA SAINSUS, VICTORIA PROCA. Bacteriocenoza intestinală a copiilor cu divers mod de constituire. În: Anale științifice USMF „N. Testemițanu”. Chișinău. - 2008. - Ediția IX. - Vol. 2. - P. 61-64.
5. Dughera L., Elia C., Navino M., Cisarò F. Effects of symbiotic preparations on constipated irritable bowel syndrome symptoms. // Acta Biomed. - 2007. - 78(2):111-116.
6. FLOREA NATALIA, TIMOSHCO MARIA, PERDE DIANA, BOGDAN VICTORIA. Enterococci role in intestinal pathologies and body health maintenance. // 2nd Internațional Conference „Microbial Biotechnology-9-10 OCTOBER. Chișinău MOLDOVA– 2014. – P.130
7. Kim P.I., Jung M.Y., Chang Y.H. et al. Probiotic properties of Lactobacillus and Bifidobacterium strains isolated from porcine gastrointestinal tract. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. - 74(5):1103-1111.
8. MARIA TIMOȘCO, ANA LEORDA, LUCIA POPANU, ALIONA VELCIU. Explorarea modalităților de evidențiere a stării sănătății tubului digestiv. În: Analele științifice ale USM, seria “Științe chimico-biologice”. Chișinău, 2006, p. 80-83.
9. MARIA TIMOȘCO. Starea de dismicrobism intestinal consecință negativă a influenței stresogene asupra macroorganismului. În: Creșterea impactului cercetării și dezvoltarea capacității de inovare. Rezultatele comunicărilor la Conferința științifică cu participare internațională 21-22 septembrie UȘM . Chișinău. – 2011. – VI. - P.113
10. Nguyen T.D., Kang J.H., Lee M.S. Characterization of Lactobacillus plantarum PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. //Int. J. Food Microbiol. – 2007. - 113(3):358-361.
11. Olivares M., Díaz-Ropero M.P., Gómez N. et al. The consumption of two new probiotic strains, Lactobacillus gasseri CECT 5714 and Lactobacillus coryniformis CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. //Int. Microbiol. – 2006. – 9 (1):47-52.
12. SAINSUS NATALIA, TIMOȘCO MARIA, VELCIU ALIONA. Disfuncțiile diareice și bacteriocenoza intestinală la copii de vârstă fragedă. În: Anale științifice USMF „N. Testemițanu”. Ediția VI. Vol. II. Chișinău, 2005, p. 51-55.
13. TIMOȘCO MARIA. Stresul și flora microbiană intestinală. Chișinău. – 2005. – 172 p.
14. VELCIU ALIONA, TIMOȘCO MARIA, CIOCHINĂ VALENTINA, ȚUREA VALENTIN, HORODIȘTEANU-BANUH ADELA. Diferențierea dismicrobismului și disfuncțiilor intestinale diareice. Chișinău: 2011. 38 p.
15. VICTORIA BOGDAN, MARIA TIMOȘCO. Unele proprietăți probiotice ale microorganismelor genului Enterococcus – reprezentant al bacteriocenozei intestinale. În: Creșterea impactului cercetării și dezvoltarea capacității de inovare. Rezultatele comunicărilor la Conferința științifică cu participare internațională, 21-22 septembrie UȘM. Chișinău. – 2011. – VI. - P.111.
16. М.А. ТИМОШКО, А.В. ВЕЛЧУ, В.М. ЛЫЗЛОВ, В.К. БОГДАН. Целенаправленное формирование саногенного бактериоценоза пищеварительного тракта у детей раннего возраста. В: Научные Труды II съезда Физиологов СНГ. Москва–Кишинэу: Медицина–Здоровье, 2008. с. 243.