

BIFIDOBACTERIILE SPECIFICE TUBULUI DIGESTIV UMAN THE BIPHIDOBACTEIAS SPECIFIC FOR HUMAN DIGESTIVE TUBE

Maria Timoșco¹, Natalia Sainsus², Aliona Velciu³, Victoria Bogdan⁴

¹ dr. habilitat, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM

² dr. în medicină, conferențiar universitar, Catedra Microbiologie, Virusologie și Imunologie USMF

³ dr. În fiziologie, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM

⁴ cercetător științific, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM

Summary

The intestinal content unanimously at different ages are quantitative indices highlight sour depending on functional status of the digestive tract (basically healthy or dismicrobism). Membership is given on the species, the percentage and the antagonistic activity specific Sour human digestive tract, children and adults at different ages. It warns the recommendation and use rationality in practice bacterioprohylactic sour and bacterioterapie. The study included only specific species at certain times of the digestive tract according to age and functional bowel disorders etiologia.

Rezumat

În conținutul intestinal uman, la diverse vârste, sunt evidențiați indicii cantitativi ai bifidobacteriilor în dependență de starea funcțională a tubului digestiv (practic sănătoasă sau dismicrobism). Este dată apartenența de specie, cota procentuală și activitatea antagonică a bifidobacteriilor specifice tubului digestiv uman, al copiilor și maturilor, la diferite vârste.

Se atenționează raționalitatea recomandării și utilizării bifidobacteriilor în practică pentru bacterioprofilactică și bacterioterapie. Studiul a cuprins doar specii specifice tubului digestiv la anumite perioade de vârstă și în conformitate cu etiologia dereglărilor funcționale ale intestinului.

Introducere

Relatări anterioare denotă că flora microbiană a tractului gastrointestinal uman și animal, în perioada timpurie postnatală, se caracterizează printr-o diversitate de bacterii obligative și facultative, atât aerobe, cât și anaerobe, care îndeplinesc un rol important în activitatea vitală a macroorganismului [21]. Proprietățile specifice ale tuturor reprezentanților obligativi ai bacteriocenozei tractului gastrointestinal uman determină funcțiile de bază ale acestora (de protecție, imunostimulatoare, imunomodulatoare, metabolică etc. [2, 4, 9, 11, 12, 21, 23, 27]).

Se consideră că bifidobacteriile acționează pozitiv asupra organismului în creștere, datorită proprietăților lor de a sintetiza substanțe biologice active de tipul enzimelor, aminoacizilor, proteinelor și vitaminelor (tiaminei, riboflavinei, piridoxinei, ciancobalaminei, vitaminei K, acizilor: folic, nicotinic, panto-

teic ș.a.). Cele sintetizate de bifidobacterii acționează pozitiv asupra procesului de dezvoltare a reacției imunologice, mai ales, de formare a anticorpilor [1, 5, 6, 10, 13].

Actualmente se consideră că există circa 20 de specii de bifidobacterii, însă numai câteva dintre ele constituie flora microbiană intestinală umană (*Bifidobacterium bifidum*, *B.longum*, *B.adolescentis*, *B.breve* și *B.infantis*) [16, 17, 19].

În cea mai mare parte a surselor bibliografice analizate se afirmă că în tubul digestiv uman de toate vârstele mai des a fost prezentă numai specia *B.bifidum*. La majoritatea indivizilor examinați în condițiile spitalicești s-a constatat că la copiii sugari această specie persista în 70% dintre cazurile investigate, iar la cei de 4-5 ani – numai în 40% cazuri. Acest argument a stat la baza recomandării bifidobacteriilor spre includere în componența unor preparate și adaosuri și alimentare de acțiune

probiotică predestinate copiilor și maturilor de diverse vârste. [7, 14, 15, 18, 20, 24, 26, 27].

Necătând la faptul că în ediția a 9-a a determinantului Bergy (1997) există descrierea acestui gen de bacterii, totuși ea este limitată, iar din considerentele necesității metodelor speciale pentru aprovizionarea condițiilor de anaerobioz strict și de studiere a metabolismului lor, lipsește și diferențierea speciilor de bacterii ale genului *Bifidobacterium* [28].

În mod experimental a fost constatat că produsele tipice ale metabolismului, formate în procesul vital al bifidobacteriilor, sunt acizii: lactic, acetic ș.a. Aceștia, în mare măsură, contribuie la diminuarea pH-lui până la 4,0-3,8 u.c. și inhibarea multiplicării microorganismelor de putrefacție, condițional patogene și patogene, fiind sensibile la reacția mediului caracteristic tubului digestiv [10, 19, 25, 26].

Concomitent, se atrage atenția și la faptul că bifidobacteriile contribuie și la reducerea esențială a procesului de cancerogeneză, provocat de toxinele reprezentanților facultativi ai florei microbiene intestinale [8].

Din cele expuse reiese că datorită numărului mare de proprietăți utile, bifidobacteriile sunt principala componentă a bacteriocenozei tubului digestiv uman și animal în perioada timpurie a ontogenezei postnatale.

În baza bibliografiei studiate s-a considerat rațional de a determina cantitatea de celule vii din genul *Bifidobacterium* la 1gr. de conținut intestinal, iar scopul principal al prezentei lucrări a fost de a evidenția speciile de bifidobacterii specifice pentru tubul digestiv uman la diverse vârste.

Metode și materiale

În calitate de material au servit mostrele de conținut intestinal acumulat de la copii cu vârsta între 3-16 și maturi de 20-70 ani. Toți copiii și maturii, de la care s-a analizat conținutul intestinal, au fost divizați în patru loturi: Primul a inclus subiecți practic sănătoși; II – cu dismicrobism compensat; III – cu dismicrobism subcompensat; IV – cu disfuncții diareice de etiologie nedeterminată. Asemenea categorii au fost determinate de către medicii cliniciști. Mostrele acumulate au fost supuse diluării zecimale ($10^1 - 10^{10}$) și studiate în condiții strict anaerobe, conform metodelor microbiologice clasice. Studiarea acestora a prevăzut numărarea coloniilor pe cutii Petri obținute după inocularea mostrelor de conținut intestinal pe mediu nutritiv Blaurock (electiv numai pentru bifidobacterii), utilizând diluțiile respective și incubarea la temperatura de $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ [10].

Rezultate și discuții

Datele obținute în rezultatul investigațiilor științifice a conținutului intestinal acumulat de la copii și maturi de diverse vârste sunt relatate în tabelul 1.

Analizând indicii cantitativi ai bifidobacteriilor, obținuți la investigațiile microbiologice a conținutului intestinal uman la diverse vârste, reflectați în tabelul 1, s-a constatat că aceștia diferă și în mare măsură sunt în funcție de statusul funcțional al tubului digestiv. Dacă la subiecții practic sănătoși (lotul I) indicii cantitativi ai bifidobacteriilor sunt mai avansați, apoi la cei cu simptome de dismicrobism (compensat și subcompensat) și disfuncții intestinale diareice ei diminuează la general, dar mai pronunțat la maturi cu vârsta peste 50 ani. Considerăm important să menționăm că la maturi, chiar și la cei practic să-

nătoși, cantitatea bifidobacteriilor este considerabil mai mică ca la copiii cu vârsta între 3-8 ani. Aceasta e confirmată prin faptul că de la 20 până la 50 ani nivelul numeric al bifidobacteriilor se găsește în limitele de 8,54 și 8,13, iar la 3-8 ani cantitatea lor a fost de 9,65-9,17 log al numărului de celule vii la 1gr. de conținut intestinal. În continuare, la vârsta de 55-70 ani, indicii lor cantitativi diminuează cu mult mai rapid (de la 7,49 până la 5,20 log al numărului de celule vii la 1gr. de conținut intestinal). Probabil această perioadă poate fi numită ca foarte vulnerabilă pentru activitatea vitală, pentru că tocmai ei îi revine cea mai mare cantitate de disfuncții intestinale diareice.

Tabelul 1

Indicii cantitativi ai bifidobacteriilor în conținutul intestinal uman la diverse vârste

Vârsta, ani	Loturile			
	I	II	III	IV
3-4	9,65±0,13	7,53±0,18	5,23±0,21	3,38±0,24
5-6	9,59±0,10	7,84±0,15	5,77±0,22	3,90±0,26
7-8	9,17±0,14	7,38±0,17	5,70±0,25	4,20±0,21
9-10	8,92±0,13	7,69±0,13	5,53±0,24	4,59±0,22
11-12	8,87±0,12	7,11±0,12	5,61±0,23	4,76±0,21
13-14	8,76±0,11	6,68±0,16	5,07±0,26	4,17±0,24
15-16	8,49±0,15	6,46±0,11	4,77±0,20	3,98±0,19
20	8,54±0,14	5,43±0,16	4,38±0,22	2,88±0,24
30	8,38±0,13	6,88±0,19	4,30±0,21	2,64±0,26
40	8,17±0,15	6,64±0,17	4,23±0,23	2,32±0,24
50	8,13±0,12	6,25±0,18	3,92±0,22	2,17±0,25
55	7,49±0,16	5,59±0,20	3,77±0,24	1,90±0,26
60	6,23±0,18	5,32±0,21	3,32±0,26	1,76±0,21
65	5,90±0,17	4,65±0,23	2,70±0,25	1,54±0,30
70	5,20±0,19	4,23±0,25	2,53±0,27	1,20±0,28

Notă: Loturile: I – subiecți practic sănătoși; II – cu dismicrobism compensat; III – cu dismicrobism subcompensat; IV – cu disfuncții diareice de etiologie nedeterminată.

Pentru realizarea cercetărilor următoare, din mostrele de conținut intestinal uman (vârsta de 3-50 ani) s-au izolat 235 de tulpini de microorganisme, presupuse ca bifidobacterii. Dintre acestea 127 erau specifice copiilor și 108 – maturilor de diversă vârstă. După identificarea acestora s-a constatat că toate tulpinile studiate conform proprietăților morfologice, biochimice și fiziologice au fost atribuite la genul *Bifidobacterium* și cinci specii ale lui, fiind următoarele: *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. breve* și *B. adolescentis*.

În continuare s-a determinat cota procentuală a fiecărei specii de bifidobacterii dintre cele nominalizate cu obținerea rezultatelor incluse în tabelul 2.

Analiza datelor tabelului a evidențiat că cea mai mare cantitate de monotulpini izolate au aparținut speciei *Bifidobacterium bifidum* (83); pe locul doi s-a aflat *B. longum* (72); apoi *B. breve* (37), *B. infantis* (31) și *B. adolescentis* (12). Cele nominalizate au alcătuit respectiv 35,31; 30,63; 15,74; 13,19 și 5,10% față de numărul tulpinilor studiate în cadrul genului *Bifidobacterium* (235). Concomitent s-a depistat că în tubul digestiv al copiilor bifidobacteriile au ocupat o cotă mai mare comparativ cu cea la maturi. Studiarea comparativă a tulpinilor izolate a demonstrat diferențierea cotei lor în felul următor: Specia de bifidobacterii *B. infantis*

Tabelul 2

Cota microorganismelor genului Bifidobacterium izolate din conținutul intestinal al copiilor și maturilor de diversă vârstă

Denumirea speciilor de bifidobacterii	Numărul tulpinilor supuse studierii	Numărul tulpinilor prezente în conținutul intestinal uman la diverse vârste		Cota fiecărei specii, %	
		la copii de 0-16 ani	la maturi de 20-70 ani	la copii	la maturi
B. bifidum	83	49	34	59,03	40,97
B.infantis	31	31	0	100,00	0
B.longum	72	39	33	54,16	45,84
B.breve	37	21	16	56,75	43,25
B.adolescentis	12	0	12	0	100,00

Tabelul 3

Activitatea antagonistă a microorganismelor unor specii ale genului Bifidobacterium

Denumirea speciilor de bifidobacterii	Numărul tulpinilor cercetate		Coeficientul de combatere a microbilor-test, %			
			Tulpinile de microbi, utilizate ca test de referință			
	Sursa de izolare		E. coli 11	P.vulgaris 65	Cl.dificileae 28	S.aureus 209
copii	maturi					
B. bifidum	49		29,10	37,63	25,57	27,59
		34	19,25	28,40	22,15	23,80
B.infantis	31		30,45	39,04	26,00	33,42
B.longum	39		28,39	35,74	30,24	27,15
		33	25,19	30,43	26,39	23,72
B.breve	21		22,15	25,72	24,17	26,65
		16	20,24	21,60	22,35	23,47
B.adolescentis	12		18,43	19,57	20,18	21,27

s-a evidențiat numai la copiii, iar B. adolescentis - la maturi; B.bifidum la copii a fost cea mai numeroasă, constituind 59,03%, iar la maturi - 40,97%; B. breve - 56,75 și 43,25; B. longum - 54,16 și 45,84% față de numărul tulpinilor studiate în cadrul speciei în cauză.

Fiindcă bifidobacteriilor îi revine rolul de protecție a tubului digestiv împotriva colonizării acestuia cu microorganisme condiționat patogene sau patogene noi am atras atenție și la proprietățile antagoniste ale monotulpinilor de bifidobacterii. S-a determinat coeficientul lor de combatere a microbilor-test din genurile Escherichia, Proteus, Clostridium și Staphylococcus, pentru că reprezentanții acestor genuri sunt considerați drept cauzanți ai maladiilor intestinale diareice. Rezultatele obținute s-au demonstrat în tabelul 3.

Datele tabelului 3 denotă că activitatea antagonistă a bifidobacteriilor diferă între specii și în dependență de sursa izolării acestora. Cel mai înalt coeficient de combatere a tuturor microbilor-test utilizați se observă la specia Bifidobacterium infantis, atingând nivelul de 26,00 - 39,04%. Al doilea loc îi revine speciei B. bifidum, al treilea - B.longum, al patrulea - B.breve și al cincilea - B.adolescentis. Concomitent este important de menționat că tulpinile de bifidobacterii izolate de la copii au

demonstrat o activitate antagonistă mai pronunțată, comparativ cu cele obținute de la maturi. Probabil că asemenea fenomen poate fi argumentat prin faptul adaptării speciilor de bifidobacterii testate față de reprezentanții genurilor de microorganisme Escherichia, Proteus, Clostridium și Staphylococcus (utilizate în calitate de microbi-test), care au persistat în tubul digestiv al oamenilor maturi pe parcursul vieții.

Concluzii

1. În procesul investigațional a fost constatată specificitatea bifidobacteriilor izolate din conținutul intestinal uman la diverse vârste, exprimată prin: reprezentanța lor de specie cu cota procentuală și activitatea antagonistă față de microbi-test, fiind specifice.

2. Cele evidențiate confirmă pe deplin raționalitatea utilizării diverselor tulpini de bifidobacterii cu considerația, nu numai apartenenței lor de specie, ci și specificității acestora pentru vârsta respectivă.

3. Utilizarea bifidobacteriilor în cazul când reprezentanții florei microbiene intestinale de categorie condiționat patogenă sau patogenă contribuie la dezvoltarea dereglărilor funcționale ale tubului digestiv uman cu simptome diareice.

Bibliografie

- Amenta M., Cascio M.T., Di Fiore P., Venturini I. Diet and chronic constipation. Benefits of oral supplementation with symbiotic zir fos (Bifidobacterium longum W11 + FOS Actilight). //Acta Biomed. - 2006. - 77(3):157-162.
- Balcázar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuola I. et al. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (Salmo trutta). // Br. J Nutr. - 2007. - 97(3):522-527.
- Barrenetxe J. et al. Modulation of gastrointestinal physiology through probiotic strains of Lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum. //An.Sist.Sanit.Navar. - 2006. - 29(3):337-347.
- Blaut M., Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. //J.Nutr. - 2007. - 137(3 Suppl. 2): 751S-755S.

5. Elmadfa I., Heinsle C. Influence of a probiotic yoghurt on the status of vitamins B(1), B(2) and B(6) in the healthy adult human. // *Ann. Nutr. Metab.* – 2001. – 45(1) : 13-18.
 6. Felis G., Dellaglio F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. // *Curr. Issues Intest. Microbiol.* – 2007. – 8(2):44-61.
 7. Floch M.H., Madsen K.K., Jenkins D.J., et al, Recommendations for probiotic use. // *J Clin Gastroenterol.* – 2006. - 40(3):275-278.
 8. Fox J.G., Wang T.C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. // *J. Clin. Invest.* – 2007. - 117(1):60-69.
 9. Galdeano C.M., et al. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2007. – 14(5):485-492.
 10. Galețchi P., Rusu Galina, Stasii Ecaterina ș.a. Dismicrobismul intestinal la copii. Chișinău. – 2001. – 42p.
 11. Heller F., Duchmann R. Intestinal flora and mucosal immune responses. *Int. J. Med. Microbiol.* 2003. Apr. 293(1): 77-86.
 12. Hopkins M.J., et al. Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses. // *FEMS Microbiol. Ecol.* - 2005. - 54(1):77.
 13. Hsu C.A. et al. Cultural condition affecting the growth and production of beta-galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2007. – 116(1):186-189.
 14. Isolauri E. Probiotics in human disease. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. – 73 (6): 11425.
 15. Kim P.I. et al. Probiotic properties of Lactobacillus and Bifidobacterium strains isolated from porcine gastrointestinal tract. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
 16. Laine R., Salminen S., Benno Y., Owehand A.C. Performance of bifidobacteria in oat-based media. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2003. – 83 (1) : 105-109.
 17. Masco L. et al. In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of Bifidobacterium. // *J. Dairy Sci.* – 2007. – 90(848):3572-3578.
 18. Pompei A., Cordisco L., Amaretti A. et al. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. - 73(1):179-185.
 19. Raz I., Gollop N., Polak-Charcon S., Schwartz B. Isolation and characterisation of new putative probiotic bacteria from human colonic flora. // *Br. J Nutr.* – 2007. - 97(4):725-734.
 20. Sanders M.E. Summary of probiotic activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. // *J Clin. Gastroenterol.* - 2006. - 40(9):776-783.
 21. Timošco Maria. Stresul și flora microbiană intestinală. Chișinău. – 2005. – 172p.
 22. Vijaya Kumar S.G., Singh S.K., Goyal P. et al. Beneficial effects of probiotics and prebiotics on human health. // *Farmazie.* – 2005. – 60 (3) : 163-171
 23. Алешукина А.В. Нормальная микрофлора тела человека. Медицинская микробиология, Феникс 2003, с 391-405.
 24. Ильина Р.М., Молокеев А.В., Использование бифидосодержащих лечебно-диетических продуктов питания для профилактики дисбактериозов. *Журн. Микробиол.*, 2000, 1: 35-38.
 25. Леванова Е.А., Бондаренко В.М., Воробьев А.А. и др. Становление микрофлоры кишечника у детей первого года жизни. *Ж. Микробиол.* - 2001 а -4: 47-50.
 26. Нетребенко О.К. Питание грудного ребенка и кишечная микрофлора // *Педиатрия* 2005. N 3. с. 53-54.
 27. Новик Г.И., Самарцев А.А., Астапович Н.И. и др. Биологическая активность пробиотических микроорганизмов. // *Прикл. Биохимия и Микробиология.* - 2006. - 42(2):187-194.
 28. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. и др. Определитель бактерий Берджи. // Перевод с английского под ред. Акад. РАН Г.А. Заварзина. М. «Мир». – 1997. - 800с.
-