

NIVELUL COMPATIBILITĂȚII UNOR SPECII DE MICROORGANISME APARTENENTE LA GENURILE OBLIGATIVE TUBULUI DIGESTIV UMAN

LEVEL OF COMPATIBILITY OF CERTAIN SPECIES OF MICROORGANISMS BELONGING TO THE TYPES COMPULSORY FOR HUMAN DIGESTIVE TRACT

Maria TIMOȘCO¹, Natalia FLOREA², Aliona VELCIU³

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

² dr. în medicină, conferențiar universitar, Catedra Microbiologie, Virusologie și Imunologie, USMF „Nicolae Testemițanu”;

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

Summary

It is found that the functional disorders of the human and animal gastrointestinal tract, including dismicrobism, are caused, to a great extent, by excessive stressogenic influence of environmental factors on the macroorganism. Even if, in case of normobiosis, the representatives of compulsory types mentioned live in symbiosis in the digestive tract, however, when creating new microbial compositions it is necessary to use compatible bacterial species. Considering the above-mentioned, the aim of this work was to study the compatibility of some species of microorganisms, belonging to types compulsory for the human digestive tract.

Rezumat

Este constatat, că dereglările funcționale ale tractului gastrointestinal uman și animal, inclusiv dismicrobismul, într-o măsură considerabilă, sunt cauzate de influența excesivă stresogenă a factorilor mediului ambiant asupra macroorganismului. Chiar dacă în cazul normobiozei gastrointestinale în conținutul tubului digestiv reprezentanții obligativi din genurile nominalizate conviețuiesc în simbioză, totuși, în cazul creării noilor compoziții microbiene, în mod obligatoriu, se cere de a utiliza specii de bacterii compatibile între ele. Ținând cont de cele menționate mai sus, scopul prezentei lucrări a fost de a studia nivelul de compatibilitate dintre unele specii de microorganisme, aparținente genurilor obligative tubului digestiv uman.

Introducere

Actualmente se cunoaște, că bacteriocenoza gastrointestinală prezintă peste 50 de specii de microorganisme, cu apartenența la circa 15 genuri, dar numai câteva din acestea sunt cele mai utile pentru macroorganism, fiind, în majoritate, reprezentanți ai genurilor obligatorii tubului digestiv: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* etc. [1, 5, 7, 12, 14, 19 ș.a.].

Este constatat, că dereglările funcționale ale tractului gastrointestinal uman și animal, inclusiv dismicrobismul, într-o măsură considerabilă, sunt cauzate de influența excesivă stresogenă a factorilor mediului ambiant asupra macroorganismului [6, 16 etc.].

Concomitent a fost depistat că au manifestat o sensibilitate exagerată reprezentanții bacteriocenozei intestinale din genurile obligative: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* [11,16,17 ș.a.]. Însă, în literatura de specialitate s-a atras atenția asupra faptului că tocmai aceste genuri de bacterii au proprietăți utile pentru supraviețuirea organismului uman [1-4, 8, 10, 16, 17 ș.a.].

Totodată s-a constatat, că asemenea genuri de microorganisme, sunt considerate cu potențial probiotic și pot fi utilizate în industria alimentară și farmaceutică [6-10, 13, 15, 18, 29, 32, 39, 41, 43, 44, 46, 50, 62].

Cele expuse argumentează necesitatea creării diverselor compoziții microbiene pentru includerea lor în componența preparatelor de origine microbiană cu destinație farmaceutică industrială. Chiar dacă în cazul normobiozei gastrointestinale, în conținutul tubului digestiv, reprezentanții obligativi din ge-

nurile nominalizate conviețuiesc în simbioză, totuși, în cazul creării noilor compoziții microbiene, în mod obligatoriu, se cere utilizarea speciilor de bacterii compatibile între ele.

Ținând cont de faptele expuse mai sus, scopul prezentei lucrări a fost de a studia nivelul de compatibilitate dintre unele specii de microorganisme, aparținente genurilor obligative tubului digestiv uman.

Metode și materiale

Au fost supuse cercetărilor microorganismele unor specii din genurile *Bifidobacterium*, fiind considerate ca bacterii supuse testării (1) și *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* și *Lactococcus* - ca microorganisme utilizate în calitate de microbi-test (2). Toate genurile de bacterii studiate au fost obligative tubului digestiv uman. Pentru atingerea scopului, investigațiile științifice s-au executat în 5 serii de experiențe în condiții „in vitro”. Pe parcursul procesului de cercetare, s-au utilizat metode microbiologice clasice, care au permis determinarea indicilor cantitativi ai microorganismelor experimentate. În baza acestora a fost calculat nivelul cantitativ al compatibilității speciilor de microorganisme crescute la temperatura de (37±1)°C pe medii nutritive semifluide, fiind electiv pentru fiecare dintre genurile de bacterii nominalizate [16]. Peste 24-48 ore s-a determinat numărul de celule microbiene la 1ml de suspensie microbiană, obținută prin diluția acestuia până la 10⁹. S-a inoculat suplimentar pe cutiile Petri, cu utilizarea acelorași medii nutritive, numai în formă agarizată. Procesul de incubare a cutiilor Petri a durat 24-48 ore, după care s-au

numărat coloniile prezente. Ultimele s-au supus prelucrării statistice, iar indicii cantitativi medii, logaritmul zecimal [16].

Rezultate și discuții

Pe parcursul procesului de investigație s-au obținut rezultate relatate în (tab.1)

Final – peste 72 ore incubare concomitentă la temperatura de $(37\pm 1)^\circ\text{C}$.

Analiza datelor tabelului 1 denotă, că toate speciile de microorganisme experimentate sunt compatibile între ele și totuși, la unele specii de bifidobacterii se observă un grad sporit de stimulare a multiplicării microbiene față de lactobacili, enterococi și lactococi. De aceea, rezultatele obținute au servit ca bază informativă pentru selectarea definitivă a unor specii de microorganisme autohtone, care au fost izolate în scopul includerii lor în componența unor remedii medicamentoase.

Tabelul 1

Nivelul cantitativ al compatibilității unor specii de microorganisme aparținente genurilor obligative tubului digestiv uman de perspectivă pentru industria farmaceutică

Nr. seriei	Specia de bacterii supuse testării (1)	Specia de microorganisme utilizate în calitate de test (2)	Cantitatea de celule microbiene la 1ml de suspensie ai microbilor - test, logaritmi zecimali			
			Inițial		Final	
			1	2	1	2
1	2	3	4	5	6	7
I	Bifidobacterium infantis	Lactobacillus acidophilus	9,80±0,12	7,65±0,14	10,17±0,11	8,54±0,09
		Lactobac. helveticus	9,88±0,14	7,49±0,09	9,80±0,11	7,25±0,08
		Lactobac. casei	10,32±0,11	7,81±0,13	10,43±0,10	7,97±0,14
		Lactobac. coryni-formis	9,83±0,15	7,13±0,09	9,74±0,13	6,88±0,11
		Streptococcus thermophilum	10,14±0,15	8,49±0,13	9,97±0,12	8,17±0,10
		Enterococcus faecium	10,30±0,13	8,53±0,11	10,46±0,14	8,65±0,12
		Lactococcus lactis	10,41±0,14	9,13±0,12	10,65±0,09	9,32±0,13
II	B. bifidum	Lactobacillus acidophilus	10,11±0,10	8,77±0,15	10,30±0,14	8,90±0,10
		Lactobac. helveticus	10,17±0,11	7,41±0,15	9,77±0,13	7,14±0,14
		Lactobac. casei	10,38±0,14	7,81±0,13	10,43±0,10	7,97±0,14
		Lactobac. coryni-formis	9,62±0,15	7,47±0,16	9,34±0,13	7,00±0,11
		Streptococcus thermophilum	9,77±0,10	8,41±0,14	9,82±0,12	8,49±0,10
		Enterococcus faecium	10,30±0,13	8,72±0,13	10,59±0,15	8,90±0,12
		Lactococcus lactis	10,00±0,15	8,94±0,12	10,20±0,14	9,14±0,11
III	B. adolescentis	Lactobacillus acidophilus	9,80±0,11	8,47±0,15	9,38±0,10	8,07±0,09
		Lactobac. helveticus	9,38±0,11	7,53±0,10	9,49±0,13	6,96±0,15
		Lactobac. casei	10,41±0,14	7,78±0,12	10,62±0,11	8,17±0,14
		Lactobac. coryniformis	9,76±0,11	7,54±0,13	9,41±0,10	7,20±0,12
		Streptococcus thermophilum	9,80±0,14	8,13±0,10	9,88±0,13	8,62±0,15
		Enterococcus faecium	9,59±0,12	8,30±0,14	9,67±0,11	8,38±0,13
		Lactococcus lactis	9,49±0,15	8,72±0,08	9,76±0,12	9,20±0,14
IV	B. breve	Lactobacillus acidophilus	9,88±0,13	8,86±0,10	9,93±0,15	9,17±0,08
		Lactobac. helveticus	9,41±0,13	7,54±0,11	9,30±0,13	7,11±0,14
		Lactobac. casei	10,14±0,12	8,38±0,15	10,60±0,10	8,54±0,13
		Lactobac. coryniformis	9,64±0,13	7,47±0,16	9,53±0,12	7,14±0,14
		Streptococcus thermophilum	9,77±0,12	8,41±0,11	9,90±0,15	8,64±0,09
		Enterococcus faecium	9,63±0,14	8,80±0,12	9,88±0,10	8,90±0,15
		Lactococcus lactis	9,50±0,16	8,90±0,10	9,77±0,14	9,04±0,13
V	B. longum	Lactobacillus acidophilus	10,20±0,11	8,84±0,13	10,30±0,15	8,96±0,12
		Lactobac. helveticus	10,00±0,12	7,53±0,14	9,72±0,11	7,20±0,13
		Lactobac. casei	10,49±0,15	7,88±0,12	10,53±0,14	7,95±0,10
		Lactobac. coryniformis	9,65±0,13	7,41±0,10	9,32±0,16	7,11±0,12
		Streptococcus thermophilum	9,88±0,12	8,54±0,15	9,92±0,11	8,41±0,13
		Enterococcus faecium	9,90±0,13	8,77±0,14	10,20±0,13	8,96±0,11
		Lactococcus lactis	9,86±0,16	8,90±0,11	10,20±0,12	9,11±0,14

Notă: Inițial – imediat după inoculare concomitentă;

Tabelul 2

Indicii cantitativi ai bacteriocenozei intestinale a șoarecilor, cu și fără administrarea perorală a suspensiei microbiene a diferitor specii de bacterii

Lotul	Microorganismele determinate	Cantitatea de celule microbiene la 1g de conținut intestinal, logaritmi zecimali, conform timpului efectuării cercetărilor		
		Până la administrare	10 zile după administrare	10 zile după finisarea procesului de administrare
1	2	3	4	5
I	1	4,53±0,11	9,38±0,13	9,88±0,16
	2	5,66±0,13	8,47±0,12	8,32±0,14
	3	9,17±0,12	6,38±0,11	6,98±0,13
	4	6,25±0,15	3,17±0,10	2,20±0,11
	5	9,54±0,10	6,38±0,16	6,41±0,15
II	1	4,62±0,12	9,59±0,14	9,60±0,13
	2	5,64±0,11	8,88±0,13	8,72±0,15
	3	9,19±0,14	6,38±0,15	6,20±0,11
	4	6,14±0,13	3,20±0,09	2,17±0,12
	5	9,69±0,15	6,47±0,10	6,25±0,14
III	1	4,47±0,09	9,64±0,11	9,92±0,15
	2	5,74±0,14	8,92±0,15	8,54±0,11
	3	9,53±0,11	6,49±0,13	6,17±0,14
	4	6,11±0,10	3,07±0,08	2,13±0,12
	5	9,53±0,14	6,32±0,12	6,20±0,10
IV	1	4,38±0,15	9,82±0,14	9,98±0,12
	2	5,47±0,12	8,86±0,13	8,69±0,15
	3	9,62±0,13	6,30±0,12	6,25±0,14
	4	6,13±0,14	3,17±0,11	2,20±0,13
	5	9,59±0,13	6,32±0,10	6,64±0,14
V	1	4,49±0,11	8,86±0,13	8,72±0,16
	2	5,54±0,12	9,54±0,15	9,38±0,14
	3	9,14±0,14	6,20±0,12	5,92±0,13
	4	6,20±0,13	2,07±0,08	1,49±0,07
	5	9,65±0,10	5,41±0,11	5,20±0,12
VI	1	4,54±0,14	8,92±0,15	9,88±0,11
	2	5,60±0,15	9,49±0,14	9,20±0,15
	3	9,32±0,11	6,30±0,12	6,17±0,13
	4	6,41±0,12	3,17±0,09	2,04±0,10
	5	9,77±0,13	5,65±0,13	5,53±0,14
VII	1	4,49±0,13	4,60±0,11	4,41±0,10
	2	5,32±0,14	5,38±0,13	5,20±0,11
	3	8,80±0,15	8,92±0,15	8,77±0,13
	4	6,04±0,10	6,13±0,12	6,11±0,09
	5	9,53±0,16	9,62±0,14	9,59±0,15

Notă: Loturile de animale: I-VI experimentale; VII - martor.

S-a constatat, că cele mai de perspectivă pentru industria farmaceutică pot fi considerate următoarele specii de bacterii: *Bifidobacterium infantis*; *B. bifidum*; *B. breve*; *B. longum*; *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus casei*; *Enterococcus faecium* și *Lactococcus lactis*. Acestea au și fost propuse spre experimentare în condiții "in vivo" pe animale de laborator – șoareci albi.

Experiențele s-au efectuat în 7 loturi, dintre care I-VI au fost experimentale, iar VII – martor. Loturile s-au divizat în

felul următor: I, II și III au primit câte o tulpină de bifidobacterii, IV - două tulpini de bifidobacterii; V – două tulpini de lactobacterii și VI – bifido- în asociere cu lactobacterii, iar VII a servit în calitate de martor.

Rezultatele obținute sunt incluse în tabelul 2.

Microorganismele din genurile: 1-*Bifidobacterium*; 2-*Lactobacillus*; 3-*Escherichia*; 4- *Proteus* și 5- familia *Cocccaceae*.

Analizând tabelul 2 la general, putem afirma, că toate speciile de microorganisme experimentate, fiind aparte sau în asociere, au demonstrat o compatibilitate sporită față de reprezentanții bacteriocenozei obligative. Totodată, s-a evidențiat o influență inhibitorie asupra florei microbiene intestinale din genurile facultative, pe exemplul escherichiilor, proteilor și cocilor. Cele expuse sunt confirmate de către indicii cantitativi ai escherichiilor în conținutul intestinal al șoarecilor din loturile I-VI, care s-a micșorat, în mediu, respectiv cu: 2,79; 2,81; 3,04; 3,32; 2,94; 3,02 logaritmi zecimali la 1g, cea ce a constituit respectiv 30,40;30,57; 31,89; 34,51; 32,16 și 32,40%. Numărul proteilor a scăzut cu: 3,08; 2,94; 3,04; 3,06; 3,13 și 3,16 lg/g sau cu 49,28; 47,88; 49,75; 49,91; 50,48 și 50,54%. Asemenea tendință observăm și referitor la microorganismele în formă de coci, exprimată prin scăderea nivelului cantitativ de coci respectiv cu: 3,16;3,22; 3,21; 3,27; 4,21 și 4,12 lg/g sau cu 33,12; 33,23; 33,68; 34,69; 43,62 și 42,16%.

În continuare, s-a atras atenția la proprietățile adezive ale unor specii de bacterii testate pe animalele de laborator-șoareci albi. Pentru aceasta s-a luat în evidență cantitatea de celule microbiene aderate la 1g de omogenat de celule epiteliale ale colonului lor, prin inocularea mostrelor pe medii nutritive electiv din diluțiile lor zecimale respective. Loturile de șoareci au fost adecvate celor din tabelul 2, iar materialul de cercetare a fost acumulat de la indivizii decapitați la finele experienței efectuate.

Datele studiului indicilor capacității adezive ai speciilor de bacterii experimentate sunt incluse în tabelul 3.

Datele tabelului 3 denotă, că cele mai de perspectivă sunt rezultatele obținute în loturile IV și VI, reflectând o adezivitate sporită. Aceasta argumentează raționalitatea propunerii speciilor de bacterii experimentate în asemenea loturi (tab.2), pentru utilizarea lor la pregătirea unor remedii medicamentoase cu destinație sanogenă, demonstrând date comparativ mai sporite.

Așadar, conform rezultatelor obținute și incluse în tabelele 2 și 3 putem conchide că, în baza faptului menținerii nivelului cantitativ optimal al reprezentanților obligativi ai bacteriocenozei intestinale și capacităților lor adezive, este rațional de considerat că genurile bacteriene *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* și *Lactococcus* cu speciile *infantis*; *bifidum*; *breve*; *longum*; *acidophilus*; *casei*; *faecium* și *lactis* sunt cele mai de perspectivă pentru elaborarea remediilor medicamentoase cu destinație sanogenă.

Concluzii

1. La propunerea: selectarea speciilor de microorganisme pentru utilizare în industria farmaceutică, e rațional de luat în considerație, preponderent, nivelul sporit al compatibilității generale al acestora sau proprietățile lor stimulatorii.

2. Perspectivitatea speciilor de bacterii pentru industria farmaceutică este mai argumentată în cazul evidențierii ei numai în condiții "in vivo".

Bibliografie

- AHRNE S., LONNERMARK E., WOLD A.E., et al. Lactobacili in the intestinal microbiota of Swedish infants. //Microbes Infect. 2005 Aug-Sep;7(11-12):1256-1262.
- ANNUK H., SHCHEPETOVA J., KULLISAAR T. et al. Characterization of intestinal lactobacillias putative probiotic candidates. – 2003. – 94 (3) : 403-412.
- DE ANGELIS M., SIRAGUSA S., BERLOCO M. et al. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. //Res. Microbiol. – 2006. – 157(8):792-801.
- FOLIGNE B., NUTTEN S., GRANGETTE C. et al. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. //World J Gastroenterol. – 2007. – 13(2):236-243.
- FOULQUIÉ MORENO M.R., SARANTINOPOULOS P. TSAKALIDOU E., DEVUYST L. The role and application of enterococci in food and health. //Int. J. Food Microbiol. – 2006. – 106(1):1-24.
- GUARNER F. Enteric flora in health and disease. //Digestion. – 2006. – 73; 5-12.
- GILL H.S., GUARNER F. Probiotics and human health: a clinical perspective. //Postgrad. Med. J. - 2004. – 80(947) : 516-526.
- HAMMERMAN C., KAPLAN M. Probiotics and neonatal intestinal infection. //Curr. Opin. Infect Dis. – 2006. – 19(3): 277-282.
- ISOLAURI E, SALMINEN S. Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. //J Clin Gastroenterol. 2008 Jul; 42 Suppl 2:S91-96.
- 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.
- MOUBARECK C., LECSO M., PINLOCHE E. et al. Inhibitory impact of bifidobacteria on the transfer of beta-lactam resistance among Enterobacteriaceae in the gnotobiotic mouse digestive tract. //Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – 73(3):855-60.
- PARVEZ S., MALIK K.A., AH. KANG S., KIM H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. // J Appl Microbiol. – 2006 - 100(6):1171-1185.
- RAZI, GOLLOP N., POLAK-CHARCON S., SCHWARTZ B. Isolation and characterization of new putative probiotic bacteria from human colonic flora. //Br. J Nutr. – 2007. – 97(4):725-734.
- RIED K. Gastrointestinal health. The role of pro- and pre-biotics in standard foods. //Aust. Fam. Physician. – 2004. – 33(4) : 253-255.
- SANTOSA S., FARNWORTH E., JONES P.J. Probiotics and their potential health claims. //Nutr. Rev. – 2006. – 64(6):265-274.
- TIMOȘCO MARIA. Stresul și flora microbială intestinală. Chișinău. – 2005. – 172p.
- TIMMERMAN H.M., NIERIS L.E., RIDWAN B.U. et al. Design of a multispecies probiotic mixture to prevent infectious complications in critically ill patients. //Clin. Nutr. – 2007. – 26(4):450-459.
- НОВИК Г.И., САМАРЦЕВ А.А., АСТАПОВИЧ Н.И и др. Биологическая активность микроорганизмов-пробиотиков. //Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – 42(2):187-194.
- ЧЕРВИНЕЦ В.М., БОНДАРЕНКО В.М., САМОУКИНА А.М., ЧЕРВИНЕЦ Ю.В. Скрининг непатогенных антагонистически активных штаммов Enterococcus faecium. //Ж. микробиол., Эпидимiol., Иммунобиол. – 2007. –(1): 57-61.