

CĂI DE MENȚINERE A MICROBIOCENOZEI INTESTINALE LA COBAI LA NIVEL OPTIM

Timoșco Maria, Strutinschi Tudor, Velciu Aliona, Bogdan Victoria, Strocov Valentina

Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al Academiei de Științe a Moldovei

Rezumat

Au fost depistate cele mai eficiente căi, care pot asigura reconstituirea microbiocenozei intestinale și menținerea ei la nivel optim. Au fost studiați indicii cantitativi ai unor reprezentanți ai bacteriocenozei intestinale sub acțiunea diverselor rații alimentare, inclusiv și cu diferite adaosuri (prebiotice, lactuloza, probiotice în asociere cu lactuloza). În experiențe pe animale model (cobai) au fost stabilite particularitățile acțiunii a astfel de rații asupra microbiocenozei intestinale. S-a constatat că probioticele în asociere cu lactuloza au manifestat acțiune mai benefică asupra bacteriocenozei intestinale, fapt pozitiv ce a servit ca bază de a le recomanda pentru practică. Toate adaosurile alimentare au exercitat acțiune benefică asupra valorii numerice a microorganismelor studiate. S-a dovedit că reconstituirea microbiocenozei intestinale și menținerea ei la nivel optim pentru sănătate poate fi pozitivă numai prin calea de selectare experimentală (utilizarea probioticelor în asociere cu lactuloza).

Cuvinte cheie: microbiocenoză, indici cantitativi, probiotici, nivel optim, microorganisme, bacteriocenoză intestinală.

Depus la redacție 29 iulie 2014

Adresa pentru corespondență: Ciocchina Valentina, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail: valentina.ciocchina@gmail.com; tel. (+373 22) 73-71-42

Introducere

Actualmente se consideră că flora microbiană a tubului digestiv uman și animal are o componență specifică, iar nivelul indicilor ei cantitativi și calitativi depinde de acțiunea diverșilor factori, în special ai mediului ambiant, precum și de vârsta individului [1, 17]. Totodată se cunoaște, că bacteriocenoza intestinală se găsește în stare de eubioză sau de echilibru microbian numai în cazul când fiecare reprezentant bacterian al acesteia corespunde cerințelor normative. Micșorarea valorii numerice a microorganismelor din genurile obligative tubului digestiv (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* etc.) și măririi a celor ce aparțin genurilor facultative (*Escherichia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* etc.) duce la modificarea microbiocenozei intestinale în disbioză sau dismicrobism [6, 13, 17, 18, 21]. Unele cercetări au confirmat faptul că asemenea stare are o răspândire foarte largă la copii și maturi (în special, se referă la vârstele vulnerabile de până la 1 an și după 50 ani) [17, 18, 21], motiv din care investigațiile multor cercetători au fost dedicate explorării căilor normalizării bacteriocenozei dereglate. Astfel, unii autori au recomandat utilizarea bacteriilor cu proprietăți probiotice [5, 9, 16, 17], a preparatelor farmaceutice cu o astfel de destinație [1, 3, 9, 12] sau a probioticelor de tip metabolic [20], iar alții au constatat că pot fi folosite și diverse adaosuri alimentare sau prebiotice [7, 8]. De asemenea, au fost evidențiate și unele substanțe cu acțiune benefică asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a microorganismelor din genurile obligative ale tubului digestiv (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* etc.), cum ar fi cele „bifidogene” [4, 15, 19] și fibrele alimentare [10].

În unele cazuri s-au prevăzut și căi complexe de reconstituire a bacteriocenozei intestinale prin utilizarea probioticelor și a substanțelor sau a adaosurilor alimentare cu acțiune prebiotică aparte [2, 10, 11, 14] sau în combinație cu preparate farmaceutice simbiotice [14]. De asemenea, au fost obținute rezultate pozitive la utilizarea probioticelor în asociere cu fibrele alimentare [12].

Se cunoaște că sănătatea organismului cere nu numai corecția componenței microflorei, dar și menținerea ei la nivel sanogen, însă, în literatura de specialitate nu a fost regăsită această idee.

Cele expuse mai sus, precum și faptul că sănătatea organismului reprezintă starea sanogenă a tuturor organelor și a sistemelor lui, au determinat scopul lucrării date de a explora, în mod experimental, căile eficiente de menținere a microbiocenozei intestinale la nivel optim pentru sănătate.

Material și metode de cercetare

Experimentele au fost realizate pe animale de laborator (cobai) în două serii.

În prima serie s-a prevăzut utilizarea rației alimentare (standard pentru animale de laborator) și a rației nou elaborate (destinată consumului uman) cu diferite adaosuri alimentare.

Rația nouă elaborată în premieră în laboratorul Alimentație și digestie sanocreatologică al IFS al AȘM includea o doză zilnică de 80g - amestec de cereale; 210g - amestec de legume; 50g - carne; 4,0 ml - lipide vegetale.

Pentru elucidarea impactului rației noi cu adaosurile alimentare asupra statusului cantitativ al microflorei intestinale, animalele de laborator au fost divizate în 6 loturi.

În lotul I s-a administrat rația-standard (lotul-martor), iar în loturile II-VI (loturile experimentale) a fost testată rația nou elaborată în combinație cu diverse adaosuri

nutritive conform următoarei scheme: lotul II – cu fibre alimentare; III – cu preparatul prebiotic „Presan” (adaos alimentar biologic activ); IV - cu substanța „bifidogenă” lactuloza (preparat farmaceutic medulac – WM); V - cu probiotice (asociație de bacterii, reprezentanți ai genurilor *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* și *Enterococcus*); VI - cu probiotice în asociere cu lactuloză.

În seria a II-a de experimente pe aceleași loturi de animale a fost investigat statusul microbial intestinal după excluderea adaosurilor alimentare.

Pe parcursul procesului investigațional s-au cercetat mostrele de conținut intestinal diluat de la 10^{-1} până la 10^{-9} , utilizând metode clasice [18, 21]. S-a determinat nivelul cantitativ al microorganismelor din genurile *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Proteus* și familia *Streptococcaceae*. Inocularea mostrelor s-a efectuat pe medii nutritive comercializate de către firma Himedia, fiind electiv pentru fiecare gen de bacterii cu incubarea lor în condiții aerobe și anaerobe timp de 24-72 ore la temperatura de $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Cantitatea de colonii de microorganisme crescute pe medii nutritive agarizate înmulțită la numărul diluției exprimată în logaritmi zecimali a servit pentru calcularea indicilor cantitativi ai reprezentanților bacteriocenozei intestinale. Rezultatele s-au perfectat în mod comparativ, luând în considerare datele obținute până la inițierea experiențelor (inițial) și după finalizarea lor (final).

Rezultate și discuții

Rezultatele obținute în prima serie de experimente sunt prezentate în tabelul 1.

Datele din tabelul 1 denotă că în lotul-martor pe parcursul investigației rația standard a influențat negativ asupra reprezentanților din genurile facultative. Acest fapt este confirmat prin creșterea considerabilă a numărului de celule microbiene vii ale genurilor *Escherichia*, *Proteus* și familia *Streptococcaceae*, fiind mai mare comparativ cu inițialul respectiv cu 12,85; 19,37 și 26,20 %.

Analizând rezultatele obținute la animale din lotul II, s-a constatat că rația alimentară utilizată în acest lot a contribuit la mărirea numărului lactobacililor în mediu cu 26,66% și la diminuarea cantității escherichiilor, streptococilor și a proteilor respectiv cu 14,68; 40,66 și 12,43%, manifestând astfel acțiune pozitivă. Concomitent s-a înregistrat și scăderea numărului de bifidobacterii în mediu cu 16,20 %, ceea ce se consideră acțiune negativă. La animalele din lotul III, cărora li s-a administrat rația alimentară elaborată în combinație cu adaosul alimentar biologic activ „Presan” s-a observat majorarea cantității bifidobacteriilor și a lactobacililor respectiv cu 28,62 și 31,35%, precum și diminuarea numărului de escherichii, streptococi și protei respectiv cu 20,20; 12,15 și 21,90%, ceea ce denotă despre acțiunea benefică.

Comparând datele obținute în prima serie de experimente s-a stabilit acțiunea pozitivă a lactulozei și a probioticelor aparte, precum și în asociere (loturile IV-VI). Aceasta a fost confirmat prin faptul că în loturile IV-VI microorganismele studiate au avut tendința de multiplicare, dar care se manifesta diferit. Dacă la animalele din lotul IV, numărul bifidobacteriilor și lactobacililor s-a mărit respectiv cu 15,26 și 19,07%, atunci la cele din loturile V și VI, indicii cantitativi ai acestor bacterii au sporit respectiv cu 47,02; 37,25 și cu 56,40; 42,03%. Concomitent s-a constatat diminuarea valorii numerice a microorganismelor din genurile facultative (*Escherichia*, *Streptococcaceae* și *Proteus*): în lotul IV cu 13,16; 15,87 și 28,99%; în lotul V - 30,67; 21,73 și 38,31%, iar în lotul VI - 34,88; 29,89 și 100,00% respectiv.

Tabelul 1. Indicii cantitativi ai unor reprezentanți ai bacteriocenozei intestinale la cobai în cazul utilizării rației elaborate cu diverse adaosuri alimentare

Lotul	Genurile microorganismelor	Cantitatea de celule microbiene la 1g de conținut intestinal, logaritmi zecimali (log)		Deosebirea , %	
		Inițial	Final	față de inițial	față de martor
I	1	5,34±0,20	5,46±0,35	<2,24	
	2	4,17±0,20	4,32±0,35	<3,59	
	3	6,54±0,27	7,20±0,37	<12,85	
	4	5,47±0,26	6,53±0,20	<19,37	
	5	4,07±0,20	5,14±0,40	<26,20	
II	1	7,59±0,36	6,36±0,31**	> 16,20	<16,48
	2	5,92±0,45	6,65±0,35**	< 26,66	<53,93
	3	5,72±0,50	4,88±0,30**	> 14,68	-32,22
	4	3,91±0,30	2,32±0,34**	> 40,66	-64,47
	5	7,56±0,32	6,62±0,20***	>12,43	
III	1	5,17±0,20	6,65±0,27	<28,62	<21,79
	2	4,72±0,20	6,20±0,20	<31,35	<43,51
	3	6,88±0,40	5,49±0,19	>20,20	-23,75
	4	5,38±0,20	4,71±0,20	>12,15	-27,87
	5	4,14±0,32	3,23±0,19	>21,90	-37,15
IV	1	5,83±0,35	6,72±0,20	<15,26	<23,07
	2	4,77±0,40	5,68±0,20	<19,07	<31,48
	3	6,38±0,27	5,54±0,19	>13,16	-23,05
	4	6,11±0,20	5,14±0,26	>15,87	-21,28
	5	4,38±0,56	3,11±0,27	>28,99	-39,49
V	1	5,53±0,15	8,26±0,09	<47,02	<51,28
	2	4,43±0,13	6,08±0,07	<37,25	<40,74
	3	8,90±0,16	6,17±0,14	>30,67	-14,30
	4	5,20±0,12	4,07±0,08	>21,73	-37,67
	5	8,77±0,14	5,41±0,11	>38,31	< 5,25
VI	1	5,62±0,20	8,79±0,09	<56,40	<60,98
	2	4,71±0,35	6,69±0,09	<42,03	<54,86
	3	6,25±0,37	4,07±0,08	>34,88	-43,47
	4	6,59±0,24	4,62±0,20	>29,89	-29,24
	5	4,17±0,32	0	>100,00	-100,00

Notă: Loturile de animale sunt diferențiate în text. Genurile de microorganisme: 1–*Bifidobacterium*, 2–*Lactobacillus*, 3–*Escherichia*, 4 – familia *Streptococcaceae*, 5 – *Proteus*.

Astfel, în baza rezultatelor analizate se poate afirma, că adaosurile alimentare utilizate în loturile III, IV, V și VI pot fi considerate drept căi de acțiune pozitivă asupra tuturor reprezentanților microbieni determinați. De menționat, că cele mai demonstrative date au fost obținute în lotul VI, fapt ce indică prioritatea adaosului administrat în lotul dat (probiotice în asociere cu lactuloză).

În seria II de experimente a fost cercetată modificarea numerică a microorganismelor din genurile studiate în conținutul intestinal al cobailor după excluderea din rația alimentară a adaosurilor testate în seria I de experimente.

Rezultatele obținute sunt relatate în tabelul 2.

Tabelul 2. Indicii cantitativi ai unor reprezentanți ai bacteriocenozei intestinale la cobaii hrăniți conform rației alimentare elaborate după excluderea adaosurilor testate în prima serie de investigații.

Lotul	Genurile de Microorganisme	Cantitatea de celule microbiene la 1g de conținut intestinal, logaritmi zecimali (log)		Deosebirea, %	
		Inițial	Final	față de inițial	față de martor
I	1	5,46±0,35	4,64±0,14	< 1,75	
	2	4,32±0,35	4,72±0,17	< 2,83	
	3	7,20±0,37	7,88±0,32	< 15,54	
	4	6,53±0,20	6,07±0,14	< 14,09	
	5	5,14±0,40	5,11±0,44	> 0,58	
II	1	6,36±0,31	7,23±0,32	< 11,67	<55,81
	2	6,65±0,35	4,11±0,41	> 38,19	>12,92
	3	4,88±0,30	4,81±0,30	> 1,43	>38,95
	4	6,62±0,20	8,30±0,40	< 25,37	<62,42
	5	2,32±0,34	3,32±0,28	< 43,10	> 45,30
III	1	6,65±0,27	7,32±0,20	<10,07	<57,75
	2	6,20±0,20	6,86±0,20	<10,64	<45,33
	3	5,49±0,19	4,93±0,20	>10,20	>37,43
	4	4,71±0,20	5,07±0,06	<7,64	>16,47
	5	3,23±0,19	3,14±0,32	>2,78	>38,55
IV	1	6,72±0,20	7,46±0,19	<11,01	<60,77
	2	5,68±0,20	6,20±0,20	< 9,15	<31,35
	3	5,54±0,19	5,77±0,19	< 4,15	>26,77
	4	5,14±0,26	5,41±0,26	< 5,25	>10,87
	5	3,11±0,27	3,32±0,20	< 6,75	>35,02
V	1	8,26±0,09	9,40±0,11	<13,80	<102,58
	2	6,08±0,07	7,00±0,13	<15,13	>48,30
	3	6,17±0,14	5,43±0,12	>12,00	>31,09
	4	4,07±0,08	4,48±0,15	<10,07	<26,19
	5	5,41±0,11	5,17±0,14	>4,43	<1,17
VI	1	8,79±0,09	9,82±0,12	<14,18	<111,63
	2	6,69±0,09	7,80±0,20	<16,59	<65,25
	3	4,07±0,08	3,47±0,19	>14,74	>55,96
	4	4,62±0,20	5,04±0,20	< 9,09	>16,96
	5	0	0	0	>100,00

Notă: Loturile de animale sunt diferențiate în text. Genurile de microorganisme: 1–*Bifidobacterium*, 2–*Lactobacillus*, 3–*Escherichia*, 4 – familia *Streptococcaceae*, 5 – *Proteus*.

Analiza detaliată a datelor prezentate în tabelul 2 a evidențiat deosebiri esențiale între loturi. În lotul I s-a observat sporirea cantității microorganismelor din majoritatea genurilor determinate. În lotul II s-a înregistrat diminuarea numărului lactobacililor și majorarea considerabilă a streptococilor și proteilor. Datele incluse în tabelul 2 demonstrează efectul pozitiv de menținere a indicilor cantitativi ai microorganismelor determinate, pe fondalul utilizării precedente a adaosurilor alimentare testate în loturile III-VI, însă gradul de manifestare a acțiunii este diferit.

Astfel, la animalele din loturile III-V cantitatea bifidobacteriilor și a lactobacililor s-a majorat respectiv cu: 10,07 și 10,64; 11,01 și 9,15; 13,80 și 15,13%, iar la cele din

lotul VI - cu 14,18 și 16,59%. Deosebiri s-au constatat și în diminuarea cantitativă a escherichiilor și a proteilor, care în lotul III a constituit 10,20 și 2,78%, în lotul IV – 4,15 și 6,75%, în lotul V – 12,00 și 4,43%, iar în lotul VI numărul bacteriilor genului Escherichia a scăzut cu 14,74%, iar reprezentanții genului Proteus nu s-au depistat.

Adaosurile utilizate n-au contribuit la diminuarea indicilor cantitativi ai bacteriilor familiei Streptococcaceae, influențând doar indicii calitativi ai genului Enterococcus, în special, a speciei E.faecium, comparativ cu E.fecalis, ceea ce este considerată drept o tendință pozitivă, deoarece această specie de microorganisme nu are proprietăți patogene. Totodată E.fecalis, fiind reprezentant al bacteriilor cu proprietăți patogene, este considerat de categorie condiționat patogenă și diminuarea numerică prezintă un fapt pozitiv.

Se cunoaște că cel mai informativ indice ce caracterizează starea sănătății macroorganismului este adaosul la masa corporală a individului. De aceea, în experimente s-a înregistrat creșterea acestuia în dependență de rația elaborată cu adaosurile alimentare administrate anterior.

Rezultatele obținute sunt reflectate în tabelul 3.

Datele prezentate în tabelul 3 confirmă faptul că toate adaosurile alimentare testate au manifestat acțiune benefică asupra macroorganismului, contribuind la menținerea bacteriocenozei intestinale la nivel optimal, astfel și influențând asupra sănătății lui.

Tabelul 3. Masa corporală a cobailor, care au primit diverse adaosuri alimentare.

Loturile	Masa corporală, g		Deosebirea comparativă, %	
	Inițial	Final	Cu inițialul	Cu martorul
I	390,0±3,80	419,25±3,57	7,50	
II	400,0±4,30	462,50±9,65	15,65	8,15
III	385,0±3,60	455,00±3,16	18,80	11,30
IV	367,5±4,07	417,50±3,88	13,60	6,10
V	350,0±4,12	430,00±3,60	22,85	15,35
VI	375,0±4,25	479,5±3,70	27,86	20,36

Notă: Loturile sunt identice celor din tabelul 1.

Așadar, conform rezultatelor obținute privind modificarea valorii numerice a reprezentanților microbieni determinați și a masei corporale a cobailor, cărora li s-a administrat diverse suplimente nutritive, au fost evidențiate unele căi de menținere a bacteriocenozei intestinale optime pentru sănătate. Cel mai benefic efect a fost înregistrat în lotul VI, comparativ cu celelalte loturi. Astfel, putem afirma că în baza rezultatelor obținute a fost posibilă selectarea unei căi eficiente, care a demonstrat o acțiune comparativ mai benefică asupra bacteriocenozei intestinale și a sănătății organismului și poate fi recomandată pentru implementare.

Concluzii

1. Utilizarea rației alimentare elaborate în combinație cu adaosurile experimentate, în scopul menținerii microbiocenozei intestinale la nivel optim pentru sănătate este posibilă numai în cazul dismicrobismului intestinal de până la 6 zile, iar la cel cu o durată mai mare de 6 zile - numai a rației cu adaosul alimentar cu cel mai benefic efect (probiotice în asociere cu adaosul alimentar – lactuloza).

2. Adaosul alimentar lactuloza este compatibil cu probioticele și contribuie la intensificarea acțiunii pozitive concomitente a acestora atât asupra macroorganismului (cu 20,36%) cât și a reprezentanților bacteriocenozei intestinale (numărul bacteriilor genurilor *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* – a sporit respectiv cu 60,77 și 31,35%, iar *Escherichia* și *Proteus* – a scăzut cu 26,77 și 35,02%).

Articolul a fost realizat cu suportul financiar al proiectului 11.817.09.02A - „Elaborarea metodelor fiziologice de fortificare și menținere a sănătății somatice și psihice“.

Bibliografie

1. Dogi C.A., Perdigón G. Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. //J. Dairy Res. – 2006.- 73(3):357-366.
2. Ewaschuk J.B., Dieleman L.A. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. //World J Gastroenterol. – 2006. - 12(37):5941-5950.
3. Floch M.H., Madsen K.K., Jenkins D.J., et al., Recommendations for probiotic use. //J Clin Gastroenterol. – 2006. - 40(3):275-278.
4. Kien C.L., Blauwiekel R., Williams C.H. et al. Lactulose feeding lowers cecal densities of clostridia in piglets. //JPEN J Parenter. Enteral Nutr. - 2007. - 31(3):194-198.
5. 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.
6. Lamps L.W. Infective disorders of the gastrointestinal tract. //Histopathology. - 2007. - 50(1):55-63.
7. Mountzouris K.C., Balaskas C., Fava F. et al. Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. //Anaerobe. – 2006. - 12(4):178-85.
8. Mountzouris K.C., Tsirotsikos P., Kalamara E. et al. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. //Poult. Sci. – 2007. - 86(2):309-317.
9. Park J., Floch M.H. Prebiotics, probiotics, and dietary fiber in gastrointestinal disease. //Gastroenterol. Clin. North Am. – 2007. - 36(1):47-63.
10. Puccio G., Cajozzo C., Meli F. et al. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. //Nutrition. – 2007. - 23(1):1-8. Quigley E.M., Flourie B. Probiotics and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and an assessment of the evidence to date. //Neurogastroenterol. Motil. – 2007. - 19(3):166-172.
11. Salminen S., Isolauri E., Onnela T. Gut flora in normal and disordered states. //Chemotherapy. – 2004. – 41 (1) Suppl. : 5-15.
12. Scholz-Ahrens K.E., Ade P., Marten B. et al. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. //J Nutr. – 2007. - 137(3 Suppl 2):838S-846S.
13. Suzuki A., Mitsuyama K., Koga H. et al. Bifidogenic growth stimulator for the treatment of active ulcerative colitis: a pilot study. // Nutrition. – 2006 - 22(1):76-81.
14. Timoșco Maria, Velciu Aliona, Florea Natalia, Bogdan Victoria. Microorganismele din genurile obligatorii tractului gastrointestinal uman cu unele proprietăți potențiale sanobiotice. // Imfo-med. - 2010. – 1 (16):36-39.
15. Velciu Aliona, Timoșco Maria, Ciocchină Valentina ș.a. Diferențierea dismicrobismului și disfuncțiilor intestinale diareice. Chișinău: 2011. 38 p.

16. *Ардатская М.Д., Миңушкин О.Н., Иконников Н.С.* «Дисбактериоз кишечника» //Пособие для врачей. – М.,2004. – 35с.
17. *Гаврилов Г.Б. и др.* Развитие пробиотической микрофлоры в продукте с лактулозой. //Молочная промышленность. – 2006 – 6: 61- 62.
18. *Мазанкова Л.Н., Ильина Н.О., Кондракова О.А., Затевалов А.М.* Клинико-лабораторная эффективность пробиотика метаболического типа Хилиак-форте при ОКИ у детей //Consilium Medicum.Приложение «Педиатрия». – 2004. -2:34-37.
19. *Юрасова Н.И., Римарчук Г.В.* Современные представления о дисбиозах кишечника у детей // Consilium Medicum. – 2001. – Т.3,№8. –С.13-17.