UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚE ALE NATURII
Consorțiul: Universitatea de Stat din Moldova, Institutul de Dezvoltare a Societății Informaționale, Universitatea de Stat „Bogdan Petriceicu Hasdeu" din Cahul

Cu titlul de manuscris

CZU: [612.33 + 591.13]:579.864(043)

BOGDAN VICTORIA

ROLUL FIZIOLOGIC AL ENTEROCOCILOR INTESTINALI ÎN MENȚINEREA SĂNĂTĂȚII TUBULUI DIGESTIV

165.01 – Fiziologia omului și animalelor

Teza de doctor în științe biologice

Conducători științifici:

TIMOȘCO Maria,
doctor habilitat în științe biologice,
profesor cercetător

VRABIE Valeria,
doctor în științe biologice,
conferențiar cercetător

Autor:

CHIȘINĂU, 2024

© Bogdan Victoria, 2024

CUPRINS

	ADNOTARE.....	**5**
	АННОТАЦИЯ.....	**6**
	ANNOTATION.....	**7**
	LISTA ABREVIERILOR	**8**
	LISTA TABELELOR.....	**9**
	LISTA FIGURILOR	**11**
	INTRODUCERE….....	**13**
1.	**SEMNIFICAȚIA MICROBIOTEI INTESTINALE ÎN FUNCȚIONALITATEA ȘI SĂNĂTATEA ORGANISMULUI. ROLUL FIZIOLOGIC ȘI POTENȚIALUL PROBIOTIC AL ENTEROCOCILOR**	**21**
1.1	Funcțiile fiziologie ale microbiotei intestinale	**22**
1.2.	Semnificația fiziologică a corelației dintre microfloră și macroorgansim în procesul colonizării.....	**24**
1.3.	Interrelațiile microbiotei cu organismul-gazdă și rolul fiziologic al acestora în sănătatea tubului digestiv și a organismului.....	**29**
1.4.	Incidența și rolul enterococilor în sănătatea tubului digestiv și a organismului integru	**36**
1.5.	Potențialul enterococilor în calitate de probiotice	**45**
1.6.	Concluzii la capitolul 1.....	**50**
2.	**MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE**	**53**
2.1.	Material de studiu	**53**
2.2.	Metode de izolare și determinare cantitativă a enterococilor	**55**
2.2.1.	Izolarea, identificarea și determinarea tulpinilor pure de microorganisme luate în studiu	**55**
2.2.2.	Cuantificarea tulpinilor de bacterii investigate	**59**
2.3.	Descrierea schemelor experimentelor ce au vizat studiul aspectelor fiziologice ale enterococilor	**60**
2.3.1.	Studierea incidenței enterococilor la subiecți umani și la animale	**60**
2.3.2.	Studierea influenței rației alimentare asupra efectivului de enterococi	**61**
2.3.3.	Studierea incidenței enterococilor în funcție de statutul fiziologic al organismului-gazdă	**64**
2.4.	Studierea proprietăților tulpinilor de enterococi în calitate de probiotice	**65**
2.4.1.	Determinarea capacității adezive a tulpinilor izolate de enterococi.....	**65**
2.4.2.	Determinarea activității antagoniste a tulpinilor de enterococi față de unii reprezentanți ai florei microbiene condiționat-patogene și patogene.....	**66**
2.4.3.	Investigarea compozițiilor microbiene cu utilizarea tulpinilor de enterococi	**66**
2.4.4.	Studierea compatibilității enterococilor cu alte grupe de bacterii.....	**68**
2.5.	Metode de prezentare și calculare a rezultatelor obținute	**68**
2.6.	Concluzii la capitolul 2.....	**70**
3.	**INCIDENȚA, NIVELUL CANTITATIV ȘI ROLUL FIZIOLOGIC AL ENTEROCOCILOR ÎN TUBUL DIGESTIV UMAN ȘI ANIMAL**..	**71**
3.1.	Incidența enterococilor în grupul bacteriilor acidolactice sub formă de coci	

(lactococi și streptococi)..... **72**
3.2. Incidența și nivelul cantitativ al enterococilor în diferite obiecte biologice luate în studiu în funcție de specie, mediul de trai, vârstă și starea sănătății tubului digestiv..... **74**
3.2.1. Incidența și nivelul cantitativ al enterococilor în conținutul intestinal la diverse specii de animale și în diferite medii de viață **74**
3.2.2. Incidența și nivelul cantitativ al enterococilor în dependență de vârstă și starea sănătății tubului digestiv..... **81**
3.3. Influența rației alimentare asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali **89**
3.3.1. Influența rației alimentare de diferită valoare nutritivă asupra incidenței enterococilor intestinali **90**
3.3.2. Influența rației alimentare cu diferită structură calorică asupra incidenței enterococilor intestinali **108**
3.4. Valoarea numerică a enterococilor în corelație cu statutul fiziologic al organismului gazdei **119**
3.5. Concluzii la capitolul 3..... **133**
4. PROSPECȚIUNEA UNOR TULPINI DE ENTEROCOCI ÎN CALITATE DE PROBIOTICE **136**
4.1. Izolarea tulpinilor de enterococi și studierea proprietăților de adeziune și activității antagoniste față de patogeni ale acestora în vederea utilizării lor ca probiotice..... **137**
4.2. Compatibilitatea enterococilor cu alte bacterii specifice microbiocenozei tubului digestiv..... **150**
4.3. Influența unor noi compoziții microbiene pe bază de enterococi asupra anumitor parametri funcționali la animalele de interes economic (animale agricole) **157**
4.4. Concluzii la capitolul 4..... **168**
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI **170**
BIBLIOGRAFIE **173**
ANEXE…….. **200**
Anexa 1..... **200**
Anexa 2..... **202**
Anexa 3..... **221**
Anexa 4..... **222**
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII **248**
CURRICULUM VITAE AL AUTORULUI **249**

ADNOTARE

BOGDAN Victoria „Rolul fiziologic al enterococilor intestinal în menținerea sănătății tubului digestiv”, teză de doctor în științe biologie, Chișinău, 2024.

Structura tezei: introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 360 de titluri, volumul tezei este de 250 de pagini, 172 de pagini de text de bază, 4 anexe, 19 de figuri, 36 de tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 22 de lucrări științifice.

Cuvintele-cheie: enterococi, rol fiziologic, microbiotă intestinală, sănătate, factor alimentar, probiotic.

Scopul lucrării: Elucidarea unor aspecte fiziologice privind semnificația enterococilor pentru sănătatea tubului digestiv și evidențierea potențialului probiotic al unor tulpini de enterococi.

Obiectivele cercetării: investigarea incidenței și nivelului cantitativ al enterococilor în tubul digestiv uman și animal în funcție de statutul fiziologic al organismului; studierea acțiunii factorului alimentar asupra conținutului enterococilor și evidențierea rolului acestora în menținerea echilibrului microbian intestinal benefic; izolarea, identificarea și selectarea celor mai avantajoase tulpini de enterococi intestinali cu potențial sanogen și elucidarea proprietăților probiotice ale acestora; prospecțiunea și testarea noilor compoziții microbiene elaborate pe bază de enterococi cu semnificație în menținerea dirijată a sănătății tubului digestiv și a organismului.

Noutatea și originalitatea științifică constă în evidențierea corelării nivelului cantitativ al enterococilor cu cel al bacteriilor benefice în condiții, când nu se atestă dezvoltarea disfuncțiilor intestinale, ceea ce denotă despre rolul enterococilor în menținerea echilibrului microbian intestinal sanogen, fapt demonstrat prin elucidarea modificărilor efectivului enterococilor din conținutul intestinal în funcție de statutul fiziologic al organismului și de acțiunea factorului alimentar. La inducerea drastică a proceselor patologice, enterococii își pierd acțiunea sanogenă și pot deveni agenți patogeni în coaliție cu alți patobionți. În baza corelării enterococilor cu bacteriile benefice microflorei intestinale se poate de dedus despre echilibrul microbian intestinal și starea sănătății tubului digestiv. A fost dovedit potențialul probiotic al unor tulpini de enterococi, care este identic sau mai avantajos în comparație cu potențialul probiotic recunoscut al unor bacterii obligative și testată eficacitatea compozițiilor noi microbiene enterococice în menținerea sănătății tubului digestiv și a organismului.

Rezultatele obținute care contribuie la soluționarea problemei științifice importante: A fost stabilită corelația benefică a enterococilor cu bacteriile obligative intestinale în menținerea unui mediu intestinal sanogen și reliefată posibilitatea modulării componenței microbiotei intestinale în aspect sanogen la administrarea rațiilor alimentare de diferită valoare nutritivă și structură calorică, ceea ce ar permite, prin acțiune prebiotică a macronutrienților din rații, de a fortifica capacitățile microflorei de a stopa dezvoltarea patogeniilor intestinale. A fost argumentată experimental posibilitatea includerii unor tulpini de enterococi în compoziții microbiene cu acțiune probiotică.

Semnificația teoretică constă în dezvoltarea cunoștințelor referitor la rolul enterococilor intestinali în sănătatea tractului gastrointestonal în funcție de mediul de trai, de statutul fiziologic al tubului digestiv și al organismului, de acțiunea factorului alimentar și de compatibilitatea lor cu alte bacterii comensale. A fost stabilit efectul sanogen al enterococilor, care se menține în cazurile când efectivul numeric al acestora nu depășește cel al bacteriilor benefice și se formează o corelație cu aceste bacterii, ce controlează dezvoltarea bacteriilor patogene.

Valoarea aplicativă a lucrării: A fost demonstrat potențialul probiotic al unor tulpini izolate de enterococi (tulpini pure) ce se exprimă mai benefic în asociație cu bifidobacteriile și lactobacteriile, recomandată utilizarea lor în calitate de probiotice și elaborate compoziții microbiene ce conțin tulpini testate de enterococi cu acțiune sanogenă.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele cercetării au fost aplicate în procesul de cercetare în cadrul Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova.

АННОТАЦИЯ

БОГДАН Виктория «Физиологическая роль кишечных энтерококков в поддержании здоровья пищеварительного тракта», диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Кишинев, 2024.

Структура диссертации: введение, 4 главы, выводы и рекомендации, список литературы из 360 наименований, 4 приложения, 172 страниц основного текста, 19 рисунков и 36 таблиц. Результаты изложены в 22 научных работах.

Ключевые слова: энтерококки, физиологическая роль, микробиота кишечника, здоровье, пищевые факторы, пробиотики.

Цель работы: выявление некоторых физиологических аспектов значения энтерококков для здоровья пищеварительного тракта и пробиотического потенциала отдельных штаммов энтерококков.

Задачи исследования: изучение наличия и количественного уровня кишечных энтерококков в пищеварительном тракте человека и животных в зависимости от физиологического состояния организма; изучение действия пищевых факторов на содержание кишечных энтерококков и выявление их роли в поддержании полезного микробного баланса кишечника; выделение, идентификация и селекция наиболее перспективных штаммов кишечных энтерококков, обладающих саногенным потенциалом, и изучение их пробиотических свойств; выявление и тестирование новых микробных композиций разработанных на основе энтерококков, обладающих наибольшей эффективностью для поддержания здоровья организма и пищеварительного тракта.

Научная новизна и оригинальность заключается в выявление корреляции численности энтерококков с уровнем полезных бактерий в условиях эубиоза, что свидетельствует о роли энтерококков в поддержании саногенного микробного баланса кишечника, доказанной количественными изменениями в содержимом кишечнике энтерококков в зависимости от физиологического состояния организма и действия пищевых факторов. При резкой индукции патологических процессов энтерококки теряют свое саногенное действие и могут стать возбудителями кишечных заболеваний в коалиции с другими патобионтами. На основании корреляции количества энтерококков с уровнем полезных кишечных бактерий, можно судить о микробном балансе кишечника и состоянии здоровья пищеварительного тракта. Доказан пробиотический потенциал некоторых штаммов энтерококков, по сравнению с признанными пробиотическими свойствами облигатных бактерий, и тестирована эффективность новых микробных композиций на основе энтерококков для поддержания здоровья пищеварительного тракта и всего организма.

Полученные результаты, способствующие решению важной научной задачи: Установлена благоприятная взаимосвязь энтерококков с облигатными кишечными бактериями в поддержании саногенной среды кишечника и подчеркнута возможность модуляции состава кишечной микробиоты в саногенном аспекте в условиях рационов питания с различной пищевой ценностью и структурой калорийности, что позволит за счет пребиотического действия макронутриентов, усилить возможности кишечной микрофлоры противостоять действию возбудителей кишечных заболеваний. Экспериментально обоснована возможность включения некоторых штаммов энтерококков в состав микробных композиций пробиотического действия.

Теоретическая значимость заключается в развитии знаний о роли кишечных энтерококков в здоровье желудочно-кишечного тракта по отношению: к среде обитания, физиологическому состоянию пищеварительного тракта и организма, действию пищевого фактора и их совместимости с другими комменсальными бактериями. Установлено саногенное действие энтерококков, которое сохраняется в тех случаях, когда их численность не превышает таковую полезных бактерий и в случае, когда их корреляция контролирует развитие болезнетворных бактерий.

Практическая ценность работы: продемонстрирован пробиотический потенциал некоторых штаммов энтерококков, которые более эффективно проявляют себя в ассоциации с бифидо- и лактобактериями и разработаны микробные композиции, на их основе, обладающие саногенным действием. **Внедрение научных результатов**: Результаты исследования используются в исследовательском процессе Института физиологии и санократологии Государственного университета Молдовы.

ANNOTATION

BOGDAN Victoria „The physiological role of intestinal enterococci in maintaining the health of the digestive tract", doctoral thesis (PhD) in biological sciences, Chișinău, 2024.

Dissertation structure: The dissertation consists of an introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, a bibliographic list of 360 titles, 4 annexes, 250 total and 172 pages of the main text, 19 figures and 36 tables. The results are presented in 22 published scientific papers.

Key words: enterococci, physiological role, intestinal microbiota, health, food factor, probiotics.

The aim of the study consists in elucidating some physiological aspects regarding the significance of enterococci for the health of the digestive tract and highlighting the probiotic potential of some strains of enterococci.

Research objectives: investigation of the incidence and quantitative level of intestinal enterococci in the human and animal digestive tract depending on the physiological status of the organism; studying the action of the food factor on the content of intestinal enterococci and highlighting their role in maintaining the beneficial intestinal microbial balance; the isolation, identification and selection of the most advantageous intestinal enterococci strains with sanogenic potential and the elucidation of their probiotic properties; prospecting and testing of new elaborated microbial compositions based on enterococci strains with significance in maintaining the digestive tract and the body health.

The scientific novelty and originality consist of revealing of the enterococci quantitative level correlation with that of the beneficial bacteria in conditions where the development of intestinal dysfunctions is not attested, which indicates of their role in maintaining the sanogenic intestinal microbial balance, demonstrated by the elucidation of the quantitative changes of enterococci in the intestinal contents depending on the physiological status of the body and the action of the food factor. Under conditions of severe pathological processes, enterococci may lose their health-promoting action and potentially become pathogens in association with other pathobionts. Based on the correlation of enterococci with the beneficial bacteria of intestinal microflora, it is possible to deduce about the intestinal microbial balance and the health state of digestive tract. The probiotic potential of certain strains of enterococci has been proven, which is identical or more advantageous compared to the recognized probiotic potential of some obligate bacteria, and the effectiveness of new enterococcal microbial compositions in maintaining the health of the digestive tract and the whole organism has been tested.

The obtained results that contribute to the solution of the important scientific problem: The beneficial correlation of enterococci with obligate intestinal bacteria in maintaining of a sanogenic intestinal environment was established and the possibility of modulating the composition of the intestinal microbiota in a sanogenic aspect when administering food rations with a different nutritional value and caloric structure was highlighted, which would allow, through the prebiotic action of the macronutrients in the rations, to strengthen the capacities of the intestinal microflora to stop the development of intestinal pathogens. The possibility of including some strains of enterococci in the composition of microbial preparations with probiotic action was experimentally argued.

The theoretical significance of the study consists in expanding of knowledge regarding the role of intestinal enterococci in gastrointestinal health depending on environmental conditions, the physiological status of the digestive tract and of the organism, dietary factors, and their compatibility with other commensal bacteria. It has been established that the health-promoting effect of enterococci is maintained under conditions where their numerical effectiveness does not exceed that of beneficial commensal bacteria, and its correlation controls the growth of pathogenic bacteria.

The practical value of the study. The probiotic potential of isolated enterococci strains (pure strains) that express more beneficially in association with bifidobacteria and lactobacteria has been demonstrated, their use as probiotics has been recommended, and microbial compositions containing tested strains of enterococci with sanogenic action have been developed.

Implementation of scientific results: The research results were applied in the research process within the Institute of Physiology and Sanocratology, Moldova State University.

LISTA ABREVIERILOR

BCAA – aminoacizi cu catenă ramificată

CEI – celulele epiteliale intestinale

E. coli – Escherichia coli

E. faecium – Enterococcus faecium

E. faecalis – Enterococcus faecalis

EFSA – European Food Safety Authority (Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară)

FAO – Food and Agriculture Oganization of United Nations (Organizația pentru Alimentație și Agricultură a Națiunilor Unite)

FDA – Food and Drug Administration of USA (Administrația pentru Alimente și Medicamente a SUA)

FOSHU – Food for Specified Health Uses (Statut de Alimente pentru uz specificat pentru sănătate)

GRAS – General Recognized-as-Safe (Statutul de General Recunoscut ca Sigur)

IAM – indice al adeziunii microorganismelor

IgA – Imunoglobulina A

IGC – Catalogul de gene al microbiomului intestinal uman

ISAPP – International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (Asociația Științifică Internațională a Probioticelor și Prebioticelor)

LAB – bacterii acidolactice

lg – logaritmi zecimali

LPS – lipopolizaharide

MAMP – modele moleculare asociate microbilor

MetaHIT – European Metagenomics of the Human Intestinal Tract (Metagenomica tractului intestinal uman în Europa)

NCBI – The National Center for Biotechnology Information (Centrul Național de Informații Biotehnologice)

OMS – Organizația Mondială a Sănătății

PAMP – modele moleculare asociate agenților patogeni

QPS – Qualified Presumption of Safety (Prezența calificată de siguranță)

SCFA – acizi grași cu lanț scurt

TGI – tractul gastrointestinal

UFC– unități formatoare de colonii

LISTA TABELELOR

Nr. crt.	Denumirea tabelului	Pag.
1.	Tabelul 2.1. Componența mediului nutritiv cu bilă-esculin și azid agar (Compania Himedia M4931).....	56
2.	Tabelul 2.2. Componența mediului nutritiv agar *Bifidobacterium* (Compania Himedia M1396).....	57
3.	Tabelul 2.3. Componența mediului nutritiv agar MRS (Compania Himedia M641)	58
4.	Tabelul 2.4. Componența mediului nutritiv agar Endo (Compania Himedia M029R)	58
5.	Tabelul 2.5. Raportul procentual al nutrienților de bază în rațiile alimentare de diferită valoare nutritivă.....	61
6.	Tabelul 2.6. Structura calorică a rațiilor elaborate (%) testate pe șobolani.....	62
7.	Tabelul 2.7. Structura calorică a rațiilor alimentare cu diversă structură calorică (%) testate *in vivo* pe cobai	63
8.	Tabelul 2.8. Schema experimentelor de testare a rațiilor alimentare în funcție de greutatea corporală a animalelor.....	64
9.	Tabelul 3.1. Genurile de microorganisme intestinale, izolate de la subiecți umani de diversă vârstă.....	73
10.	Tabelul 3.2. Indicii cantitativi ai enterococilor din conținutul intestinal al diferitor specii de animale.....	75
11.	Tabelul 3.3. Indicii cantitativi ai enterococilor intestinali la copiii mici (până la 360 de zile) în funcție de starea sănătății tubului digestiv.....	84
12.	Tabelul 3.4. Indicii cantitativi ai enterococilor la subiecții umani (copii și adulți) în dependență de starea sănătății tubului digestiv.....	86
13.	Tabelul 3.5. Indicii cantitativi ai enterococilor intestinali la diferite grupe de animale de interes economic în funcție de starea sănătății tubului digestiv.....	87
14.	Tabelul 3.6. Valoarea numerică a enterococilor inoculați *in vitro* separat și în comun cu noile rații elaborate în premieră.....	109
15.	Tabelul 3.7. Cantitatea de bacterii din genurile obligative și facultative ale tractului digestiv la cultivarea *in vitro* pe rațiile elaborate în premieră.....	110
16.	Tabelul 3.8. Structura calorică a rațiilor alimentare elaborate și testate *in vivo*, %.....	112
17.	Tabelul 3.9. Masa corporală a șobolanilor utilizați în testarea rațiilor alimentare elaborate în premieră	113
18.	Tabelul 3.10. Modificarea indicilor numerici ai enterococilor în conținutul intestinal al șobolanilor hrăniți cu rații cu diferită structură calorică.....	113
19.	Tabelul 3.11. Structura calorică a rațiilor alimentare cu diversă structură calorică (%) testate *in vivo* pe cobai.....	116
20.	Tabelul 3.12. Indicii numerici ai enterococilor în comparație cu bacteriile intestinale obligative și facultative la cobai, la administrarea rațiilor alimentare cu diversă structură calorică.....	117

21. Tabelul 3.13. Caracteristica cantitativă a componentelor de bază ale raţiilor alimentare administrate şobolanilor cu masă corporală diferită..... 131
22. Tabelul 4.1. Apartenenţa de gen a bacteriilor acidolactice din conţinutul intestinal de la subiecţii umani şi animale..... 138
23. Tabelul 4.2. Capacitatea adezivă a unor tulpini de enterococi, streptococi şi lactococi, izolate din tractul gastrointestinal al copiilor, viţeilor şi purceilor cu statul fiziologic sănătos al tubului digestiv..... 139
24. Tabelul 4.3. Activitatea antagonistă a tulpinilor de enterococi, streptococi şi lactococi, izolate din tractul gastrointestinal al copiilor şi animalelor agricole tinere, %..... 140
25. Tabelul 4.4. Distribuţia tulpinilor de enterococi şi lactococi după sursă..... 142
26. Tabelul 4.5. Capacitatea de adeziune a tulpinilor de bacterii acidolactice (enterococi şi lactococi) specifice tractului digestiv uman şi animal..... 144
27. Tabelul 4.6. Activitatea antagonistă a tulpinilor izolate de enterococi şi lactococi, specifice tractului digestiv uman şi animal..... 145
28. Tabelul 4.7. Indicii cantitativi ai unor bacterii ale microbiocenozei intestinale (la şoarecii albi) la administrarea diferitor preparate microbiene..... 148
29. Tabelul 4.8. Nivelul de compatibilitate a *E. faecium, S. thermophilus* şi *L. lactis* cu bifidobacteriile obligative tubului digestiv uman..... 152
30. Tabelul 4.9. Nivelul de compatibilitate a *E. faecium, S. thermophilus* şi *L. lactis* cu lactobacili obligativi tubului digestiv uman..... 154
31. Tabelul 4.10. Indicii cantitativi ai microorganismelor intestinale la cobai la administrarea asociaţiilor microbiene nou elaborate..... 156
32. Tabel 4.11. Masa corporală a viţeilor la naştere şi după 30 de zile de administrare a asociaţiilor de microorganisme testate..... 159
33. Tabelul 4.12. Nivelul cantitativ al enterococilor intestinali la viţei cu şi fără disfuncţii intestinale 159
34. Tabelul 4.13. Indicii rezistenţei generale la viţeii fără şi cu disfuncţii intestinale şi la acţiunea asociaţiei policomponente de microorganisme din genurile obligative tractului gastrointestinal..... 160
35. Tabelul 4.14. Masa corporală a purceilor din loturile experimentale..... 162
36. Tabelul 4.15. Indicii cantitativi ai enterococilor intestinali la purceii sugari supuşi administrării monotulpinilor şi asociaţiilor de microorganisme din genurile obligative tractului gastrointestinal..... 163

LISTA FIGURILOR

Nr. crt.	Denumirea figurii	Pag.
1.	Figura 2.1. Cultivarea enterococilor pe mediul nutritiv cu bilă-esculin și azid agar.....	54
2.	Figura 2.2. Obiectele biologice la care au fost investigată incidența enterococilor (original).....	54
3.	Figura 3.1 Nivelul cantitativ al enterococilor, bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli* în conținutul intestinal (masele fecale) la diverse animale.....	76
4.	Figura 3.2 Nivelul cantitativ al enterococilor, bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli* în conținutul intestinal la rațe în mediul rural, urban și grădina zoologică.....	78
5.	Figura 3.3. Nivelul cantitativ al enterococilor, bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli* în conținutul intestinal la porumbei în mediul rural și urban.....	79
6.	Figura 3.4. Cantitatea de enterococi la subiecții umani (copii) în primul an de viață (0-360 de zile).....	81
7.	Figura 3.5. Modificarea valorii numerice a enterococilor la subiecții umani de diferită vârstă (ani).....	82
8.	Figura 3.6. Cantitatea de celule bacteriene de enterococi (A), bifidobacterii (B), lactobacterii (C) și *E. coli* (D) la acțiunea în dinamică a rației cu exces de proteine.....	92
9.	Figura 3.7. Cantitatea de celule bacteriene de enterococi (A), bifidobacterii (B), lactobacterii (C) și *E. coli* (D) la acțiunea în dinamică a rației cu exces de lipide.....	95
10.	Figura 3.8. Cantitatea de celule bacteriene de enterococi (A), bifidobacterii (B), lactobacterii (C) și *E. coli* (D) la acțiunea în dinamică a rației cu exces de carbohidrați.....	98
11.	Figura 3.9. Modificarea indicilor numerici ai enterococilor în comparație cu alte bacterii intestinale la șobolani în funcție de administrarea rațiilor alimentare cu diversă structură calorică	114
12.	Figura 3.10. Corelarea indicilor numerici ai enterococilor cu cei ai bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli* în conținutul intestinal al cobailor la administrarea rațiilor alimentare cu diferită structură calorică.....	118
13.	Figura 3.11. Modificarea greutății corporale (g) a șobolanilor, după 3 zile de inaniție și respectiv după 3 și 6 zile de restabilire la alimentația normală.....	122
14.	Figura 3.12. Modificarea cantității de celule bacteriene ale enterococilor, bifidobacteriilor, lactobacililor și *E. coli* la șobolanii supuși inaniției.....	123
15.	Figura 3.13. Valorile masei corporale (g) a șobolanilor utilizați în studierea incidenței enterococilor intestinali.....	128

16. Figura 3.14. Cantitatea de celule microbiene de enterococi la șobolanii cu masă corporală mică (lotul I) și masa corporală mare (lotul II)..... 128
17. Figura 3.15. Corelarea valorii numerice a enterococilor cu bifidobacteriile, lactobacteriile și *E. coli* la șobolanii de laborator cu greutate corporală diferită..... 129
18. Figura 3.16. Cantitatea de celule microbiene de enterococi (la șobolanii cu masa corporală mai mică și mai mare la administrarea rațiilor cu diferit raport procentual al componentelor nutritive 131
19. Figura 4.1. Activitatea bactericidă a serului sanguin, % (A), nivelul de hemoglobina, g/dL (B) și conținutul eritrocitelor, $\times 10^{12}$/L (C) în serul sangvin al purceilor la influența monoculturii și asociațiilor de microorganisme din genurile obligatorii tractului gastrointestinal..... 166

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei abordate. Sănătatea tractului intestinal și funcționalitatea eficientă a acestuia sunt factori importanți, ce determină sănătatea întregului organism. Cercetările din ultimele decenii au reafirmat semnificația unică a microbiotei tractului gastrointestinal în fiziologia și sănătatea organismului. La începutul secolul XXI, ediția „SCIENCE" a pronosticat că „cercetarea microbului uman va deveni noul subiect fierbinte la nivel mondial" (Lederberg J., 2000). Conștientizând semnificația microbiotei intestinale pentru organismul-gazdă a fost lansat proiectul „US Human Microbiome Project (HMP)" (HMPC, 2012) și „European Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT)" (Qin J. et l., 2010), precum și alte studii, care au demonstrat funcțiile benefice ale florei normale intestinale asupra proceselor fiziologice și a sănătății până la nivel genetic (Jandhyala S.M. et al., 2015).

Investigațiile în domeniul microbiomului uman au arătat că organismul este colonizat de aproximativ 5000 de specii de microorganisme, ce aparțin la 2000 de genuri și 25 de filumuri, care posedă un total 316 milioane de gene, ceea ce constituie de 150 de ori mai multe gene comparativ cu cele ale genomului uman (Ley R. et al., 2006; Thomas A.M., Segata N., 2019). Actualmente, pe baza Catalogului de gene (IGC) al microbiomului intestinal uman și a bazei de date eggNOG au fost estimate cca 100 de trilioane de celule microbiene ce colonizează tubul digestiv al macroorganismului (Wang B. et al., 2017), iar acestea conțin cca 9 milioane de gene, 40% dintre care sunt necunoscute sau au o funcție nedefinită (Yang X. et al., 2009; Li J. et al., 2014; Krawczyk B. et al., 2021).

Tractul gastrointestinal (TGI) este preponderent colonizat de speciile de bacterii, ce aparțin filumului *Firmicutes* și *Bacteroidetes* și într-o măsură mai mică de bacteriile din *Proteobacteria* și *Actinobacteria* (Yang X. et al., 2009). Tipurile de microorganisme ce persistă în procesul colonizării tubului digestiv, precum și cantitatea lor se bazează pe căile prin care microorganismele oferă beneficii TGI, în funcție de care comunitatea bacteriană este divizată în comensală și mutuală. Relația reciprocă dintre microbiota intestinală și gazdă este influențată preponderent de dietă (factorul alimentar). Pe de o parte consumul diverșilor nutrienți afectează structura comunității microbiene și oferă substraturi pentru metabolismul microbian, iar pe de altă parte microbiota poate produce molecule mici care afectează multiple procese fiziologice, inclusiv și procesele metabolice (Albenberg L.G., Wu G.D., 2014). Astfel, factorul alimentar reprezintă unul din factorii determinați, ce influențează formarea unei microbiocenoze favorabile organismului-gazdă. Provocarea sistemului imunitar al gazdei este să accepte aceste bacterii comensale și să le utilizeze ca defensive față de agenții patogeni (Kim C.S., Claud E.C., 2019).

Enterococii sunt bacterii acidolactice ubicuitare atât în flora intestinală umană, cât și animală. Enterococii sunt cei mai abundenți coci Gram-pozitivi în materialul fecal de la subiecții umani, densitatea celulelor bacteriene atingând 10^5-10^8 UFC/g (Jett B.D. et al., 1994). Reprezentanții acestui gen constituie o componentă substanțială a mediului înconjurător, fiind prezenți în diverse nișe ecologice (sol, apă, canalizare, plante, animale), în mediul spitalicesc și în produsele alimentare, speciile predominante fiind *E. faecalis* și *E. faecium* (Pieniz S. et al., 2014).

Practic, toate studiile privind enterococii se referă la aspectul patogenității acestora, în special, pe determinanții genetici, care definesc potențialul lor patogen. Aceste studii sunt parte a programelor/proiectelor europene și mondiale, care cercetează infecțiile cauzate de rezistența la antiobiotice a tulpinilor de bacterii. Însă, sunt date care arată că tulpinile infecțioase și rezistente la antibiotice de enterococi, identificate în mediul spitalicesc, foarte rar prezintă un risc de infecție în afara instituțiilor medicale (Sanders M.E. et al., 2010).

Mai puține studii sunt axate pe rolul enterococilor în calitate de bacterii intestinale indigene la om și animale. Înțelegerea modului prin care enterococii se manifestă ca componentă comensală a microbiotei umane, în special a celei intestinale, precum și a căilor de expresie a patogenității acestora, ce duce la apariția diverselor infecții ar ajuta la elucidarea exactă a locului pe care îl ocupă aceste microorganisme în continuum-ul comensal-patogen.

Proprietatea de a produce bacteriocine, precum și versatilitatea de a supraviețui în diferite medii, inclusiv alimentele și TGI, determină ca enterococii să fie candidații potriviți pentru a îndeplini rolul de bioconservanți naturali, probiotice sau alternative antibioticelor. Bacteriocinele produse de enterococi, cunoscute și sub denumirea de enterocine, manifestă antagonism față de agenții patogeni Gram-pozitivi din alimente, cum ar fi bacteriile producătoare de amine biogene și bacteriile Gram-negative. În plus, unele enterocine au activitate antifungică și/sau antivirală. Sunt date care relevă că unele enterocine au activitate anticancerigenă (Wu Y. et al., 2002). Datorită acestor caracteristici, unele specii și tulpini de enterococi au demonstrat proprietăți de probiotice cu potențial benefic pentru sănătate (Hanchi H. et al., 2018; Krawczyk B. et al., 2021; Im E.J. et al., 2023). De asemenea, pe lângă enterocine enterococii pot produce o gamă largă de compuși antimicrobieni, cum ar fi acizii organici (acidul lactic, acidul acetic), peroxidul de hidrogen, care limitează contaminarea cu agenți patogeni și prelungesc perioada de valabilitate a produselor (Kasimin M.E. et al., 2022).

Pe de altă parte, utilizarea *Enterococcus* spp. în calitate de probiotice întâmpină numeroase obstacole, în special, din cauza patogenității acestora, capacității de a transfera orizontal factorii de virulență, precum și a cazurilor de infecții enterococice în continuă creștere

în ultimele decenii (Wang X. et al., 2020). Din aceste considerente, precum și a celor de siguranță, enterococii nu sunt nici recomandați pentru „Lista QPS" a EFSA (EFSA, 2024) și nici nu au statutul GRAS (Im E.J. et al., 2023), deși, progresele recente în epidemiologia moleculară, bazate pe metode avansate din biologia moleculară, au adus dovezi suplimentare că tulpinile nosocomiale enterococice sunt genotipic diferite de tulpinile comensale.

În acest context, focusarea studiilor pe comportamentul „neinfecțios" al enterococilor, ar permite de a elucida semnificația lor pentru sănătatea organismului-gazdă, în special, în prevenirea și tratarea infecțiilor intestinale. Aceste cercetări se încadrează în direcțiile științifice la nivel european și mondial privind rezistența la antibiotice și infecțiile asociate asistenței medicale.

La nivel național cercetările ce au vizat enterococii au fost realizate în cadrul Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie sub conducerea profesorului cercetător Maria Timoșco, care a demonstrat potențialul probiotic al unor tulpini de enterococi (Timoșco M. și al., 2010; 2011). De asemenea, cercetările privind rolul fiziologic al tractului digestiv și, respectiv, al microflorei intestinale și, nemijlocit, semnificația pe care o au bacteriile comensale, se încadrează în direcția de cercetare a Institutului – sanocreatologia, ce are ca scop elaborarea teoriei și practicii de formare și menținere dirijată a sănătății în conformitate cu modul de viață și factorii ecologici și de trai (Фурдуй Ф.И. и др. 2010; 2011 a, b; 2016).

Urmare a celor expuse, este imperativă cunoașterea particularităților ce delimitează proprietățile enterococilor în calitate de comensali și patogeni și evidențierea condițiilor (factorilor) ce determină aceste caracteristici.

Scopul cercetărilor a constat în elucidarea unor aspecte fiziologice privind semnificația enterococilor pentru sănătatea tubului digestiv și evidențierea potențialului probiotic al unor tulpini de enterococi.

În vederea realizării scopului stabilit au fost trasate **obiectivele cercetării**, care au fost axate pe:

- Investigarea incidenței și nivelului cantitativ al enterococilor în tubul digestiv uman și animal în funcție de statutul fiziologic al organismului;
- Studierea acțiunii factorului alimentar asupra conținutului enterococilor în comparație cu alte grupe de bacterii intestinale și evidențierea rolului acestora în menținerea echilibrului microbian intestinal benefic;
- Izolarea, identificarea și selectarea celor mai avantajoase tulpini de enterococi intestinali cu potențial sanogen și elucidarea proprietăților probiotice ale acestora;

- Prospecțiunea și testarea noilor compoziții microbiene elaborate pe bază de enterococi cu semnificație în menținerea dirijată a sănătății tubului digestiv și a organismului.

Ipoteza de cercetare: Enterococii, ca parte componentă a microflorei intestinale, care se stabilește în procesul colonizării tubului digestiv, contribuie în calitate de comensali la menținerea echilibrului microbian intestinal, iar tulpinile pure și sigure de enterococi pot fi utilizate în calitate de probiotice pentru restabilirea microflorei intestinale cu repercusiune asupra sănătății organismului.

Noutatea și originalitatea științifică constă în evidențierea corelării nivelului cantitativ al enterococilor cu cel al bacteriilor benefice în condiții, când nu se atestă dezvoltarea disfuncțiilor intestinale, ceea ce denotă despre rolul enterococilor în menținerea echilibrului microbian intestinal sanogen, fapt demonstrat prin elucidarea modificărilor efectivului enterococilor din conținutul intestinal în funcție de statutul fiziologic al organismului și de acțiunea factorului alimentar. La inducerea drastică a proceselor patologice, enterococii își pierd acțiunea sanogenă și pot deveni agenți patogeni în coaliție cu alți patobionți. În baza corelării enterococilor cu bacteriile benefice microflorei intestinale se poate de dedus despre echilibrul microbian intestinal și starea sănătății tubului digestiv.

A fost dovedit potențialul probiotic al unor tulpini de enterococi, care este identic sau mai avantajos în comparație cu potențialul probiotic recunoscut al unor bacterii obligative și testată eficacitatea compozițiilor noi microbiene enterococice în menținerea sănătății tubului digestiv și a organismului.

Rezultatele obținute de autor, care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante. Elucidarea rolului enterococilor intestinali la acțiunea factorilor ce determină statutul fiziologic al tubului digestiv și, respectiv al organismului, în special a factorului alimentar, exprimat prin structură procentuală diferită a macronutrienților de bază – proteine, lipide și carbohidrați, pe de o parte a relevat corelația benefică a enterococilor cu bacteriile obligative intestinale, ceea ce contribuie la menținerea unui mediu intestinal sanogen, iar pe de altă parte a reliefat posibilitatea modulării componenței microbiotei intestinale în aspect sanogen prin administrarea rațiilor alimentare de diferită valoare nutritivă și structură calorică, în calitate de prebiotice. Posibilitatea modificării și fortificării microflorei intestinale prin dietă, ar permite de a spori capacitățile acesteia de a stopa dezvoltarea patogeniilor intestinale, fără administrarea antibioticelor sau a altor preparate medicamentoase.

Determinarea proprietăților relevante de probiotice ale unor tulpini de enterococi, a gradului de compatibilitate a lor cu bacteriile obligative intestinale și a acțiunii lor asupra microflorei intestinale și a indicilor rezistenței naturale a organismului, argumentează includerea

tulpinilor enterococice testate în componența compozițiilor microbiene cu acțiune probiotică, fiind confirmată problema asigurării sanogenității intestinului la administrarea probioticelor.

Semnificația teoretică a lucrării constă în dezvoltarea cunoștințelor referitor la rolul enterococilor intestinali în sănătatea tractului gastrointestinal în funcție de mediul de trai, statutul fiziologic al tubului digestiv și al organismului, de acțiunea factorului alimentar și de compatibilitatea lor cu alte bacterii comensale. A fost stabilit că, efectul sanogen al enterococilor se menține în cazurile, când efectivul numeric al acestora nu depășește cel al bacteriilor comensale benefice și se formează o coaliție ce controlează dezvoltarea bacteriilor patogene.

Valoarea aplicativă. A fost demonstrat potențialul probiotic al unor tulpini izolate de enterococi (tulpini pure) ce se exprimă mai benefic în asociație cu bifidobacteriile și lactobacteriile, recomandată utilizarea lor în calitate de probiotice și elaborate compoziții microbiene experimentale ce conțin tulpini testate de enterococi cu acțiune sanogenă asupra tubului digestiv.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele cercetării au fost aplicate în procesul de cercetare în cadrul Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova. Utilizarea compozițiilor microbiene noi elaborate în baza tulpinilor testate de enterococi a fost stopată la etapa de mostră experimentală și de brevetare din considerentele verificării suplimentare a aspectelor de siguranță a tulpinilor bacteriene.

Sinteza metodologiei și justificarea metodelor de cercetare alese.

În realizarea scopului, obiectivelor înaintate și pentru demonstrarea ipotezei de cercetare au fost utilizate:

- metode microbiologice clasice de cultivare a tulpinilor de enterococi și a altor grupe de bacterii, studiate comparat;
- metode de evaluare a viabilității și de cuantificare a tulpinilor (speciilor) cultivate de bacterii;
- metode de determinare a caracteristicilor de probiotice a tulpinilor selectate de enterococi;
- metode de prelucrare statistică a rezultatelor.

Au fost aplicate scheme și principii de montare a experimentelor științifice. Experimentele pe animale au fost realizate în conformitate cu Directiva 86/609/CEE din 24 noiembrie 1986 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și au fost aprobate de Comisa metodică a Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova.

Aprobarea rezultatelor. Materialele tezei au fost prezentate și discutate la Conferința științifică internațională privind biotehnologia microbiană (Chișinău, 2016); Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare" (Chișinău, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022); Conferința națională cu participare internațională „Științele vieții în dialogul generațiilor: conexiuni între universități, mediul academic și comunitatea de afaceri" (Chișinău, 2019, 2022); Conferința științifică a doctoranzilor (cu participare internațională) „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători" (Chișinău, 2018, 2019, 2020); Conferința științifică internațională „Sănătatea, medicina și bioetica în societatea contemporană: studii inter- și pluridisciplinare" (Chișinău, 2021); Simpozionul științific național cu participare internațională „Biotehnologii moderne – soluții pentru provocările lumii contemporane" (Chișinău, 2021); Conferința științifică națională a doctoranzilor dedicată aniversării a 75-a a USM „Metodologii contemporane de cercetare și evaluare" (Chișinău, 2021); Conferința științifică internațională „The Museum and Scientific Research" (Craiova, 2021, 2022, 2023); Conferința științifică internațională „Agriculture for Life, Life for Agriculture" (București, 2021, 2022).

Rezultatele obținute pe parcursul programului de doctorat au fost discutate și aprobate de Consiliul științific al Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie (2017-2021).

Sumarul capitolelor tezei. Teza constă din introducere, 4 capitole, bibliografie și anexe. Primul capitol prezintă trecerea în revistă a realizărilor științifice din domeniu de cercetare, următoarele capitole reflectă abordarea metodologică și descrierea rezultatelor cercetărilor obținute.

Capitolul 1 „SEMNIFICAȚIA MICROBIOTEI INTESTINALE ÎN FUNCȚIONALITATEA ȘI SĂNĂTATEA ORGANISMULUI. ROLUL FIZIOLOGIC ȘI POTENȚIALUL PROBIOTIC AL ENTEROCOCILOR" se axează pe analiza literaturii de specialitate privind semnificația microbiotei intestinale, inclusiv a enterococilor, în funcționarea normală și sănătatea organismului-gazdă. Este evidențiat faptul că în procesul colonizării tubului digestiv în diferite segmente ale acestuia se constituie nișe bacterio-ecologice, bazate pe compatibilitatea dintre bacterii și mecanisme sofisticate de comunicare dintre microfloră și organismul-gazdă, care, drept urmare, determină statutul fiziologic sanogen al organismului. Este evidențiat rolul fiziologic al enterococilor și sunt aduse argumente referitor la faptul că tulpinile comensale diferă de cele nosocomiale. Datorită faptului că enterococii reprezintă o parte a microbiotei indigene la om și animale, aceștia participă în modularea sistemului imun și controlul efectivului numeric al bacteriilor patogene, în special, datorită producerii enterocinelor. Sunt descrise date privind utilizarea unor tulpini de enterococi în calitate de probiotice și

discutate aspectele privind siguranța lor, precum și prevederile normative ce reglementează aplicarea probioticelor pe bază de enterococi pe scară largă.

În **capitolul 2** „MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE” este descris obiectul principal al cercetării – enterococii, precum și obiectele biologice de la care au fost prelevate mostre pentru analiza microbiologică.

Sunt prezentate metodele clasice microbiologice ce au fost aplicate pentru evidențierea și cuantificarea enterococilor și a altor bacterii intestinale din conținutul intestinal (masele fecale) cu respectarea regulilor pentru examenele microbiologice, conform SM SR ISO 7218 și a principiului de utilizare a microorganismelor cu potențial biologic natural nepatogen (nemodificate genetic).

În capitol sunt expuse schemele experimentelor pe diverse animale (de laborator și agricole) ce au permis de a elucida modificările bacteriocenozei intestinale în funcție de acțiunea factorului alimentar și de a releva beneficiile tulpinilor izolate de enterococi în calitate de probiotice. Efectele enterococilor în calitate de probiotice au fost identificate în rezultatul testării compozițiilor bazate pe diferite asociații bacteriene asupra unor indici fiziologici la animale de laborator și agricole.

Capitolul 3 „INCIDENȚA, NIVELUL CANTITATIV ȘI ROLUL FIZIOLOGIC AL ENTEROCOCILOR ÎN TUBUL DIGESTIV UMAN ȘI ANIMAL” include rezultatele cercetărilor privind incidența enterococilor la diferite specii de animale și la om, precum și în dependență de statutul fiziologic al organismului-gazdă: de vârstă, de mediul de trai, de starea de sănătate a tubului digestiv și la acțiunea factorului alimentar.

A fost studiată cota-parte a enterococilor din grupa bacteriilor acidolactice – *Enterococcus, Lactococcus* și *Streptococcus* la subiecți umani. Rezultatele privind incidența enterococilor (valoarea numerică a enterococilor) la subiecții umani sănătoși în funcție de vârstă, au relevat tendința de majorare a indicilor numerici ai acestor bacterii odată cu înaintarea în vârstă. A fost elucidat modul prin care mediul de trai și starea de sănătate a tubului digestiv influențează nivelul cantitativ al enterococilor, fiind stabilite diferențe în funcție de specie, de vârstă și de gradul disfuncției intestinale.

În compartiment aparte este elucidată acțiunea factorului alimentar asupra nivelului cantitativ al enterococilor, și anume, a rațiilor cu o cotă mai mare de anumiți nutrienți alimentari – proteine, lipide și carbohidrați, ce determină valoarea nutritivă a lor, precum și a rațiilor cu diferită structură calorică, ce prezintă interes în aspect fiziologic în vederea modulării microbiotei intestinale și, respectiv, a funcțiilor acesteia în direcția fortificării sănătății organismului. A fost arătat că rațiile alimentare cu o valoarea nutritivă și calorică diferită

manifestă acțiune diferențiată asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali, fiind remarcată sensibilitatea enterococilor și a celorlalte bacterii intestinale la o anumită componență și coraport al substanțelor nutritive din rația alimentară.

În **capitolul 4** „PROSPECȚIUNEA NOILOR TULPINI DE ENTEROCOCI ÎN CALITATE DE PROBIOTICE" au fost cercetate tulpinile de enterococi și alte bacterii coliforme (streptococi și lactococi) izolate de la animale și subiecți umani (copii) sănătoși în scopul identificării culturilor benefice. Sunt descrise datele experimentelor efectuate *in vitro,* ce reflectă activitatea antagonistă manifestată față de bacteriile patogene și proprietatea de adeziune a tulpinilor izolate de enterococi, caracteristici care sunt investigate în scopul evidențierii potențialului probiotic al microorganismelor. În același context, precum și din considerentele semnificației duale ale enterococilor – ca comensali și ca agenți patogeni nosocomiali în capitol sunt expuse rezultatele obținute privind compatibilitatea enterococilor cu alți reprezentanți ai microflorei intestinale – bifidobacterii și lactobacterii. Sunt descrise rezultatele investigațiilor *in vivo* pe animale de laborator, care au avut drept scop studierea acțiunii compozițiilor microbiene experimentale cu potențial probiotic (elaborarea cărora s-a bazat pe asocierea dintre microorganismele din genul *Enterococcus* și cele din genurile *Bifidobacterium* și *Lactobacillus*), comparativ cu alte preparate microbiene, pe baza modificării indicilor cantitativi ai unor reprezentanți microbieni intestinali, precum și rezultatele testării monoculturilor și asociațiilor microbiene pe bază de enterococi la animalele de interes economic (viței și purcei), în baza modificărilor parametrilor funcționali, fiind determinat și efectul acestora asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali. În baza datelor obținute este argumentat potențialul probiotic al unor tulpini de enterococi și aduse dovezi ce justifică utilizarea tulpinilor microbiene ca alternative remediilor antimicrobiene (antibiotice).

În **„CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI"** este expusă esența lucrării, care este formulată concis în concluziile generale, fiind reflectate structurat rezultatele obținute cu evidențierea contribuțiilor proprii ale autorului. Sunt relatate recomandările și abordate sugestii privind potențialele direcții de cercetare legate de tema tezei de doctorat.

BIBLIOGRAFIA include 360 de surse care au fost citate în teză.

ANEXELE conțin materiale relevante pentru lucrare, care complimentează informația din capitolele 3 și 4 ale tezei.

1. SEMNIFICAȚIA MICROBIOTEI INTESTINALE ÎN FUNCȚIONALITATEA ȘI SĂNĂTATEA ORGANISMULUI. ROLUL FIZIOLOGIC ȘI POTENȚIALUL PROBIOTIC AL ENTEROCOCILOR

Studiile recente privind microbiota organismului uman sau animal, în special al tubului digestiv, sunt concentrate pe semnificația acesteia pentru sănătatea organismului-gazdă. Interacționând cu gazda, microorganismele influențează răspunsurile fiziologice ale gazdei: motilitatea gastrointestinală, metabolismul, digestia, secreția și senzația, nutriția și funcția imunitară. Specialiștii în domeniu consideră microbiota intestinală drept „organul" metabolic ascuns, datorită impactului imens al acesteia asupra activității vitale (Baquero F., Nombela C., 2012). Aceasta înseamnă că orice modificare a componenței stabilite a microbiotei poate influența dramatic starea de sănătate a organismului. Pe de altă parte, factorii externi, precum alimentația și modul de viață a gazdei influențează starea microbiotei intestinale, iar aceasta din urmă se răsfrânge din nou asupra sănătății și bunăstării organismului.

Rezultatele obținute în ultimele două decenii sugerează că microbiota intestinală poate contribui la sănătatea gazdei umane și, atunci când este aberantă, la patogeneza diferitor tulburări metabolice comune, inclusiv, și a patogeniilor cardiologice și nervoase (Belkaid Y, Hand T.W., 2014; Cianci R et al., 2018). Cel mai frecvent, perturbarea microbiotei intestinale este asociată cu afecțiunile gastrointestinale, cum ar fi boala inflamatorie intestinală, inclusiv colita ulcerativă și boala Crohn (Frank D. et al., 2007), obezitatea și malnutriția (Kau A. et al., 2011).

Microflora intestinală în calitate de componentă indispensabilă a tubului digestiv este, în mod normal, reprezentată de totalitatea microorganismelor (bacteria, archaea, eucariotele unicelulare, precum fungile și protozoarele etc.), care prin activitatea sa produc diverse substanțe/molecule, necesare pentru activitatea normală a organismului omului și animalelor (Rowan-Nash A.D. et al., 2019).

Bacteriile microflorei intestinale sunt divizate în patru filumuri (încrengături): *Firmicutes, Bacteroidetes* (acestea fiind principalele încrengături), *Actinobacteria* și *Proteobacteria*. În total se numără circa 50 de genuri și câteva sute de specii (de la 300 până la 1000) (Finegold S.M. et al. 1974, 1983, Jandhyala S. et al., 2015). Majoritatea dintre acestea se atribuie la genurile: *Bacteroides, Clostridium, Faecalibacterium, Eubacterium, Ruminococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus* și *Bifidobacterium*, iar o mică parte la genurile *Escherichia* și *Lactobacillus*. Se consideră că genurile bacteriene dominante numeric au o importanță majoră în funcționarea organismului-gazdă, de exemplu genul *Bacteroides,* care constituie cca 30% din totalul bacteriilor din intestin (Khanna S., Tosh P., 2014).

În general, microbiomul uman este format dintr-un microbiom de bază și un microbiom variabil. Microbiomul de bază este comun tuturor indivizilor, în timp ce microbiomul variabil este unic pentru fiecare individ, în funcție de stilul de viață și de diferențele fiziologice. Microbiomul de bază este format din speciile predominante care există în diferite părți ale organismului sănătos și are denumirile de: microflora principală, autohtonă, indigenă sau rezidentă. Microbiomul variabil a evoluat ca răspuns la stilul de viață unic și la factorii determinanți genotipici și este exclusiv individual. La acest tip de microbiom se referă speciile suplimentare (numite facultative), precum și tranzitorii (specii de ocazie sau flora microbiană alohtonă, reziduală) (Sharon I. et al., 2022). Se mai afirmă că flora microbiană principală este atribuită la genurile *Bifidobacterium*, *Lactobacillus, Propionobacterium*, *Escherichia*, *Peptostreptococcus* și *Enterococcus*, iar cea facultativă și tranzitorie – la *Bacteroies*, *Peptococcus, Staphilococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* (bacterii aerobe sporulente și anaerobe ale genului Clostridium) (Švec P., Franz C., 2014).

În funcție de particularitățile de specie, precum și a celor vitale, reprezentanții microbieni ce colonizează tractul gastrointestinal al oamenilor sănătoși sunt subdivizați în:

- microflora obligată, reprezentată preponderent de bifidobacterii, lactobacili, escherichii, enterococi ș.a.;
- microflora facultativă, inclusiv microorganisme condiționat patogene (stafilococi, streptococi, helicobacterii, candide etc.);
- microflora tranzitorie sau accidentală (micrococci, corynebacterii, bacili, (bacteroizi etc.) care nimeresc în organism din mediul ambiant cu alimente și apă.

Reprezentanții obligatori ai florei microbiene normale reprezintă circa 80% din microbiota generală, microflora facultativă – mai puțin de 9,5% și cea tranzitorie – până la 0,5%. Diferă și raportul dintre reprezentanții anaerobi și aerobi, care poate fi de 1000: 1 (Nagpal R. et al., 2017; Фурдуй Ф.И. и др., 2014).

1.1. Funcțiile fiziologice ale microbiotei intestinale

Funcțiile florei bacteriene sunt multiple, iar semnificația acesteia este dovedită de noi studii, ce demonstrează legătura strânsă dintre bacterii și statutul fiziologic al organismului-gazdă. A fost dovedit rolul microbiotei intestinale în reglarea homeostaziei, în metabolism, absorbția nutrienților vitali și sinteza vitaminelor, în formarea imunității, în formarea barierei mecanice, ce protejează organismul de agenți nocivi. În general microflora intestinală are multiple roluri fiziologice cu rezonanță asupra întregului organism (Andoh A., 2016). Este deja dovedit rolul excepțional al bacteriocenozei intestinale în maturarea sistemului imun, fiind

descrise mecanismele de inducție și de asigurare a funcționării sistemului imun al organismului-gazdă de către microorganismele intestinale (Belkaid Y., Hand T.W., 2014; Cianci R. et al., 2018; Zheng D. et al., 2020).

Există date privind influența microorganismelor, în special, a microorganismelor intestinale asupra metabolismului organismului-gazdă. Microbiota are enzime care nu sunt codificate în genomul uman, dar care sunt necesare pentru îndeplinirea unor sarcini fiziologice sau pentru a completa acțiunea enzimelor digestive în procesele de descompunere a substanțelor (polizaharide, polifenoli) și de sinteză a vitaminelor. Potrivit acestui fapt, ele pot regla echilibrul energetic al organismului și metabolismul celular (Baghbani, T. et al., 2020). Microbiota intestinală are un rol esențial în solubilizarea resturilor alimentare nedigerate și neabsorbite și eliminarea lor din organism, precum și în protecția față de diverși patogeni prin neutralizarea compușilor toxici (Sekirov I. et al., 2010; Kevans D. et al., 2015). Bacteriile intestinale sunt o componentă crucială a circulației enterohepatice, care la rândul ei poate influența metabolizarea multor medicamente, inclusiv a antibioticelor (Gorbach S.L., 1996). Recent s-a dovedit că prin reglarea nivelului și compoziției de autoanticorpi ce au legătură cu hormonii reglatori ai apetitului, microbiota controlează aspecte ale comportamentului legat de apetit și cu fiziopatologia tulburărilor alimentare (Lam Y.Y. et al., 2017).

Pe de altă parte, semnificația bacteriocenozei intestinale constă în producerea de substanțe (compuși) care la rândul său au un efect pozitiv sau negativ nu numai asupra sistemului digestiv, dar și a întregului organism. (Gibson G.R., Roberfroid M.B., 1995). Se cunoaște aportul microbiotei în producerea de diferite substanțe, aminoacizi esențiali, vitamine, în special a vitaminelor grupei B necesare pentru buna funcționare a organismului gazdei. De asemenea, a fost elucidat rolul acesteia în producția unor substanțe precum dopamină, serotonină sau alți neurotransmițători, dovedind posibilitatea microflorei de a acționa și la distanță. (Mangiola F., 2016; Swanson H.I., 2015). A fost stabilit rolul microbilor de protejare sau de barieră biologică în tubul digestiv, prin producerea de acizi grași cu lanț scurt (SCFA) și stimularea regenerării epiteliale. (Belkaid Y., Hand T.W., 2014; Cianci R., 2018). S-a raportat că metaboliții extracelulari precum SCFA, excretați de microbiota intestinală joacă un rol important în reglarea homeostaziei intestinale. În afară de furnizarea de energie, SCFA provoacă, de asemenea, stimularea imună la celulele animale și umane (Nakkarach A. et al., 2021).

În baza celor relatate se poate afirma că microbiomele îndeplinesc un rol important în prevenirea dezvoltării unor maladii funcționale ale tubului digestiv. Sunt date ce argumentează că rolul acestora se manifestă și în maladiile cardiace, astme și boli sclerotice generale, precum și neurologice, cum ar fi autismul (Novakovic M. et al., 2020; Chunxi L. et al., 2020; Tiwari P. et

al., 2023). Recent a fost dovedit impactul microbiotei intestinale asupra neurodezvoltării și diverselor procese fiziologice prin axa microbiotă-intestin-creier. Studiile acumulate au identificat rolul acestei axe (microbiota-intestin-creier) în tulburările de neurodezvoltare, inclusiv, tulburarea spectrului autist, tulburarea de hiperactivitate cu deficit de atenție și sindromul Rett (Wang Q. et al., 2023). Mecanismele prin care bacteriile intestinale comunică cu creierul includ: secreția de neurotransmițători, neuromodulatori și citokine proinflamatorii; angajarea sistemului nervos enteric și a nervului vag și producerea de metaboliți neuroactivi și SCFA (Kim G.H., Shim J.O., 2023).

La general, principalele funcții ale microbiotei intestinale sunt:

- metabolică și energetică;
- de metabolizare a xenobioticilor și medicamentelor;
- protectoare, antimicrobiană și antivirală;
- imunomodulatorie;
- structurală, de asigurare a integrității barierei intestinale și funcționalității tractului grastrointestinal;
- plastică, de biosinteză a substanțelor biologic active, vitaminelor, aminoacizilor, lipidelor etc.;
- de reglare a proceselor neurologice și de comportament;
- de reglare a perestaltismului intestinal și a conținutului de gaze în cavități etc.

De facto, întregul potențial metabolic al florei microbiene intestinale este localizat în intestinul gros și tocmai aceasta determină semnificația ei funcțională pentru organismul-gazdă. Astfel, funcțiile enumerate ale tubului digestiv, de obicei, le manifestă preponderent reprezentanții florei microbiene din acest segment (Lin L., Zhang J., 2017; Rowland I. et al., 2018; Vijay A., Valdes A.M., 2022; Ruigrok R. et al., 2023).

1.2. Semnificația fiziologică a corelației dintre microfloră și macroorgansim în procesul colonizării

Microbiomul intestinal reprezintă o comunitate microbiană, relativ stabilă, în funcție de vârstă, este compus din diferite specii de microorganisme, ce se adaptează la anumite condiții ale tubului digestiv, fiind mai mult modelată de factorii de mediu, decât de genetica gazdei (McBurney M.I. et al., 2019). Compoziția microbiotei intestinale în segmentele tubului digestiv este determinată de procesele stocastice, care în general determină tendințele de formare a ecosistemelor – populațiilor de organisme (inclusiv microorganisme), precum și de interacțiunile deterministe dintre specii, indivizi și mediu. Ca rezultat se creează nișe specifice (prielnice) de

existență pentru anumite grupe de microorganisme. Mai bine zis, condițiile din nișă, și anume factorii de mediu, cum ar fi compoziția nutrienților disponibili, pH-ul, prezența sau lipsa oxigenului modulează numărul și diversitatea microorganismelor din aceste nișe.

Cunoașterea particularităților de colonizare a tubului digestiv de către microbi și de formare a ecosistemelor de microorganisme intestinale ar permite de a analiza mai amplu și de a explica modificarea microbiotei intestinale în funcție de statutul fiziologic al organismului și acțiunea factorilor de mediu, precum și de a elucida mecanismele ce declanșează patogeniile.

Cert este că comunitatea de bacterii ale tubului digestiv a coevoluat odată cu specia (fie umană sau animală), dezvoltând pe tot acest parcurs mecanisme de coexistență benefică pentru participanții la simbioză (comensalism). Această coevoluție a microorganismelor și organismului-gazdă dictează sau, mai bine zis, orientează la ce etapă a dezvoltării postnatale are loc colonizarea tubului cu anumiți reprezentanți bacterieni. Colonizarea bacteriană inițială corectă are o importanță majoră ulterioară în dezvoltarea organismului și asigură baza sănătății (Walker A., 2014). Succesiunile de microorganisme în cavitățile interne ale organismului-gazdă pe parcursul creșterii și dezvoltării poate fi asociată cu principiile ecologiei într-un ecosistem terestru. Orice schimbare sau perturbare a ecosistemului determină fluctuația și succesiunea speciilor adaptate la habitatele acestuia.

Evident că menținerea integrității microbiomului este crucială pentru sănătatea organismului gazdei. De menționat, că microbiota intestinală se schimbă de-a lungul vieții, iar procesul prin care microbiota se modifică în timp este cunoscut ca „succesiune fiziologică” (Khaledi M. et al., 2024). Acest proces de stabilizare și modificare a microflorei intestinale se extinde rapid de la naștere (expoziție primară), după care, fiind destul de dinamic, trece print trei etape: de tranziție (aproximativ la vârsta de trei), de stabilizare (vârsta adultă) și de regresie (la persoanele vârstnice) (Ling Z. et al., 2022; Khaledi M. et al., 2024).

Cercetările curente în domeniul microbiomului uman și animal încearcă, prin înțelegerea modului în care microbiocenoza suferă anumite schimbări pe parcursul vieții organismului, să ofere o perspectivă asupra rolului acesteia în asigurarea sănătății și dezvoltarea patologiilor.

Formarea microbiomului intestinal imediat după naștere începe cu stabilirea unor specii pionier care transformă habitatul intestinal și permit fixarea speciilor de prima succesiune. Identitatea speciilor pionier în intestin și a celor din prima succesiune este influențată de astfel de factori precum: factori materni (de exemplu, greutatea corporală și stresul), modul de naștere și nutriție imediat după naștere. Structura temporală a acestor factori de mediu contribuie la identitatea și dinamica microbiomului intestinal al sugarului și joacă un rol în antrenamentul sistemului imunitar (Laforest-Lapointe I. et al., 2017).

Speciile pionier de microorganisme, care încep colonizarea la naștere sau la scurt timp după naștere sunt bacterii aerobe facultative, precum *Firmicutes* (*Enterococcus, Staphylococcus, Streptococcus*) și *Proteobacteria* (*Enterobacter, Escherichia coli*) (Palmer C. et al., 2007; Del Chierico F. et al., 2015), care stabilesc mediul anaerob prielnic pentru dezvoltarea ulterioară a bacteriilor anaerobe (obligatorii) dominante în intestin, cum ar fi *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*), *Bacteroidetes* (*Bacteroides*) și *Firmicutes* (*Clostridium, Lactobacillus, Ruminococcus*) (Mackie R.I. et al., 1999). Aici trebuie de menționat că multe surse bacteriene pentru sugar derivă din microbiota maternă. Prin urmare, colonizarea benefică a sugarului depinde de genetica mamei, de expunerea la mediu și de dieta în timpul sarcinii, precum și în timpul alăptării.

Este evident că colonizarea inițială corectă a tubului digestiv imediat după naștere reprezintă un moment crucial pentru dezvoltarea tractului gastrointestinal și a sistemului imunitar, și formează pattern-ul microbiomului organismului adult (Walker A., 2014; Pantazi A. et al., 2023).

Modul de naștere este un factor important ce influențează microbiota gastrointestinală a nou-născutului. Astfel, la copiii născuți natural, în comparație cu cei născuți prin cezariană, flora bacteriană intestinală prezintă o diversitate mai mare (Akagawa S. et al., 2019), are mai puțini stafilococi (Wampach L. et al., 2018) și este dominată de *Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria* și *Proteobacteria* (Kuang Y.S. et al., 2016; Wampach L. et al., 2018; Shao Y. et al., 2019; Zhong H. et al., 2019). Majoritatea acestor bacterii produc SCFA, care scad pH-ul luminal și, prin urmare, inhibă colonizarea agenților patogeni (Nagpal R., Yamashiro Y., 2018).

Colonizarea cu succes a tubului digestiv depinde de nutriție și influența factorilor mediului de creștere a copilului. Laptele matern poate fi considerat ca probiotic și prebiotic, care modelează microbiomul intestinal. Sugarii alăptați exclusiv cu lapte matern au o diversitate generală mai mare a microbiomului, în special, o proporție mai mare de filum *Bacteroidetes* și o proporție mai mică de filum *Firmicutes*. Cercetarea microbiomului se concentrează adesea pe raporturile dintre aceste două grupuri mari de bacterii, întrucât anume dereglarea echilibrului acestor grupe de bacterii reprezintă cauza declanșării patologiilor. Aceste diferențe microbiene provoacă modificări ale expresiei genelor în organismul-gazdă și creează mediul prielnic pentru colonizarea ulterioară a tubului digestiv (Thongaram T. et al., 2017; Li N. et al., 2020).

Odată cu creșterea copilului, dezvoltarea microbiotei urmează schimbări tipice, care depind, în mare măsură, de mediul în care se află și se dezvoltă organismul (Eckburg P.B. et al., 2005; Ley R. et al., 2006; Turnbaugh T. et al., 2009). Ce tipuri de microorganisme persistă și în

ce cantitate se bazează pe căile, prin care microorganismele extrag energie și oferă beneficii comensale TGI? Provocarea gazdei, mai bine zis a sistemului imunitar al acesteia, este să accepte aceste bacterii comensale și să se apere împotriva agenților patogeni. Până la sfârșitul primului an de viață sugarii posedă un profil microbian distinct individual, convergând către microbiota caracteristică unui adult. S-a presupus că mai degrabă întreruperea alăptării, decât introducerea alimentelor solide, conduce la principalele schimbări de compoziție care au ca rezultat formarea unui microbiom intestinal „asemănător unui adult". În acest aspect, introducerea alimentelor solide constituie ultimul pas în evenimentele timpurii de succesiune a microbiomului, ceea ce duce la consolidarea unei comunități microbiene intestinale care rămâne, în mare parte, stabilă pentru restul copilăriei și vieții adulte și la creșterea diversității și îmbogățirea cu *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Ruminococcus* spp., *Faecalibacterium* spp., *Roseburia* spp. și *Anaerostipes* spp., precum și la reducerea *Bifidobacterium* spp. și *Enterobacteriaceae* (Homann C.M. et al., 2021).

Se consideră că componența microbiotică se stabilizează după aproximativ 3 ani de viață și se aseamănă cu microbiota organismului adultului în ceea ce privește diversitatea și complexitatea, cu abundență mare de specii din filumurile *Firmicutes* și *Bacteroidetes* (Arumugam M. et al., 2011 Yatsunenko T. et al., 2012). Astfel, primii 3 ani de viață reprezintă perioada cea mai critică în aspectul influenței nutriției asupra creșterii și dezvoltării. Aceasta este perioada în care microbiota intestinală are un rol vital extrem de important pentru sănătate și neurodezvoltare, iar toate modificările de destabilizare a acesteia în această perioadă pot ulterior afecta substanțial sănătatea și dezvoltarea organismului. În mare parte, dezvoltarea microbiotei intestinale în aspectul compoziției și funcției se realizează până la vârsta de 3 ani. Totuși, unele studii realizate pe perioade mai mari de timp (adică pe subiecți cu vârsta mai mare de 3 ani), au stabilit o durata mai mare până la maturitate completă a microbiotei, în special, pentru unii reprezentanți ai acesteia. Sunt date care relevă că o diversitate microbiană intestinală la nivel de adult ar putea să nu fie atinsă nici măcar la vârsta de 5 ani (Ringel-Kulka T. et al., 2013; Derrien M. et al., 2019). Chiar și la o vârstă mai mare de 7-12 ani microbiota intestinală a copiilor sănătoși continuă să prezinte diferențe funcționale și taxonomice în comparație cu cea a adulților, sugerând că microbiomul intestinal se poate dezvolta mai lent decât se credea anterior (Hollister E.B. Et al., 2015).

Astfel, a fost dovedit că o etapă importantă în formarea microflorei intestinale stabile, asemănătoare după compoziție cu a adultului reprezintă încetarea alăptării și trecerea la mâncarea solidă. În anii copilăriei crește diversitatea la fel ca și stabilitatea microbiotei intestinale. Până la adolescență, microbiomul intestinal nu seamănă încă cu cel al unui adult, dar

denotă o schimbare către o scădere generală a numărului de aerobi și anaerobi facultativi, precum și o creștere a speciilor de anaerobi.

La copii și adulți, factorii de mediu și cei fiziologici sunt principalii declanșatori ai schimbărilor compoziției și funcționalității microflorei intestinale. În acest aspect, mediul și stilul de viață, membrii familiei și rudele apropiate au fost, de asemenea, descriși ca factori ambientali care influențează colonizarea intestinală de către microorganisme a tubului digestiv. Locația geografică are, de asemenea, un impact asupra microbiotei, deoarece diferențele de microbiotă sunt legate de tiparele alimentare și stilul de viață dintr-o anumită zonă (oraș, țară, religie etc.). Mai mult, s-a stabilit că modelele comune de dezvoltare a microbiomului intestinal au fost identificate în primul an de viață la toate populațiile, iar bifidobacteriile a fost grupul cel mai răspândit, dominând microbiota sugarului din toate cele trei grupuri în această perioadă (Ley R.E., 2006)

A fost demonstrat că statutul fiziologic al organismului-gazdă, de asemenea, influențează microbiota intestinală. În special, s-a dovedit că obezitatea este asociată cu o microflora intestinală alterată și induce modificări în compoziția acesteia, în particular, influențează negativ efectivul numeric al *Bacteroidetes*, care este unul dintre cele mai abundente filumuri din intestin (Ley R.E., 2006).

În acest aspect, prezintă interes studiul microbiotei intestinale a populației în vârstă. S-a stabilit că microbiota persoanelor în vârstă (peste 65 de ani) prezintă variații interindividuale mai mari decât cea a adulților. De asemenea, s-a constatat că microbiota centenarilor este mai puțin diversă decât cea a adulților și persoanelor mai tinere și are un nivel scăzut de *Bacteroides, Bifidobacterium* și *Enterobacteriaceae*, și un nivel mare de *Clostridium* spp. în comparație cu persoanele mai tinere. Relevanța acestor modificări observate în timpul îmbătrânirii nu este încă pe deplin înțeleasă și sunt necesare pe viitor alte studii (în special studii de intervenție alimentară) pentru a investiga dacă modificarea tiparului alimentar al persoanelor în vârstă poate influența microbiota intestinală într-un mod care este benefic pentru sănătatea lor generală (Rodríguez J.M. et al., 2015).

În general, microbiota intestinală a unui individ poate fi privită ca un continuum, care la un capăt este predominată de membrii din filum-ul *Bacteroidetes*, iar la celălalt capăt – de *Firmicutes*. În plus, atunci când microbiota intestinală a unui individ a atins punctul său stabil, aceasta este constantă pentru o perioadă mai mare de timp. Semnificația acestei stabilități a microflorei intestinale poate fi dedusă din faptul că microorganismele pe parcursul creșterii și dezvoltării organismului-gazdă ocupă o nișă (sau organismul oferă această nișă). Această nișă reprezintă garantul că funcțiile importante ale microbiomului sunt întotdeauna prezente. Mai

mult, această stabilitate poate fi benefică și pentru sistemul imunitar înnăscut, întrucât va percepe aceeași microbiotă ca parte indispensabilă a organismului său.

Astfel, putem presupune că pe parcursul dezvoltării postnatale a organismului (creșterii și dezvoltării), la anumite etape, predomină anumiți reprezentanți ai microbiotei intestinale, care la acel moment, au cele mai mari beneficii pentru organism.

1.3. Interrelațiile microbiotei cu organismul-gazdă și rolul fiziologic al acestora în sănătatea tubului digestiv și a organismului

Interacțiunile dintre gazdă cu microbiota și cele dintre microorganismele microbiotei sunt prezentate ca o rețea complexă, care controlează componența comensală a microbiotei, agenții patogeni invadatori, activarea imunitară și funcția de barieră intestinală. O mai bună înțelegere a mecanismelor care stau la baza acestor interacțiuni va permite de a elucida rolul microbiotei în activitatea vitală a organismului și în dezvoltarea unor patologii și va ghida noi intervenții terapeutice.

După cum a fost menționat anterior, microbiomul intestinal funcționează ca un „organ” în interiorul organismului-gazdă (Baquero F., Nombela C., 2012; Riccio P., Rossano R. 2020). Organismul-gazdă la rândul său are un rol activ în această interacțiune, în special, prin: 1) capacitatea intestinului de a găzdui simultan microbiomul indigen, 2) de a menține o barieră mucoasă intactă și 3) de a face distincție între speciile simbiotice (autohtone) și speciile patogene periculoase.

Stabilirea microbiotei indigene sau asocierea dintre organismul-gazdă și microorganisme începe odată cu dezvoltarea organismului, în special, în perioada postnatală (vezi subcapitolul 1.2.). Interacțiunile care se formează în procesul de colonizare de către bacterii a organismului omului și animalelor stau la baza coexistenței ulterioare de lungă durată, ce aduce beneficii comune membrilor simbiozei. Corelația dintre organism și microbiomul indigen, în particular menținerea unui ecosistem microbian favorabil de lungă durată se realizează prin mai multe căi.

Microbiota intestinală este modelată de o combinație de factori extrinseci (de exemplu, stilul de viață, alimentația și medicația) și intrinseci (de exemplu, genetica gazdei, reglementările imune și metabolice). Este recunoscut faptul că factorii extrinseci determină efectul predominant, dieta sau factorul alimentar fiind cel mai bine studiat (Leeming E.R. et al., 2019). Genetica are un rol mai mic în modelarea microbiotei intestinale, cu un nivel mediu de 8,8%, conform unui studiu din 2016 realizat pe 1126 de gemeni (Goodrich J.K. et al., 2016). La rândul său, compoziția microbiotei intestinale este individualizată în funcție de gazdă și este modelată de-a

lungul întregii vieți, iar formarea ecosistemului unic de taxoni bacterieni, după cum a fost relatat anterior, începe de la naștere (Leeming E.R. et al., 2019).

O influență semnificativă asupra acestui proces o are alimentația. Interacțiunile dintre gazdă, dietă și microbiotă sunt complexe. Unii cercetători sugerează că genomul gazdei și cel al microbiotei indigene acționează ca o singură entitate coordonată, numită *metagenom*. Deși, compoziția microbiotei intestinale tinde să rămână relativ stabilă, în componența acesteia se observă fluctuații zilnice tranzitorii, iar regimul alimentar reprezintă declanșatorul principal al acestor fluctuații. Modul prin care factorul alimentar influențează compoziția microbiotei intestinale indică potențialul sau posibilitatea strategiilor terapeutice dietetice de a manipula diversitatea, compoziția și stabilitatea microbiană intestinală (Leeming E.R. et al., 2019).

La rândul său, microbii din intestinul uman îndeplinesc multe funcții metabolice pe care propriul nostru organism nu le poate îndeplini. În special, această relație se evidențiază în digerarea componentelor alimentare pe care organismul uman în mod normal nu le poate metaboliza, de exemplu, asimilarea polizaharidelor vegetale precum celuloza, xilanul, pectina și arabinoză. Rolul microbiomului în acest caz se reduce la proprietatea de a produce enzime ce metabolizează nutrienții enumerați. În același timp, bacteriile intestinale își obțin propria energie din fermentarea acestor zaharide (Gill S.R. et al., 2006). În plus, microbiota este capabilă să sintetizeze vitamine și aminoacizi, să degradeze oxalații din alimentație, să metabolizeze glicanii mucoasei produse de gazdă și să biotransformeze acizii biliari (Hooper L.V. et al., 2002). Această relație simbiotică permite gazdei și microbilor să folosească sursele de energie pe care în mod separat nu le pot utiliza eficient (Xu J., Gordon J.I., 2003). Acest fapt este evident în experimentele cu șoarecii gnotobionți (fără microbi intestinali), la care aportul caloric pentru a menține greutatea corporală este semnificativ mai mare (30%) decât la animalele cu microbiota normală. Atunci, când, la șoarecii gnotobionți se introduce microbiotă intestinală naturală, echilibrul caloric se normalizează, iar acești șoareci încep să ia în greutate (Bäckhed F. et al., 2004).

Recent, în mai multe studii, a fost stabilită influența semnalelor hormonale ale gazdei asupra comportamentului microflorei, fapt ce a determinat dezvoltarea unui nou domeniu de cercetare în microbiologie – endocrinologia microbiană, care are la bază principiul, conform căruia, prin coexistența lor îndelungată cu animalele și plantele microorganismele au dezvoltat sisteme de detectare a semnalelor asociate cu gazda, cum ar fi hormonii. Detectarea unor astfel de semnale permite microbului să recunoască faptul că se află în „localitatea” unei gazde adecvate și că, din punct de vedere temporal, ar trebui să inițieze exprimarea genelor necesare pentru colonizarea gazdei (Lyte M., 2013, 2016). Endocrinologia microbiană poate oferi o mai

bună înțelegere a factorilor care modelează interacțiunile dintre rezidenții microbiomului și gazda lor în stările de sănătate și boală. Studiile pe animale arată clar că microbiota intestinală poate simți starea emoțională (în special stresul psihologic) a gazdei lor. La rândul său, microflora intestinală poate influența starea emoțională a gazdei chiar până la punctul de a provoca stres și anxietate (Sandrini S. et al., 2015). Înțelegerea „conținutului" comunicării dintre gazdă și microb este necesară pentru a aprecia contribuțiile microflorei endogene la fiziologia umană și, eventual, pentru a înțelege în ce măsură microbiomul ne influențează comportamentul. O înțelegere mai profundă a relației intime și interdependente dintre microbiomul intestinal și organismul gazdei ar putea, de asemenea, să deschidă posibilități pentru noi terapii bazate pe microbiom în tratamentul afecțiunilor care nu sunt legate de infecții, cum ar fi tulburările de dispoziție și de alimentație (Sandrini S. et al., 2015).

Microbii intestinali, prin producerea de metaboliți, pot afecta și sistemul nervos periferic. Mai mult, microbii intestinali ai organismului mamei reglează dezvoltarea sistemului nervos fetal în timpul dezvoltării intrauterine. Semnalele microbilor intestinali pot fi „detectate" prin intermediul neuronilor vagali și spinali, integrați în trunchiul cerebral și hipotalamus, iar acest lucru influențează în cele din urmă semnalele eferente către organele periferice. Semnalizarea între microbiota intestinală și neuronii periferici are loc prin trei căi care interacționează după cum urmează. Celulele endoteliale specializate din mucoasa intestinului se numesc celule enteroendocrine (EEC) și reprezintă o parte importantă a căii de semnalizare hormonală; aceste celule reacționează la substanțele chimice și la moleculele de semnalizare produse de bacteriile intestinale și, la rândul lor, eliberează neuropeptide capabile să activeze neuronii senzoriali vagali sau să circule pentru a viza direct țesuturile efector (Cook T.M. et al., 2022).

Microbii intestinali transmit semnale către neuronii vagali, spinali și enterici printr-o varietate de mecanisme. Lipopolizaharidele produse de bacteriile Gram-negative pot activa receptorii neuronali de tip Toll-like. Bacteriile transformă triptofanul în metaboliți indolici care pot modifica programarea genetică a neuronilor enterici. Triptofanul poate fi, de asemenea, transformat în serotonină, care este eliberată de celulele entero-cromafine. Bacteriile digeră fibrele, producând SCFA care la rândul său declanșează eliberarea de către celulele a neuropeptidelor – peptida 1 asemănătoare glucagonului și peptida YY. Acizii biliari secundari produși de către microbii intestinali declanșează eliberarea neuropeptidelor menționate și pot să transmită semnale către neuronii enterici pentru a regla motilitatea (Cook T.M. et al., 2022).

Un alt aspect al interacțiunii gazdei cu comunitatea microbiană din intestin este capacitatea de a menține o barieră mucoasă intactă. Celulele epiteliale intestinale (CEI) au capacitatea de a asigura un strat protector între mucoasa intestinală și microorganismele

luminale, datorită joncțiunilor strânse dintre celulele intestinale, ce asigură integritatea barierei intestinale (Zhou A. et al., 2022). Celulele epiteliale intestinale construiesc două tipuri de bariere mucoase care separă celulele imune și microbiota intestinală pentru a menține homeostazia și a preveni inflamația în TGI: mucina și peptide antimicrobiale, reglând, astfel, replicarea microbiană și interacțiunea acesteia cu mucoasa intestinală. În plus, microbiota intestinală poate majora capacitatea (mecanismul) de apărare epitelială și reduce permeabilitatea intestinală pentru a forma o barieră mucoasă (Berg D. et al., 2015).

Compoziția barierei epiteliale este controlată în nișa celulelor stem, situată în cripta lui Lieberkuhn, dând naștere la patru tipuri de celule. Printre acestea se numără celulele Paneth (numai în intestinul subțire) care secretă un strat de mucus și, respectiv, factori antimicrobieni (peptide antimicrobiene), celulele caliciale care secretă proteine glicozilate pentru a genera stratul de mucus protector, celulele neuroendocrine care produc hormoni metabolici și, cel mai abundent tip de celule – enterocitul absorbant sau colonocitul. Interacțiunile dintre microbiota intestinală și CEI sunt cruciale pentru menținerea homeostaziei intestinale. Unele studii sugerează că interacțiunile dintre microbiota intestinală și CEI sunt factorii de reglare-cheie ai permeabilității epiteliale prin modularea joncțiunilor strânse (Allam-Ndoul B. et al., 2020).

Pentru a asigura homeostazia, microbiota comensală exercită efecte asupra celulelor barierei intestinale prin producerea de metaboliți rezultați din fermentarea polizaharidelor alimentare, cum ar fi SCFA și prin liganzii moleculari microbieni pe care îi exprimă. Un număr tot mai mare de studii au indicat rolul esențial al SCFA în menținerea barierei epiteliale intestinale. Prin secreția de SCFA (acidul propionic, acidul butiric și acidul acetic), ce modifică pH-ul și expresia factorilor de virulență, microbiota intestinală controlează agenții potențiali patogeni și patobionții. SCFA pot modula diferențierea și proliferarea CEI pentru a consolida funcțiile de barieră intestinală și metabolismul gazdei. De exemplu, acidul propionic, poate influența migrarea CEI și regenerarea epitelială. SCFA nu numai că furnizează combustibil pentru celulele epiteliale, ci și îmbunătățesc bariera intestinală prin activarea unor căi de semnalizare celulară. Și alți metaboliți ai microbiotei intestinale, de exemplu, derivați din triptofan, joacă un rol critic în menținerea echilibrului barierei intestinale (Zhou A. et al., 2022).

S-a depistat că anumiți microbi comensali posedă „loci” de utilizare a polizaharidelor care permit „recoltarea” enzimatică a glicanilor din mucus. Acești glicani pot fi apoi utilizați ca sursă de energie de către alte microorganisme comensale printr-un mecanism de tip „lanț alimentar” (Coker, J.K., 2021).

Celulele epiteliale produc factorii BAFF și APRIL, stimulând astfel celulele B (plasmatice) să producă Imunoglobulina A secretorie (IgA), care limitează și mai mult

interacțiunea microbiană cu epiteliul. IgA secretorie are, de asemenea, roluri de protecție împotriva microbiotei luminale (Bron P.A. et al., 2012). IgA se leagă de comensali, ceea ce creează o buclă de reacție reciprocă între gazdă și simbiot în timpul homeostaziei și previne colonizarea de către agenții patogeni și multiplicarea excesivă a patogenilor. Astfel, microbiota intestinală este interconectată și cu imunitatea intestinală. Prin această interconexiune se activează diferite căi imunologice, care în funcție de gradul de activare (normal sau exagerat) pot contribui la dezvoltarea mai multor boli, inclusiv tulburări gastrointestinale și dermatologice, alergii și devieri/modificări comportamentale (Roberts D.J., 2000).

Interacțiunea gazdă-microbi este asigurată de sistemul de recunoaștere a microbilor și de detecție a agenților patogeni, ce se realizează prin intermediul diferitor receptori de recunoaștere, care sunt foarte bine exprimați în celulele epiteliale intestinale, celulele imune intestinale rezidente ale gazdei și sunt de tipul: receptori de recunoaștere a patogenilor/modelelor (PRR), receptorii asemănători domeniului de legare a nucleotidelor și de oligomerizare (NOD, NLR), receptori asemănători Toll – Toll like (TLR), receptorii lectinei de tip C (CLR), receptori asemănători RIG-I (RLR), receptori asemănători Absent în melanoma 2 (AIM2; ALR) și receptorul oligoadenilat-sintetazei (OAS) (Thaiss C.A. et al., 2016).

Unii receptori (PRR, NOD, NLR) aparțin sistemului imunitar înnăscut. Interacțiunile dintre receptorii PRR ai celulelor intestinale cu liganzii microbieni declanșează cascade de răspunsuri imune și căi de semnalizare asociate cu sistemele imunitare (înnăscut și adaptiv) care sunt necesare pentru menținerea sănătății tubului intestinal. Receptorii Toll TLR sunt mediatori importanți ai căilor inflamatorii din intestin și joacă un rol major în medierea răspunsurilor imune față de o mare varietate de liganzi asociați cu agenții patogeni (Sameer A.S., 2021).

Activarea PRR poate duce la producerea diferitor peptide antimicrobiene, cum ar fi α-defensinele și proteina III derivată din insulele de regenerare de către celulele imune și celulele Paneth intestinale, care la rândul lor restricționează accesul agenților patogeni la epiteliul mucoasei (Macpherson A.J. et al., 2009).

Pe de altă parte recunoașterea compușilor microbieni cum ar fi flagelina și lipopolizaharida de către receptorii de tip NOD și al receptorilor de tip Toll duce la activarea și la producerea mai multor citokine inflamatorii, molecule antimicrobiene în CEI. Interacțiunea dintre gazdă și microbi poate influența diferențierea celulelor T în celule Th1, Th2, Th17 și Treg, care sunt reglate de citokinele proinflamatorii și antiinflamatorii (Sadeghpour Heravi F. et al., 2023). În condiții homeostatice, microbiota/probioticele comensale stimulează secreția de citokine (inclusiv limfoproteina stimulatoare a timusului - TSLP, IL-33, IL-23, IL-25 și TGFβ) de către CEI, care induc dezvoltarea celulelor prezentatoare de antigen (macrofagul Mφ și DCs).

Celulele prezentatoare de antigen induc generarea de celule T reglatoare, care mențin statutul antiinflamator al intestinului prin inhibarea/reducerea răspunsurilor efectoare. Celulele limfoide înnăscute intestinale, inclusiv celulele „natural killer", celulele inductoare de țesut limfoid și celulele T γδ, produc factorul IL-22, care reglează expresia proteinelor de joncțiune strânsă și aderentă de către CEI și funcția de barieră intestinală (Vlasova A.N. et al., 2016).

Activarea receptorilor Toll-like 4 de către bacteriile Gram-negative provoacă moartea enterocitelor și leziuni ale mucoasei. Creșterea permeabilității intestinale, întreruperea joncțiunilor dintre celulele epiteliale și translocarea necontrolată ulterioară a agenților patogeni microbieni (intestin permeabil) poate duce la mai multe boli gastrointestinale.

În cadrul interacțiunilor gazdă-microbiom, componentele bacteriene sunt recunoscute după anumite tipare: (1) modelele moleculare asociate microbilor - MAMP, exprimate de microbii autohtoni și agenții patogeni, și (2) modelele moleculare asociate agenților patogeni - PAMP (Murphy K. et al., 2008). Aceasta permite organismului-gazdă să recunoască mai ușor bacteriile proprii sau cele străine și să-și mobilizeze rapid „arsenalul" de protecție față de agenții patogeni.

La rândul său, populația microbiană, extrem de complexă și mixtă, acționează în mod coordonat ca un organism pluricelular. Această coordonare se realizează prin intermediul semnalizării chimice și prin metaboliții produși (Nicholson J.K. et al., 2005). De menționat, că studierea semnalizării intercelulare la microbiota intestinală (și nu numai) va permite înțelegerea modului în care diferiți membri ai acestei populații contribuie la formarea și menținerea ecosistemului microbian din intestin.

Moleculele care realizează semnalizarea intercelulară au fost descrise pe scară largă la diferite tipuri de bacterii. Comunicarea intercelulară *Quorum sensing* în comunitatea bacteriană reglează multiple forme de comportament, expresia genelor, secreția factorilor de virulență, formarea biofilmului, procesele de reproducere și sporulare (Henke J.M. et al., 2004). *Quorum sensing* permite bacteriilor să monitorizeze mediul înconjurător pentru a detecta alte bacterii din aceeași specie sau din specii diferite și să își modifice comportamentul ca răspuns, de exemplu, la modificările densității celulare. În mare parte, *Quorum sensing* se realizează prin producerea, detectarea și răspunsul la moleculele de semnalizare extracelulare numite autoinductori. Aceste molecule de semnalizare se acumulează în mediul înconjurător, pe măsură ce crește densitatea populației bacteriene. Bacteriile, la rândul său, monitorizează aceste semnale pentru a controla „populația" celulelor bacteriene și a modula, în mod colectiv, expresia genelor. În special, *Quorum sensing* controlează genele legate de activitățile care sunt benefice atunci, când sunt efectuate de grupuri de bacterii care acționează în sincronie (Rutherford S.T. et al., 2012).

De menționat, că această comunicare nu se limitează la membrii aceleiași specii. În prezent, există multiple exemple în care aceste legături pot influența microorganisme din alte specii sau chiar eucariotele unicelulare sau pluricelulare. Acest concept nou îngustează distincția dintre organismele unicelulare și pluricelulare. Cu ajutorul *Quorum sensing* bacteriile se pot apropia de comportamentul unui organism pluricelular și așa particularități precum interceptarea, decepția, antagonismul, cooperarea și modificarea bolii sunt printre consecințele comunicării între specii. Majoritatea proceselor întreprinse de bacterii sub controlul *Quorum sensing* sunt mai eficiente atunci, când sunt efectuate simultan de o mare parte a comunității bacteriene (Federle M.J., Bassler B.L., 2003; Greenberg E.P., 2003; Hsiao W.W. et al., 2008).

Unele date relevă că moleculele de semnalizare ale bacteriilor au proprietăți similare hormonilor peptidici de la vertebrate (Roth J. et al., 1986). Funcțiile acestor peptide la bacterii nu sunt cunoscute pe deplin. De asemenea, nu se știe dacă aceste peptide acționează asupra altor organisme (de exemplu, microbi sau vertebrate). Într-un studiu din *Clostridium perfringens* a fost extrasă și caracterizată o peptidă asemănătoare tirotropinei hipofizare native care are capacitatea de a spori oxidarea glucozei și sinteza fosfolipidelor. Atunci când a fost injectată puilor, această substanță a stimulat tiroida să elibereze iod în fluxul sanguin (Macchia V. et al., 1967).

În studii efectuate pe bacterii și drojdii au fost obținute molecule cu proprietăți biologice și imunologice asemănătoare cu hormonul gonadotropic corionic uman și molecule care au proprietăți de legare asemănătoare cu cele ale receptorilor pentru acest hormon (Edwards J.G., Odell W.D., 2003). La bacteriile *Escherichia coli* crescute într-un mediu sintetic simplu au fost detectate peptide care se aseamănă cu insulina mamiferelor (Roth J. et al., 1986) și o substanță asemănătoare melanocortinei care corespunde după structură terminației C a factorului G de alungire, ce prezintă unele asemănări structurale cu hormonul de stimulare a alfa-melanocitului și cu corticotropina (Roth J. et al., 2008).

Se consideră că substanțele secretate de către microbii intestinali, asemănătoare unor hormoni ai vertebratelor, pot mima semnalele hormonale ale gazdei și influența procesele antiinflamatorii din intestin și modula apetitul. Astfel, microbii din intestin, pe lângă rolul lor de organ metabolic al gazdei, pot fi, de asemenea, o sursă de semnale de tip hormonal pentru celulele gazdei (Roth J. et al., 1986).

Dereglările compoziției microbiomului intestinal, în special după infecții, utilizarea de antibiotice, modificări ale dietei și alte influențe de mediu contribuie la dereglarea funcțiilor organismului gazdei. Descifrarea mecanismelor moleculare prin care organismul percepe și răspunde la semnalele microbiotei intestinale, și a modului în care se produce comunicarea dintre

rezidenții microflorei intestinale, va ghida dezvoltarea și îmbunătățirea terapiilor de combatere a multiplelor boli ale societății contemporane.

1.4. Incidența și rolul enterococilor în sănătatea tubului digestiv și a organismului integru

Enterococii sunt bacterii acidolactice (LAB), cuprinzând atât microorganisme patogene, cât și comensale, omniprezente în mediul înconjurător, fiind totodată și simbionți intestinali. Enterococii reprezintă bacterii/coci Gram pozitive, care apar în perechi sau lanțuri scurte, nu formează spori, sunt microorganisme facultativ anaerobe, ce se atribuie la genul *Enterococcus.* Genul *Enterococcus* reprezintă un gen mare de bacterii acidolactice a filumul Bacillota (sinonim *Firmicutes*) și este al treilea gen ca mărime de LAB după *Lactobacillus* și *Streptococcus*. Enterococii sunt greu de deosebit de bacteriile din genul *Streptococcus*. De fapt, enterococii o perioadă de timp erau atribuiți la grupa D de streptococi din genul *Streptococcus*. Prin analize de biologie moleculară (hibridizarea ADN și secvențierea 16S ARN), în anul 1984, grupul D de streptococii a fost recunoscut ca enterococi în gen aparte față de streptococi (Schleifer K.H., Kilpper-Balz R., 1984). Suplimentar a fost recunoscut ca gen separat într-un addendum editorial în ediția din anul 1986 a „Manualului de bacteriologie sistematică" a lui Bergey (Mundt J.O., 1986).

Numele comun „enterococcus", derivă din limba franceză „entérocoque" și este definit ca de origine intestinală (enteric). Acest termen a fost folosit într-o publicație din 1899, în care Thiercelin a descris un coc Gram-pozitiv saprofit de origine intestinală, capabil să provoace infecție (Thiercelin M.E., 1899, citat de Fiore at al., 2019). Tot în același an (1899), MacCallum W.G. și Hastings T.W. au raportat patogenitatea enterococilor, iar mai târziu a fost dovedită prezența lor în fecale (Fiore E., at al., 2019).

În anii '30 ai secolului XX Lancefield R.C. a conceput un sistem de tipizare serologică, care clasifica enterococii ca streptococi ai grupului D, împreună cu unele organisme (de exemplu, *Streptococcus gallolyticus*, fost *Streptococcus bovis*) care diferă de enterococi printr-o serie de alte caracteristici. În 1937, Sherman J.M. a împărțit streptococii în grupele piogene, viridani, lactici și enterococici. În următorii 50 de ani, enterococii au continuat să fie clasificați taxonomic în genul *Streptococcus*. La mijlocul anilor 1980, odată cu progresele în tehnicile taxonomice bazate pe analizele acizilor nucleici, s-a propus ca *Streptococcus faecalis* și *Streptococcus faecium* să fie transferate din genul *Streptococcus*, într-un gen nou – *Enterococcus* și să fie reclasificate respectiv ca *Enterococcus faecalis* și *Enterococcus faecium* (Schleifer K.H.,

Kilpper-Balz R.,1984). Ulterior, și alte specii de enterococi au fost reatribuite de la genul *Streptococcus* la genul *Enterococcus*.

Taxonomia enterococilor s-a schimbat considerabil în ultimele decenii, iar genul include în prezent aproximativ 68 de specii recunoscute de enterococci cu diverse habitate, tropisme și caracteristici metabolice și fenotipice (http://www.bacterio.net/enterococcus.html#r). Cele mai importante și răspândite sunt două specii – *E. faecalis* (90–95%) și *E. faecium* (5–10%) (Vu J., Carvalho J., 2011). Sunt cunoscute și alte specii de enterococi – *E. avium*, *E. caccae*, *E. casseliflavus*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, and *E. raffinosus*, care în literatura de specialitate sunt numiți enterococi non-faecium și non-faecalis și care sunt cauza frecventă a infecțiilor endovasculare și ale fluxului sanguin la om (Monticelli J et al., 2018; Pinkes M.E., et al., 2019). De menționat că speciile *E. cecorum* și *E. durans* sunt identificate mai des (sunt frecvent izolate) (Chenoweth C. et al., 1990), în timp ce speciile *E. caseliflavus*, *E. hirae*, *E. gallinaroum* și *E. avium* sunt detectate ocazional (Gilmore M. et al., 2002, Krawczyk B. et al., 2021). Unele specii de enterococi, cum ar fi *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* și *E. raffinosus* sunt agenți ai unor infecții (Miller W.R. et. al., 2016).

După cum a fost menționat, enterococii sunt organisme anaerobe facultative, adică sunt capabili de respirație celulară atât în mediu cu oxigen, cât și în lipsă de oxigen. Deși nu sunt capabili să formeze spori, enterococii sunt toleranți la o gamă largă de condiții de mediu cum ar fi temperatură extremă (10-45 ºC), diapazon mare de pH (4,6-9,9) și concentrații mari de clorură de sodiu. Enterococii au fost descriși prin următoarele caracteristici: reacția lor cu antiserul grupului D, capacitatea de a crește în soluție salină de concentrație mare, la 10ºC și 40 ºC și la pH ridicat, capacitatea de a supraviețui expunerii la temperatura de 60 ºC timp de 30 de minute; capacitatea de a hidroliza esculina în prezenta bilei (Fisher K., Phillips C., 2009; Ben Braïek O., Smaoui S., 2019). Datorită acestui fapt enterococii au o răspândire largă în mediul înconjurător, se găsesc în sol, apă, alimente, plante.

Tractul gastrointestinal al animalelor reprezintă probabil cel mai mare rezervor de enterococi (Gilmore M.S., 2014). În anul 1963, Mundt J.O. și colegii săi în rezultatul unui studiu privind prezența enterococilor în mediile naturale au stabilit incidența acestor bacterii în proporție de cca 71% în masele fecale la mamifere, de cca 86% la reptile și de cca 32% la păsări (Mundt J.O., 1963, citat de Gilmore M.S., 2014). S-a stabilit că enterococii „preferă” să colonizeze TGI al animalelor mai mari, care au un regim alimentar variat. Cel mai probabil, compoziția microbiotei în raport cu alimentația specifică a unor animale determină dacă enterococii sunt capabili să supraviețuiască și să se dezvolte în tractul lor gastrointestinal. Mai mult, s-a stabilit că anumite specii de enterococi colonizează anumite specii de animale. De

exemplu, specia *E. columbae* este specifică porumbeilor; *E. asini* a fost identificată numai la măgari (Gilmore M.S., 2014). Speciile de enterococi se întâlnesc în tractul intestinal la insecte. Speciile *E. faecalis* și *E. faecium* sunt predominante, alte specii, însă, au o prevalență mai mică. Într-un studiu privind Drosophila crescută în laborator și sălbatică (Cox C.R. Gilmore M.S. 2007, citați de Gilmore M.S., 2014) în tractul digestiv au fost identificate mai multe specii de enterococi, inclusiv *E. faecalis, E. faecium, E. gallinaraum* și *E. durans*. Enterococii au fost detectați și la insecte din spitale, ceea a determinat îngrijorări cu privire la faptul că aceste insecte pot fi sursă de contaminare pentru oameni, însă, implicarea insectelor în transmiterea enterococilor rezistenți sau infecțioși nu a fost stabilită. În unele studii s-a stabilit că muștele de casă și gândacii de la fermele de porci pot acționa ca vectori și/sau rezervoare de enterococi rezistenți la antibiotice și potențial virulenți. Printre speciile de *Enterococcus* recent caracterizate, *E. termitis* a fost izolată din intestinul unei termite, în timp ce unele tulpini de *E. rotai* au fost izolate de la țânțari (Sedláček I., et al., 2013; Gilmore M.S., 2014).

Enterococii au fost, depistați pe plante de cultură (cum ar fi măslinul) și în flora spontană (Gilmore M.S., 2014). Din surse vegetale au fost izolate speciile de enterococi: *E. casseliflavus* și *E. mundtii* (Martin J.D., Mundt J.O., 1972, citați de Schwartzman J. et al., 2024).

Enterococii sunt utilizați pe scară largă ca indicatori ai contaminării fecale de origine animală sau umană în mediu. Cu toate acestea, măsura în care enterococii din mediul înconjurător (inclusiv din sursele de apă) reflectă contaminarea cu deșeuri umane sau animale continuă să fie dezbătută (Harwood V.J. et al., 2000). Abundența lor în fecale umane și animale, ușurința cu care sunt cultivate și corelarea conținutului lor în apele dulci și marine cu rezultatele sănătății umane, a condus la utilizarea lor pe scară largă ca instrumente pentru evaluarea calității apei recreative la nivel mondial (Lebreton F. et al., 2014).

Enterococii sunt o componentă naturală a microbiotei umane, se întâlnesc pe piele, în cavitatea bucală și intestinul gros și tractul genital constituind cca 1 % din microbiota totală (Chenoweth C., Schaberg D., 1990; Vankerckhoven V. et al., 2004; García-Solache M., Rice L.B., 2019). Există aproximativ 10^6 până la 10^7 enterococi în intestinul uman: < 1% se găsesc în ileon, până la 1% în colon (Qin J. et al., 2010), dintre care majoritatea sunt fie *E. faecalis* (10^5-10^7 UFC/g de fecale), fie *E. faecium* (10^4-10^5 UFC/g de fecale) (Murray B.E., 1990).

Opiniile privind beneficiile reprezentanților enterococilor pentru organismul-gazdă sunt diverse și contradictorii. Este cunoscut că unele specii de enterococi sunt comensali, pot stimula sistemul imun și au o influență semnificativă asupra menținerii homeostaziei intestinale (Laissue J.A et al., 1993; Saillant V et al., 2021). Majoritatea enterococilor nu sunt virulenți și sunt considerați relativ inofensivi, cu potențial redus de infecție.

E. faecalis reprezintă specia de enterococi, care însoțește organismul uman încă din primele zile de viață. Ca bacterie comensală produce vitamine, metabolizează nutrienții și menține pH-ul intestinal la un anumit nivel, cu impact pozitiv asupra sistemului imunitar uman și asupra organismului. Din acest motiv, unele tulpini ale acestei bacterii sunt utilizate ca probiotice (Daca A., Jarzembowski T., 2024).

Cu toate acestea, enterococii au fost identificați și ca agenți patogeni oportuniști nosocomiali cu rezistență crescută la agenți antimicrobieni aprobați (O'Driscoll T., Crank C.W., 2015). Enterococii sunt primele dintre organismele ESKAPE (*Enterococci* spp., *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* spp.) evidențiate de OMS ca fiind cauza mai multor infecții nosocomiale care amenință sănătatea, rezistente la antibiotice (Zhen X. et al., 2019).

Datorită virulenței și rezistenței la mai multe medicamente, antiseptice și dezinfectanți, enterococii reprezintă o amenințare epidemică în mediul spitalicesc (Guzman Prieto A.M. et al., 2016). Enterococii sunt a doua cea mai frecventă cauză a bacteriemiei intraspitalicești și sunt asociați cu o mortalitate generală de aproximativ 33%. Bacteremia enterococică este adesea precedată de colonizarea densă a tractului gastrointestinal din care enterococii se pot transloca în fluxul sanguin. În plus, diminuarea imunității mucoasei și perturbarea barierei gastrointestinale au fost asociate cu bacteriemia enterococică. Factorii de risc includ mucozita, infecția cu *Clostridium difficile* și neutropenia (Dubin K., Pamer E.G., 2014). Cele mai întâlnite infecții cauzate de enterococi sunt cele ale tractului urinar, fluxului sanguin, endocardului și rănilor (Shepard B.D., Gilmore M.S., 2002). De asemenea, reprezentanții enterococilor sunt responsabili de contaminarea alimentelor.

Speciile de enterococi prezintă diferențe semnificative în incidența factorilor de virulență. Analiza distribuției speciilor *E. faecalis* și *E. faecium* în mostrele preluate de la subiecți sănătoși a relevat că cca 55 % revine *E. faecium* și 43% – *E. faecalis* (Eaton T.J. și Gasson M.J., 2001). La subiecții bolnavi se observă că *E. faecalis* a fost specia dominantă (Novais C. et al. 2006, 2008). S-a stabilit că *E. faecalis* reprezintă cauza a 80-90% din infecțiile enterococice clinice umane, în timp ce 5-15% sunt cauzate de *E. faecium*. *E. faecalis* poate provoca complicații grave, care includ infecții abdominale și pelvine, infecții ale tractului urinar, septicemie, infecții ale plăgilor, endocardită sau meningită enterococică (Horsley H. et al., 2013).

În general, *E. faecalis* are mai multe trăsături de virulență, în timp ce tulpinile de *E. faecium* au fost în general lipsite de factori de virulență (Eaton T.J. și Gasson M.J., 2001). În plus, având în vedere distribuția rezistenței la antibiotice în funcție de specie, *E. faecium* posedă

un nivel mai ridicat de rezistență decât *E. faecalis* (Gin A.S., Zhanel G.G., 1996; Franz C. et al., 2011).

Colonizarea enterococică a tractului gastrointestinal este principalul factor predispozant pentru infecțiile severe, care apar prin translocarea intestinală. Enterococii sunt fagocitați și transportați prin peretele intestinal și rezistă „uciderii" de către sistemul limfatic. Traversând bariera intestinală, enterococii, în special *E. faecium* și *E. faecalis*, duc la apariția bacteriemiei/sepsisului la pacienți. În SUA, de exemplu, enterococii provoacă aproximativ 66.000 de infecții în fiecare an (Fernández-Hidalgo N., Escolà-Vergé L., 2019).

Prin urmare, menținerea echilibrului microbian în intestin este de o importanță absolută. Aceasta, în special, se referă la pacienții cu cancer de sânge, deoarece medicamentele imunosupresoare sau terapia cu antibiotice modifică mediul intestinal și permeabilitatea acestuia, facilitând translocarea bacteriilor în patul sanguin (Samet A. et al., 2013, Reyes K. et al., 2016). Totodată, unele cercetări relevă că reprezentanții enterococilor pot fi cauza dezvoltării tumorigenezei colonului (Cheng Y. et al., 2020).

Patogenitatea enterococilor este determinată de rezistența acestora la medicamente, în special la antibiotice. Începând cu sfârșitul anilor 1970 și 1980, speciile de enterococi au dezvoltat o rezistență crescută la mai multe clase de antibiotice. În urma tratamentului cu antibiotice se atestă o colonizare intensă cu enterococi a tractului intestinal, ceea ce duce la eliminarea multor bacterii comensale cu rol de protecție antipatogenă. Întrucât cele mai abundente specii din tubul digestiv la oameni sunt *E. faecalis* și *E. faecium,* respectiv, urmare a rezistenței antibiotice, majoritatea infecțiilor sunt cauzate de aceste două specii. S-a stabilit că ambele specii au rezistență intrinsecă la unele antimicrobiene, în principal cefalosporine, aminoglicozide, clindamicină și trimetoprim-sulfametoxazol (Calatrava E., 2022).

Astfel, utilizarea antibioticelor a devenit un factor de risc în răspândirea enterococilor rezistenți la medicamente în mediul clinic, ceea ce determină enterococii să devină una dintre cele mai frecvente cauze ale infecțiilor intraspitalicești (Hidron A.I. et al., 2008).

În acest context, manipularea microbiomului intestinal pentru a preveni răspândirea tulpinilor bacteriene rezistente la antibiotice, susținând în același timp ecosistemul sensibil din care fac parte enterococii, este o sarcină a cercetărilor contemporane.

În acest aspect, cercetările recente demonstrează posibilitatea de utilizare a reprezentanților genului *Enterococcus*, sub formă de probiotice, ca factor de susținere a sistemului imunitar. De asemenea, enterococii au un rol semnificativ în tehnologia alimentară, în calitate de cultură inițială implicată în fermentarea mezelurilor și brânzeturilor (García-Díez J.; Saraiva, 2021) și în conservarea alimentelor (Franz C. et al., 2011; Giraffa G., 2003).

Abordarea rolului fiziologic și terapeutic al enterococilor diferă de la o țară la alta. În unele țări, semnificația și aplicația terapeutică (sub formă de probiotice) a enterococilor este ignorată, indiferent de caracteristicile lor pozitive. În alte țări, enterococii sunt acceptați, în pofida virulenței acestora. În acest context, este importantă standardizarea criteriilor care ar permite categorizarea tulpinilor de bacterii drept benefice pentru sănătate (Krawczyk B. et al., 2021).

În prezent, speciile de *Enterococcus*, din cauza patogenității, nu sunt nici recomandate pentru lista QPS (EFSA Panel on Biological Hazarda, 2022) și nici nu au statut GRAS (Ogier, Serror, 2008), deși, cunoștințele științifice recente permit diferențierea tulpinilor comensale de cele patogene (Montealegre M.C. et al., 2016; Bonacina J. et al., 2017; Jung A. et al., 2017).

În literatura de specialitate, flora microbiană a tractului digestiv este în general împărțită în: 1) microorganisme indigene, benefice, care au ajuns să aibă o relație strânsă cu gazda printr-o perioadă lungă de evoluție și 2) microorganisme potențial patogene. În acest sens, progresele recente în epidemiologia moleculară bazate pe amprenta moleculară, tiparea secvenței multi-locus, studiile fenotipice și analizele genomului întreg aduc dovezi suplimentare că tulpinile nosocomiale de *Enterococcus* sunt diferite genotipic de tulpinile comensale. De exemplu, *E. faecium* a fost subtipizat în trei clade diferite: clada A1 asociată spitalului, rar întâlnită la indivizii sănătoși; clada A asociată animalelor și clada B asociată comunității, întâlnită în mod obișnuit la indivizii sănătoși și care rareori cauzează infecții (Montealegre M.C. et al., 2015). *E. faecalis*, pe de altă parte, pare să nu aibă o structură de cladă atât de clară, probabil pentru că această specie ocupă o varietate mai mare de micronișe ecologice, având, astfel, acces la un spectru mai eterogen de alele decât *E. faecium* (Ruiz-Garbajosa P. et al., 2006).

Compararea genomurilor complete ale *E. faecium* din baza de date NCBI a arătat gruparea diferențială a izolatelor comensale și clinice, sugerând că aceste tulpini pot fi adaptate în mod specific la mediile de existență (Beukers A.G. et al., 2017). Diferența dintre capacitatea izolatelor patogene și comensale de *E. cecorum* de la diferite specii de animale de a metaboliza manitolul poate fi explicată printr-o evoluție separată a lor (Hanchi H. et al., 2018). De asemenea, investigarea secvențelor genomului a 4 grupe de specii de *Enterococcus* de origine alimentară, inclusiv lactate, carne, probiotice și probiotice de origine lactate, nu a evidențiat nicio corelație între sursa de izolare/proprietățile probiotice cu caracteristicile filogenetice nici la nivel de specie sau de tulpină.

Deși sunt necesare dovezi și studii suplimentare, datele noi privind diferențierea dintre tulpinile comensale și nosocomiale determină elaborarea de noi recomandări cu privire la cadrul

legislativ pentru probiotice, pentru a face distincția între tulpinile de *Enterococcus* sigure și potențial dăunătoare.

În pofida faptului că enterococii sunt considerați una din cele mai controversate grupe de bacterii, s-a dovedit că enterococii reprezintă o parte a microbiotei indigene la om și animale care participă în modularea sistemului imun. Enterococii au proprietatea de a crea relații simbiotice cu alte bacterii și cu organismul-gazdă. Desigur că aceste interrelații se stabilesc pe parcursul colonizării, proces în care bacteriile ocupă anumite nișe în cavitățile organismului și se formează ecosistemele bacteriene.

Enterococii (*E. faecalis* și *E. faecium*) împreună cu *Bifidobacterium*, *E. coli* și *Lactobacillus*, colonizează sistemul digestiv al majorității sugarilor sănătoși în primele 7-10 zile după naștere (Gewolb I.H. et al., 1999; Růžičková M. et al., 2020). Aceste microorganisme provin în principal din flora tractului genital al mamei. S-a depistat că enterococii colonizează dinamic și tractul gastrointestinal al nou-născuților născuți prin operație cezariană. Capacitatea înaltă de colonizare este datorată capacității acestora de a supraviețui unor condiții severe de mediu, de exemplu, la un pH de 9,6. Mai mult, aceste specii prezintă rezistență la sărurile biliare, care le permit să depășească sistemul digestiv uman și să colonizeze intestinul gros (Fisher K. et al., 2009; McHugh C.P. et al., 2004).

Cunoștințele privind colonizarea enterococică a intestinului sunt oferite de studiile tractului gastrointestinal uman și ale materiei fecale. Enterococii sunt localizați primar în intestinul subțire și gros, unde sunt membri ai consorțiilor jejunale, ileale, cecale și recto-sigmoidale. Enterococii au fost depistați în cavitatea orală, apar mai rar în stomac (Lebreton F., Willems R., Gilmore M.S., 2014). Dintre speciile de enterococi, *E. faecalis* este primul colonizator al tractului gastrointestinal uman cu un impact major asupra dezvoltării imune intestinale în stadiile foarte timpurii ale vieții. *E. faecalis* poate stimula funcția celulelor imune și îmbunătăți reglarea proliferării celulare. A fost documentată inhibarea de către *E. faecalis* a apoptozei macrofagelor și sporirea supraviețuirii acestora. S-a constatat că această caracteristică este independentă de tulpina bacteriană. În particular, în timpul colonizării tubului digestiv *E. faecalis* are un rol protector în reglarea homeostaziei colonului în timpul dezvoltării prin suprimarea mediată de patogen, declanșarea răspunsurilor inflamatorii în CEI-urile umane, și prin atenuarea secreției de citokine proinflamatorii, în special IL-8.80. În calitate de imunomodulator, *E. faecalis* este responsabil pentru activarea celulelor CD4, CD8 (CD-cluster de diferențiere) și a limfocitelor B (Krawczyk B., 2021).

Până în prezent, nu sunt evidențiate mecanismele prin care enterococii (în particular *E. faecalis*) interacționează cu celulele dendridice și progenitorii lor și care este impactul acestor

interacțiuni asupra răspunsului imun al organismului. În baza datelor obținute din diverse studii, se poate concluziona că *E. faecalis* influențează celulele dendridice și precursorii acestora, în funcție de momentul în care are loc expunerea în timpul procesului de diferențiere. Expunerea timpurie la *E. faecalis* duce la formarea de celulelor dendridice inflamatorii aberante care sunt imunocompromise și incapabile să promoveze un răspuns proliferativ mic al celulelor T (Mohamed Elashiry M. et al., 2020). Pe de altă parte, s-a stabilit că în doze mari, *E. faecalis* provoacă suprimarea imună a macrofagelor și modifică răspunsul imun al gazdei, facilitează infectarea cu alți agenți patogeni, întârzie vindecarea rănilor și infiltrarea celulelor imune și suprimă expresia citokinelor inflamatorii (Mohamed Elashiry M. et al., 2020).

Enterococii, datorită capacității înalte de adeziune a lor de celulele epiteliale intestinale, creează o barieră de protecție, ce împiedică legarea și pătrunderea microbilor dăunători, care concurează pentru aceleași locuri. Ca rezultat, microbii patogeni nu pot să se lege de epiteliul intestinului și să infecteze organismul. De exemplu, *E. faecium* consumă unele dintre resursele de care au nevoie agenții patogeni pentru a se dezvolta. *E. faecium* poate produce acid folic, de care organismul are nevoie pentru metabolismul celular, diviziunea celulară și sinteza vitaminelor și aminoacizilor. Rezultatele cercetărilor pe animale indică că *E. faecium* spp. poate stimula funcția celulelor imune, poate îmbunătăți reglarea proliferării celulare și poate crește capacitatea de ardere a grăsimilor (Huang S. et al., 2022).

Cert este faptul, că enterococii sunt o componentă naturală a microbiotei umane și au un rol semnificativ în tractul digestiv. În calitate de bacterii comensale, enterococii participă la metabolismul nutrienților (carbohidrați, lipide și proteine) pentru a menține pH-ul mediului în care trăiesc, în sinteza vitaminelor și a altor metaboliți, necesari pentru funcționarea normală a organismului-gazdă, în prevenirea răspândirii bacteriilor de putrefacție, având un impact asupra sistemului imunitar uman, adică asupra imunității umorale și celulare (Wan L. et al., 2016).

Rolul benefic al enterococilor este dovedit și prin capacitatea acestora de a produce substanțe cu acțiune antibacteriană, numite bacteriocine sau enterocine (Franz C. et al., 2011). Unele bacteriocine/enterococice sunt active și împotriva virusurilor. Producția de bacteriocine ajută enterococii să colonizeze tractul gastrointestinal și acest lucru contribuie, de asemenea, la inhibarea organismelor patogene din intestin (da Silva N. et al., 2012) și este una dintre caracteristicile necesare în selectarea tulpinilor de probiotice (Hanchi H. et al., 2018).

Unele bacteriocine pot fi grupate la bacteriocine tipice, produse de LAB conform clasificării tradiționale. Însă, o parte din bacterocine produse de enterococi nu au putut fi categorizate la acest grup (Hanchi H. et al., 2018). Franz C. și colab. (2007) au sugerat gruparea enterocinelor în patru clase noi: enterocine lantibiotice (clasa I) cum ar fi citolizina; enterocine

nonlantibiotice (clasa II) cu trei subclase (1, 2 și 3) cum ar fi enterocina A (clasa II-1), enterocina Q (clasa II-2) și enterocina B (clasa II-3); urmată de enterocinele ciclice (clasa III) cum ar fi enterocina AS-48 și enterocinele cu greutăți moleculare mari (clasa IV) precum enterolizina A. Majoritatea enterocinelor caracterizate aparțin clasei II (Hanchi H. et al., 2018; Ben Braïek O., Smaoui S., 2019). Listă mare de bacteriocine enterococice cu structura și spectrul lor de acțiune este disponibilă în baza de date BACTIBASE (Hammami R. și colab., 2013).

Enterocinele produse de *Enterococcus* spp. sunt peptide mici, cu activitate antimicrobiană față de bacteriile Gram-pozitive strâns înrudite, inclusiv bacterii de alterare sau patogene, cum ar fi *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* spp. și *Clostridium* spp. (Foulquié Moreno M.R. et al., 2006). De asemenea, a fost documentată activitatea antagonistă a enterocinelor față de bacteriile Gram-negative – *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* și *Vibrio holera*, precum și față de ciuperci, drojdii și viruși. Enterocinele sunt sintetizate pe ribozomi, reprezintă peptide cationice, hidrofobe cu greutate moleculară mică, care conțin aproximativ 20-60 de resturi de aminoacizi și sunt stabile la temperaturi înalte. De asemenea, sunt rezistente la acțiunea enzimelor și își păstrează funcționalitatea la o gamă largă de valori ale pH-ului. Mecanismul de acțiune a enterocinelor constă în perturbarea integrității membranei citoplasmatice, în care formează pori, epuizând astfel potențialul transmembranar și/sau gradientul de pH, ceea ce duce la scurgerea moleculelor intracelulare indispensabile. Mecanismul de acțiune a enterolizinei A este destul de diferit față de celelalte enterocine, deoarece atacă bacteriile susceptibile prin degradarea structurii peretelui celular, ceea ce duce în cele din urmă la liza celulelor tulpinilor țintă (Ben Braïek O., Smaoui S., 2019). Enterocinele au aplicație în tratamentul infecțiilor gastrointestinale, infecțiilor cutanate, a infecțiilor cauzate de bacteriile rezistente la antibiotice. Datorită acțiunii antagoniste față de tulpinile importante (nosocomiale) din punct de vedere clinic și a activității sinergice cu alte bacteriocine și antibiotice, enterocinele ar putea fi utilizate în tratamentul infecțiilor nosocomiale cauzate de bacteriile rezistente la antibiotice (Hammami R. et al., 2013). Mai mult, capacitatea de ucidere a bacteriocinelor produse de tulpinile de *Enterococcus* este considerată o strategie de succes pentru menținerea populației microbiene și reducerea numărului de concurenți patogeni.

În general, bacteriocinele au importanță în legătură cu răspândirea rapidă a rezistenței la antibioticele convenționale. S-a propus problema stringentă de a identifica compuși noi, agenți antimicrobieni și metode terapeutice inovatoare pentru tratarea infecțiilor cauzate de agenți patogeni rezistenți la antibiotice și limitarea răspândirii acestora. În acest aspect, bacteriocinele sunt considerate a fi o alternativă în tratamentul infecțiilor bacteriene rezistente la antibiotice.

De asemenea, bacteriocinele/enterocinele au un potențial ridicat de aplicare ca aditivi alimentari naturali pentru a spori siguranța alimentară. Din perspectiva legislației actuale, nisina și pediocina PA1/AcH au fost singurele bacteriocine aprobate pentru utilizarea ca aditivi alimentari de către FDA în SUA și UE, indiferent de numărul considerabil de lucrări experimentale privind aplicarea bacteriocinelor în alimente (Vignolo G. et al., 2012; Barbosa C. et al., 2017). Cu toate acestea, tulpinile probiotice sau bacteriocinele destinate utilizării pentru terapie trebuie să fie supuse procesului de reglementare ca medicament nou și trebuie să fie autorizate de organismele responsabile (de exemplu FDA în SUA) (Venugopalan V. et al., 2010). În acest sens, genul *Enterococcus* este atribuit la grupa de risc 2, care include microorganismele care conțin factori de virulență conform Directivei 2000/54/EC (Elashiry M. et al., 2020).

1.5. Potențialul enterococilor în calitate de probiotice

Potrivit FAO și OMS „probioticele sunt microorganisme vii identificate la nivel de tulpină care, atunci când sunt administrate într-o cantitate adecvată, au un efect benefic asupra sănătății gazdei” (Gibson G.R., 2017). Probioticele sunt adesea denumite ca „preparate bioterapeutice vii” pentru uz uman și „preparate microbiene administrate direct” pentru hrana animalelor (Krawczyk B. et al., 2021). Pentru depistarea și selectarea tulpinilor microbiene cu proprietăți de probiotice, FAO și OMS au stabilit unele criterii de bază, cum ar fi: examinarea toleranței la tranzitul oro-gastrointestinal, producția de substanțe antimicrobiene și sensibilitatea la antibiotice, aderența la mucoasa intestinală umană și activitatea de imunomodulare dorită (FAO/WHO, 2002). Se recomandă ca probioticele să aibă „un conținut definit, un număr adecvat de componente viabile la sfârșitul perioadei de valabilitate și dovezi bine argumentate privind beneficiile pentru sănătate”. De asemenea, probioticele trebuie să fie „sigure pentru utilizarea intenționată” (Hill C. et al., 2014). Aceste poziții au fost reiterate în 2018 de către Asociația Științifică Internațională a Probioticelor și Prebioticelor – ISAPP (ISAPP, 2018).

Deseori termenul „probiotic” este folosit greșit pentru diferite categorii de produse: alimente și suplimente alimentare. În acest caz sunt necesare unele criterii clare care ar defini precis termenul de „probiotic”. Astfel, tulpinile de probiotice trebuie să fie (1) suficient de caracterizate; (2) sigure pentru utilizarea preconizată; (3) susținute de cel puțin un studiu clinic pozitiv efectuat pe subiecții umani, în conformitate cu standardele științifice general acceptate sau în conformitate cu recomandările și dispozițiile autorităților locale/naționale, dacă este cazul; și (4) să fie viabil în produs la o doză eficientă pe toată durata de valabilitate (Binda S. et al., 2020). Potrivit FDA (SUA), bacteriile probiotice ar trebui „în general să fie recunoscute ca

sigure” (Institute of Medicine, 2006). În Europa, „Prezența calificată de siguranță” („Qualified Presumption of Safety - QPS”) este responsabilă pentru recomandarea agenților biologici adăugați în mod intenționat în produsele alimentare sau în hrana pentru animale, iar informațiile sunt disponibile pe panelurile științifice ale Autorității Europene pentru Siguranța Alimentară – EFSA. (Koutsoumanis K. et al., 2020). Numeroase studii au constatat că unele tulpini de bacterii, izolate de la animale, produse alimentare fermentate sau nefermentate, ar putea fi candidați potențiali pentru a fi utilizate ca probiotice pentru oameni și animale. Printre mai multe microorganisme, LAB, în special, din genurile de *Bifidobacterium* și *Lactobacillus*, izolate din tractul gastrointestinal uman au fost recomandate de FAO și OMS pentru uz uman în calitate de probiotice, datorită statutului lor de GRAS (Zielińska D. et al., 2018).

Se cunoaște că consumul de probiotice are efecte benefice, inclusiv răspunsul imunitar sporit, ameliorarea homeostaziei microbiene intestinale, reducerea enzimelor fecale implicate în inițierea cancerului, efecte adjuvante ale vaccinului, tratamentul diareii și terapia cu antibiotice, prevenirea ulcerelor legate de *Helicobacter pylori*. Probioticele sunt, de asemenea, implicate în reducerea colesterolului seric, în antagonismul împotriva agenților patogeni de origine alimentară, a agenților ce provoacă carii dentare, precum și ai candidozei și infecțiilor tractului urinar (Saavedra J.M., 2001).

Probioticele pot fi de origine de la o singură specie sau de la mai multe specii. Se consideră că un amestec de bacterii probiotice din mai multe specii nu numai că interacționează sau concurează, ci și influențează reciproc efectele benefice (Krawczyk B. et al., 2021). În acest aspect, a fost explorat și potențialul probiotic al altor câteva genuri de LAB, cum ar fi *Aerococcus, Carnobacterium* și *Enterococcus*, în mare parte, datorită avantajului lor tehnologic în industria alimentară și a proprietăților lor benefice sănătății. Tulpinile de enterococi, pentru acest scop, sunt utilizate ocazional. Au fost efectuate mai multe studii pentru a evalua caracteristicile de probiotice ale tulpinilor de *Enterococcus* și au fost documentate efectele benefice ale acestora pentru sănătate. Probioticele enterococice pot fi utilizate în tratamentul și/sau prevenirea anumitor boli umane și animale, cum ar fi ameliorarea simptomelor sindromului colonului iritabil și a diareii induse de antibiotice și prevenirea diferitor boli intestinale funcționale și cronice. Mai mult, unii enterococi prezintă efecte antimutagenice, anticancerigene, hipocolesterolemice și de reglare a imunității (Krawczyk B. et al., 2021).

Însă, problema utilizării tulpinilor de *Enterococcus* ca probiotice este destul de controversată din cauza ușurinței cu care reprezentanții acestui gen pot dobândi diferiți factori de virulență și rezistență la diferite clase de antibiotice. Enterococii sunt, de asemenea, considerați agenți patogeni oportuniști. Această problemă este deosebit de relevantă în mediile spitalicești,

unde apar adesea focare de infecții cauzate de enterococi. Capacitatea lor de a se transloca din tractul gastrointestinal în diferite țesuturi și organe, precum și virulența și rezistența lor la antibiotice sunt factori de risc în promovarea lor în calitate de probiotice (Zhen X. et al., 2019).

Totuși, au fost documentate studii care relevă efectul benefic al diferitor tulpini de enterococi. Primele date privind utilizarea enterococilor în tratamentul diferitor boli, cum ar fi infecțiile cronice și recurente ale tractului respirator superior, leziunile cutanate sau bolile cronice legate de sinusuri (sinuzită cronică) au fost descrise în anii 1950. În anul 1955 au fost menționate primele terapii probiotice, care au presupus aplicarea de *E. faecalis*, urmare a tratamenului cu antibiotice (Rusch K. et al., 2001). În prezent, preparatele probiotice de *E. faecalis*, uneori îmbogățite cu *E. coli* și lactobacili, sunt recomandate pentru tratamentul unor boli precum inflamația tractului urinar, sinuzita sau bronșita și răceala comună. În Germania, *E. faecalis* (tulpina DSM 16431) este comercializat sub formă de medicament cu denumirea „Symbioflor 1" (SymbioPharm, Herborn, Germania) și este recomandat pentru sinuzita sau bronșita acută și recurentă (Franz C. et al., 2011).

S-a constatat că tulpina de *E. durans* M4-5 generează SCFA (butirat), care induce efecte antiinflamatorii semnificative și contribuie la integritatea epiteliului intestinal, iar tulpina de *E. durans* KLDS 6.0930 poate fi un candidat probiotic prin faptul că induce scăderea nivelului de colesterol din serul la subiecții umani. O altă tulpină de *E. durans* LAB18s a fost recomandată ca fiind utilă în calitate de supliment cu seleniu în alimentație. Tulpinile *E. faecium* LCW 44 și E. *durans* 6HL s-au dovedit a fi foarte puternice împotriva bacteriilor Gram-pozitive și, respectiv, Gram-negative. *E. mundtii* ST4SA a fost prezentată recent ca o altă tulpină cu potențial probiotic major (Krawczyk B. et al., 2021; Im E.J. et al., 2023). Unele tulpini de enterococi, în particular de *E. faecalis* și *E. faecium*, sunt utilizate în calitate de probiotice și aditivi alimentari (Becquet P., 2003, Araújo T.F., de Luces Fortes Ferreira C.L., 2013; Hanchi H. et al., 2018). Tulpinile enterococice, cum ar fi *E. faecium* M74 și *E. faecium* SF-68, sunt incluse ca suplimente alimentare în mai multe preparate probiotice care s-au dovedit a fi eficiente și sigure, cum ar fi FortiFlora® și Cernivet® (care conțin *E. faecium* SF68®, Cerbios-Pharma SA, Elveția) (Krawczyk B. et al., 2021). Utlizarea enterococilor ca probiotice vizează mai multe domenii, cum ar fi industria farmaceutică, în calitate de medicamentele de uz uman și veterinar și industria alimentară. Probioticile de origine enterococică ar putea fi implementate în producția de alimente funcționale, întrucât unele tulpini de enterococi au fost utilizate ca declanșatori în fermentarea alimentelor.

Atunci când se selectează o tulpină probiotică enterococică, ar trebui să se ia în considerare o serie de proprietăți care implică aspectul de siguranță și trăsăturile funcționale și

benefice. Deoarece efectul probiotic depinde de tulpină, aceasta ar trebui să fie astfel bine caracterizată (fenotipic și genotipic) și trebuie să fie sigură și lipsită de orice patogenitate, cum ar fi absența factorilor de virulență și a genelor AR dobândite (Im E.J. et al., 2023). Caracteristicile dezirabile pentru tulpinile probiotice includ, de asemenea, capacitatea de a supraviețui și de a-și păstra viabilitatea în condițiile dificile ale tractului gastrointestinal la subiecții sănătoși (pH scăzut, pepsină, pancreatină, săruri biliare), incapacitatea lor de a transloca mucoasa intestinală, sensibilitatea lor la uciderea fagocitară și capacitatea de a produce substanțe antimicrobiene, cum ar fi enterocinele. O altă trăsătură considerabilă pentru potențialele probiotice enterococice este că acestea ar trebui să aibă o capacitate limitată de a-și modifica ADN *in vivo* (Krawczyk B. et al., 2021; Im E.J. et al., 2023).

Cerințele față de enterococi ca probiotice trebuie să ia în calcul următoarele trăsături:

- nemijlocit asociate celulei bacteriene (organisme vii, rezistență la sucul gastric și acizii biliari, avirulență, fără rezistență la antibiotice și elemente genetice mobile, fără receptori pentru bacteriofagi);
- bacteriene asociate tractului digestiv (metabolism activ în sistemul digestiv, relație adecvată cu bacteriile comensale, colonizare eficientă, receptori competitivi cu bacteriile patogene, abilitate de a produce substanțe antimicrobiene (enterocine);
- asociate produsului comercial finit (identificare la nivel de gen, specie, tulpină; tulpini depuse în colecții ale microorganismelor public accesibile; să fie secvențiată și documentată expresia genelor; stabilitate genetică; fără efecte patogenice, invazive și carciogenice; nivelul de doză corespunzător cu descripția respectivă; consum pur confirmat; viabilitate și stabilitate la păstrare; test privind susceptibilitatea la antibiotice; controlul tulpinilor la virulență) (Krawczyk B. et al., 2021)

Una dintre caracteristicile care se aplică la selectarea microorganismelor probiotice este aderența la mucoasa intestinală. Capacitatea de aderență a *E. faecalis* și *E. faecium* la mucoasa intestinală a fost studiată la unele animale agricole și domestice. Astfel, tulpina *E. faecium* WEFA23, izolată din masele fecale ale sugarilor din China, este capabilă să excludă sau să deplaseze aderența bacteriilor de *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* ATCC 13311, *L. monocytogenes* CMCC54007, *St. aureus* CMCC26003 și *Sh. sonnei* ATCC 25931 la celulele Caco-2 (He Y. et al., 2019).

Este cunoscut faptul că în selecția probioticelor se ia în considerare rezistența tulpinilor la sucul gastric și la sărurile biliare și producția de compuși antimicrobieni (bacteriocine) (Franz C. et al., 1999; Araújo T.F., de Luces Fortes Ferreira C.L., 2013). Tulpina de *E. faecium* OV3-6 cu proprietăți de probiotice și peptidele sale active secretate sunt capabile să supraviețuiască în

condiții de simulare gastrică și ale intestinului subțire (Choeisoongnern T. et al., 2021). Această tulpină denotă capacitate de α-hemoliză, este sensibilă la majoritatea antibioticelor relevante din punct de vedere clinic, reduce aderența *E. coli* și *S. typhimurium* pe celulele Caco-2 și poate împiedica multiplicarea tulpinilor Gram-pozitive, ce aparțin genurilor *Bacillus, Carnobacterium, Listeria* și *Staphylococcus* (Choeisoongnern T. et al., 2021).

În același timp, utilizarea anumitor tulpini de microorganisme ca probiotice este reglementată de organismele de decizie respective. Astfel, EFSA a stabilit că enterococii nu îndeplinesc statutul de „prezență calificată de siguranță" (Becquet P., 2003; Wang X. et al., 2020). Niciun probiotic de origine enterococică nu a fost aprobat de către Administrația pentru Alimente și Medicamente (FDA) din SUA pentru tratamentul, vindecarea sau ameliorarea bolilor umane, iar tulpinile de enterococi utilizate sau propuse pentru utilizare ca probiotice ar trebui să fie examinate cu atenție pentru eficacitate și siguranță (Wang et al., 2020). Cu toate acestea, *E. faecium* este încă utilizat ca supliment alimentar în SUA și China și are denumirea comună de „microorganisme destinate hrănirii directe" (Wang et al., 2020).

În ceea ce privește reglementarea privind hrana pentru animale, Agenția Europeană pentru Standarde Alimentare (EFSA) a autorizat anumite tulpini de enterococi pentru utilizarea lor ca aditivi pentru însilozare și suplimente alimentare. De exemplu, unele probiotice enterococice au fost incluse în grupul de aditivi furajeri pentru stabilizarea comunităților microbiene din tractul digestiv atât la animalele monogastrice, cât și la rumegătoare (Krawczyk B. et al., 2021). Tulpinile de *E. faecium* NCIMB 11181 și *E. faecium* DSM 7134 au fost aprobate ca aditivi furajeri pentru viței și purcei de către EFSA. Probioticele *E. faecium* SF68® și *E. faecalis* Symbioflor 1 sunt, de asemenea, utilizate pentru a preveni sau trata diareea la porci, păsări de curte, animale de fermă și animale de companie (Nowakiewicz A., et al., 2017). S-a constatat că hrănirea porcilor cu un probiotic de origine *Enterococcus* spp a redus agenții patogeni intestinali (Krawczyk B. et al., 2021). De asemenea, administrarea orală de *E. faecium* NHRD IHARA la purcei după înțărcare a crescut nivelul seric și fecal de IgA și a îmbunătățit creșterea acestora (Jahan M. et al., 2015). La pui, s-a demonstrat că *E. faecium* îmbunătățește creșterea, morfologia intestinală și homeostazia microbiotei cecale (Tran T. et al., 2018). De asemenea, s-a raportat că *E. faecium* îmbunătățește eficiența metabolică și reduce răspunsurile inflamatorii la puii de fermă, iar numeroase studii au demonstrat efectele benefice ale enterococilor în acvacultură (Krawczyk B. et al., 2021).

În prezent, doar un număr limitat de probiotice enterococice sunt comercializate, în special, din cauza lipsei de informații privind siguranța lor și a actelor normative ce reglementează aplicarea lor. De menționat, că enterococii nu au obținut încă statutul GRAS. Cu

toate acestea, unele tulpini enterococice (producătoare de enterocină) bine caracterizate sunt utilizate ca culturi starter, starteri adjuncți, culturi protectoare, coculturi sau culturi protectoare în industria alimentară și/sau probiotice datorită unor trăsături pozitive (Im E.J. et al., 2023).

Totuși, după cum a fost menționat anterior, reprezentanții enterococilor sunt implicați în mai multe infecții nosocomiale din cauza factorilor de virulență și a rezistenței la antibiotice. Astfel, dezvoltarea de noi probiotice enterococice necesită o evaluare strictă în ceea ce privește aspectele de siguranță pentru selectarea unor tulpini enterococice inofensive (Ben Braïek O. și Smaoui S., 2019). Eficacitatea și siguranța microorganismelor ca probiotice, inclusiv a enterococilor, ar trebui să se bazeze pe studii riguroase care să dezvăluie toate aspectele acțiunii bacteriilor investigate. În acest scop, tehnicile științifice moderne, cunoștințele actualizate despre enterococi și proprietățile acestora ca bacterii comensale, punerea în aplicare a unor criterii adecvate de selectare a tulpinilor benefice și o legislație corespunzătoare ar permite de a face diferența între tulpinile enterococice patogene și cele sigure și, astfel, ar contribui la valorificarea mai mare a enterococilor în calitate de bacterii benefice cu potențial probiotic înalt, la fel ca alte tulpini LAB. Aceste măsuri ar trebui să fie completate de o utilizare mai prudentă a antibioticelor în medicamentele de uz uman și veterinar și de un control strict privind prezența enterococilor în mediul înconjurător și în sursele alimentare pentru a preveni sau limita răspândirea tulpinilor enterococice patogene.

De menționat că până în prezent, nu au fost raportate cazuri de boli cauzate de enterococi probiotici care sunt în prezent comercializați, cum este cazul *E. faecium* SF68 și *E. faecalis* Symbioflor, ceea ce reprezintă un indiciu important al siguranței acestor tulpini probiotice enterococice (Franz C.M. et al., 2011).

1.6. Concluzii la capitolul 1

Analiza informației din literatura de specialitate privind rolul microbiotei intestinale, inclusiv și a bacteriilor din genul *Enterococcus* a permis formularea următoarelor poziții:

1. Microbiota intestinală are multiple funcții, fiind implicată în diverse procese fiziologice cu rezonanță asupra întregului organism – reglarea homeostaziei, metabolism, absorbția nutrienților vitali și sinteza substanțelor biologic active, formarea imunității, menținerea integrității barierelor și structurii intestinale, ce protejează organismul de agenți nocivi, precum și în funcționarea sistemului nervos și influențarea comportamentului.

2. Microbiota intestinală a dezvoltat pe parcursul coevoluției sale cu organismele gazdelor mecanisme de coexistență benefică (comensalism), care pentru fiecare individ în parte se stabilesc pe parcursul dezvoltării postnatale, prin colonizarea oportună cu anumiți

reprezentanți microbieni și prin formarea nișelor prielnice de existență pentru anumite grupe de microorganisme, care au cele mai mari beneficii pentru organism la acel moment.

3. Formarea microbiocenozelor intestinale la anumite perioade de viață este influențată de factorii intrinseci și extrinseci, depinde de vârsta organismului și de mediul de viață, iar compoziția microbiotei intestinale și succesiunea de microorganisme în segmentele tubului digestiv pot fi asociate principiilor stocastice, care în general determină tendințele de formare a ecosistemelor. Cunoașterea acestor principii ar permite de a analiza mai amplu și de a explica modificarea microbiotei intestinale în funcție de statutul fiziologic al organismului, de acțiunea factorilor de mediu și de a elucida mecanismele ce declanșează patogeniile.

4. Interacțiunea microbiotei cu organismul este complexă și se bazează pe o rețea de mecanisme genetice, metabolice, imunologice, hormonale, neurologice și de semnalizare intercelulară, care determină beneficiile comune participanților, în special, pentru sănătatea gazdei, iar descifrarea acestor mecanisme va permite de a elabora abordări absolut noi în terapia multiplelor boli asociate microbiomului.

5. Enterococii reprezintă un grup destul de controversat de bacterii, întrucât pe de o parte sunt bacterii comensale a microbiotei umane, aducând beneficii tubului digestiv și organismului în întregime, iar pe de altă parte sunt identificați ca agenți patogeni oportuniști nosocomiali. Progresele recente în epidemiologia moleculară bazate pe amprenta moleculară, tiparea secvenței multilocus, studiile fenotipice și analizele genomului întreg aduc dovezi suplimentare că tulpinile nosocomiale de *Enterococcus* sunt diferite genotipic de tulpinile comensale.

6. Enterococii au proprietatea de a crea pe parcursul colonizării tubului digestiv relații simbiotice cu alte bacterii și cu organismul-gazdă, ceea ce manifestă rol protector în reglarea homeostaziei colonului în timpul dezvoltării, iar în calitate de bacterii comensale au un rol important în metabolismul și sănătatea omului și animalelor, prin promovarea aportului de nutrienți, formarea și menținerea funcției barierei intestinale, ceea ce previne colonizarea tubului digestiv de către agenții patogeni și contribuie la modelarea și menținerea imunității intestinale normale.

7. Rolul benefic al enterococilor este dovedit și prin capacitatea acestora de a produce substanțe cu acțiune antibacteriană numite enterocine, care datorită acțiunii antagoniste față de diverși microbi patogeni și a activității sinergice cu alte bacteriocine și antibiotice ar putea fi utilizate în tratamentul infecțiilor nosocomiale.

8. În baza proprietăților enumerate ale enterococilor au fost evidențiate și caracterizate mai multe tulpini de enterococi cu potențial probiotic, fiind documentare efectele benefice ale

acestora pentru sănătate: ameliorarea simptomelor sindromului colonului iritabil și a diareii induse de antibiotice și prevenirea diferitor boli intestinale funcționale și cronice, acțiune antimutagenică, anticancerigenică, hipocolesterolemică și de fortificare a imunității.

9. Selectarea tulpinilor enterococice cu acțiune probiotică trebuie să se bazeze pe o serie de proprietăți, care implică, pe lângă trăsăturile funcționale și benefice, și aspectul de siguranță ce ar exclude orice aspect de patogenitate, cum ar fi absența factorilor de virulență și o capacitate limitată de a-și modifica ADN *in vivo*.

10. Punerea în aplicare a unor criterii adecvate de selectare a tulpinilor benefice și o legislație corespunzătoare ar permite de a face diferența între tulpinile enterococice patogene și cele sigure și, astfel, ar contribui la valorificarea mai mare a entrococilor în calitate de bacterii benefice cu potențial probiotic înalt, la fel ca alte tulpini LAB.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Cercetările au vizat investigarea incidenței microorganismelor de enterococi în diferite obiecte biologice cu statut fiziologic diferit, fiind utilizate metode și teste microbiologice clasice privind izolarea în cultură pură, identificarea și selectarea microorganismelor, cu respectarea regulilor pentru examenele microbiologice, conform SM SR ISO 7218 și a principiului de utilizare a microorganismelor cu potențial biologic natural nepatogen (nemodificate genetic).

Utilizarea datelor privind enterococii din experimentele care au fost realizate anterior demarării programului de doctorat, a fost preconizată în proiectul de doctorat în cauză, elaborat, depus și câștigat de către dr.hab., prof.cerc. Maria Timoșco.

2.1. Material de studiu

Drept obiect de studiu au servit tulpinile de enterococi. Enterococii fac parte din domeniul Bacteria, tipul Firmicutes, clasa Bacilli, ordinul Lactobacillales, familia Enterococcaceae (Ludvig W. et al., 2009). Genul *Enterococcus* este reprezentat de bacterii Gram-pozitive, nesporulante, facultativ anaerobe, care au formă ovoidală sau sferică și pot apărea în frotiuri în lanțuri scurte, perechi sau celule unice. Dimensiunea celulelor este de 0,6-2,0 × 0,6-2,5 μm. Enterococii se caracterizează printr-un metabolism fermentativ. Bacteriile realizează o fermentație lactică homoenzimatică a unei varietăți de carbohidrați pentru a forma acid lactic L(+), dar nu și gaz, și, prin urmare, sunt clasificate ca microorganisme acidolactice și sunt capabile să se dezvolte la concentrații de NaCl de până la 6,5% și de bilă de până la 40%, la pH 9,6, în intervalul de temperatură 10-45 °C, rezistent la 0,4% azidă de sodiu. Condițiile optime de cultivare pentru enterococi reprezintă diapazonul de 35-37°C și pH 7,5 (Bergey D.H., Holt J.G., 1994).

Pentru izolarea și cultivarea enterococilor se utilizează medii diferențiale selective. În figura 2.1. este reprezentată creșterea enterococilor pe mediul cu bilă-esculin azid agar. Selectivitatea acestui mediu se bazează pe prezența azidei de sodiu, care inhibă bacteriile Gram-negative și prezența bilei, care inhibă bacteriile Gram-pozitive, cu excepția grupului de enterococi. Diferențierea grupului de enterococi se bazează și pe capacitatea acestora de a hidroliza esculina. Hidroliza esculinei induce producerea de 6,7-dihidroxicumarin, ce reacționează cu ionii de fier (III) pentru a forma un compus de culoare neagră ce difuzează în mediu.

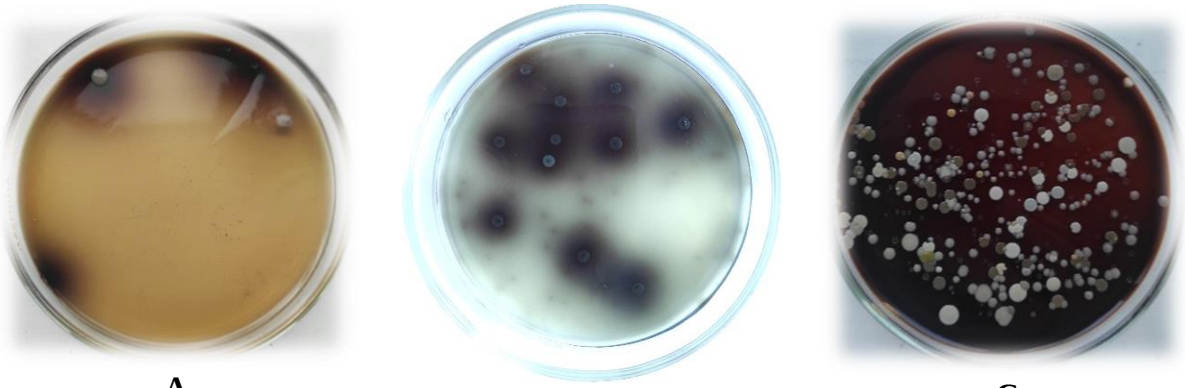


Figura 2.1. Cultivarea enterococilor pe mediul nutritiv cu bilă-esculin și azid agar
(Autor foto: Bogdan V.)
(**Legenda**: **A** –cutia Petri cu mediu nutritiv solid pe care au crescut până la 10 colonii; **B** – cutia Petri cu mediu nutritiv solid pe care au crescut până la 100 colonii; **C** –cutia Petri cu mediu nutritiv solid pe care au crescut mai mult de100 colonii)

Pe acest mediu, care este inițial galben-maroniu, se formează un halou negru în jurul micilor colonii de enterococi. Astfel de zone de întunecare nu se formează în jurul coloniilor de alte microorganisme. Iar, dacă numărul de enterococi din cultură este foarte mare, întreaga cupă devine neagră.

Cercetările științifice au fost efectuate în condiții *in vitro* (cu utilizarea mediilor nutritive elective pentru fiecare gen de microorganisme) și *in vivo* pe diferite obiecte biologice, după cum urmează:

- subiecți umani (copii cu vârsta de 1-16 ani și adulți cu vârsta de până la 50 de ani și după 50 de ani);
- animale agricole (purcei, viței, pui de găină);
- animale de laborator (șoareci albi – *specia Muridae mus*; șobolani albi de laborator linia Wistar – *specia Rattus albicans* și cobai – *Cavia porcellus*).

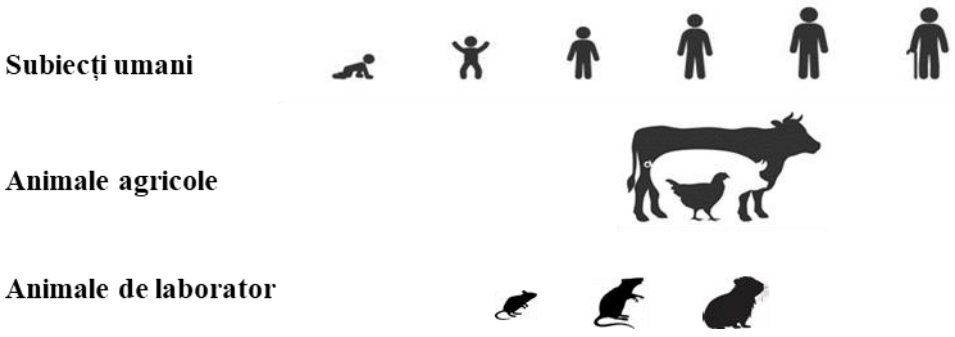


Figura 2.2. Obiectele biologice la care a fost investigată incidența enterococilor (original)

Animalele de laborator menționate reprezintă modele clasice de investigare a microbiotei intestinale și ale aspectelor fiziologice ale tubului digestiv.

Experimentele ce au vizat prelevarea probelor de la subiecții umani și de la animalele agricole, pe șoareci albi și pe cobai au fost efectuate în cadrul proiectului 09.816.09.07A „*Elaborarea și testarea noilor remedii medicamentoase pentru menținerea coordonată a bacteriocenozei intestinale la nivel sanogen"*, realizat în cadrul Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie, iar autorul tezei a fost executant în cadrul proiectului.

2.2. Metode de izolare și determinare cantitativă a enterococilor

2.2.1. Izolarea, identificarea și determinarea tulpinilor pure de microorganisme luate în studiu

În cercetări au fost utilizate metode și teste microbiologice clasice privind izolarea de cultură pură, identificarea și selectarea microorganismelor, în modificare după Bogdanov V. (1959), Bannikova L. (1975) și metode de identificare, conform Bergey (Bergey D.H., Holt J.G., 1994), cu respectarea regulilor pentru examenele microbiologice, conform SM SR ISO 7218 (2015).

Izolarea tulpinilor pure de microorganisme – enterococi, bifidobacterii, lactobacterii (lactobacili) și *Escherichia* – din mostrele pregătite pentru cercetare, a fost efectuată din probele de conținut intestinal de la subiecții umani și de la animale (mase fecale). Pe baza mai multor studii, masele fecale sunt recomandate pentru studiul microbiotei intestinale, deoarece este o alternativă utilă pentru analiza microbilor intestinali și oferă o evaluare adecvată a acestora (Videvall et al., 2018; Berlow et al., 2019; Garcia-Mazcorro et al., 2021).

Evidențierea a indicilor cantitativi ai bacteriocenozei tubului digestiv a fost realizată prin inocularea coloniilor incluse pe cutii Petri cu medii nutritive semifluide și fluide, sterile și selective pentru fiecare gen de bacterii în parte. Ulterior, au fost identificate conform cerințelor determinatorului Bergey (Bergey D.H., Holt J.G., 1994).

Procesul detaliat de izolare și identificare a bacteriilor vizate în studiu este descris mai jos.

Pregătirea mostrei

La prima etapă are loc extragerea materialului microbiologic din masele fecale. Inițial au fost colectate mase fecale de la subiecții enumerați, apoi s-a cântărit câte 1,0 g de conținut intestinal (mase fecale), care s-a transferat în eprubeta cu 9 ml de soluție fiziologică de clorură de sodiu (0,9% soluție de NaCl), astfel se obține diluția de 10^{-1}. În continuare se luat 1 ml de

suspensie din eprubeta cu prima diluție și s-a adăugat în eprubeta cu 9 ml de soluție fiziologică de clorură de sodiu (0,9% soluție de NaCl), obținând diluția de 10^{-2}.

Procedura de pregătire urmează și se repetă până la obținerea diluției de 10^{-7}-10^{-9} în funcție de bacteriile investigate. Eprubetele se supun agitării ofensive, obținând distribuțiile respective (de la 10^{-1} până la 10^{-7}-10^{-9}) și o distribuire egală a mostrei (GOST 30518-1997).

Fiecare diluție se introduce în cutii Petri cu mediu nutritiv pregătit conform standardului GOST 30518-1997. Soluția fiziologică de 0,9% NaCl, pH=6,6-7,0 a fost utilizată pentru toate diluțiile efectuate.

La următoarea etapă au fost evidențiate microorganismele (tulpinile) pe mediile nutritive în scopul determinării cantitative a lor.

Izolarea, identificarea și determinarea cantității enterococilor.

Conținutul de enterococi s-a determinat în două repetări paralele. Din eprubetele cu diluțiile mostrei de 10^{-5}, 10^{-6} și 10^{-7}, cu pipeta câte 1,0 ml de suspensie microbiană, se transferă în fiecare cutie Petri cu 10-15 ml de mediu nutritiv – Agar cu bilă-esculin și azid agar. Cutiile Petri cu mostra inoculată se supun incubării în condiții aerobe la temperatura de (37±1) ºC timp de 24-48 de ore. După expirarea termenului de incubare se numără coloniile crescute pe cutiile Petri (GOST 30518-1997).

Mediul cu bilă-esculin și azid agar este o măsură preventivă utilizată pentru izolarea enterococilor, comercializat în formă uscată de pulbere, care se adaugă în cantitate de 56,65 g la 1000 ml de apă distilată, se amestecă minuțios, se fierbe până la dizolvarea finită și se ajustează pH-ul de 6,8-7,0 prin adăugarea soluției de 0,1n NaOH sau HCl (Tabelul 2.1).

Tabelul 2.1. Componența mediului nutritiv cu bilă-esculin și azid agar (Compania Himedia M4931)

Nr. ord.	Denumirea componentului	Cantitatea (g)
1	Hidrolizat enzimatic de cazeină	17,00
2	Peptonă proteozică	3,00
3	Extract de carne	5,00
4	Oxgall (preparat din billă)	10,00
5	Clorură de sodiu	5,00
6	Esculin	1,00
7	Citrat fieric de amoniu	0,50
8	Azid de sodiu	0,15
9	Agar	15,00
10	pH final (la 25 ºC) = 7,1±0,2	

În cazul lipsei mediului nutritiv în formă de pulbere pregătirea lui se realizează în felul următor: toți componenții nominalizați se dizolvă într-un litru de apă distilată, minuțios se

amestecă, se fierbe până la dizolvarea finită și se ajustează pH-ul de 6,8-7,0 prin adăugarea soluției de 0,1n NaOH sau HCl. Sterilizarea se efectuează în autoclav la 1,1atm (121 ºC) timp de 15 min.

Izolarea, identificarea și determinarea cantității de bifidobacterii.

Numărul total de bifidobacterii se determină în două repetări paralele. Din eprubetele cu diluțiile mostrei de $10^{-5,}$ 10^{-6} și 10^{-9}, cu pipeta se transferă în fiecare cutie Petri câte 1,0 ml de suspensie microbiană. Se adaugă 10-15 ml de mediu nutritiv – *Bifidobacterium* Agar cu temperatura de 45 ºC și se lasă până la răcire. După aceasta, cutiile Petri cu mostra inoculată se supun incubării în condiții anaerobe la temperatura de (37±1) ºC timp de 24-48 de ore. După expirarea termenului de incubare se numără coloniile crescute pe cutiile Petri cu mediul nutritiv electiv respectiv (GOST 30518-1997).

Tabelul 2.2. Componența mediului nutritiv agar *Bifidobacterium* (Compania Himedia M1396)

Nr. ord.	Denumirea componentului	Cantitatea (g)
1	Peptonă specială	23,00
2	Clorură de sodiu	5,00
3	Glucoză	5,00
4	Amidon solubil	1,00
5	Hidroclorid de L-cisteină	0,30
6	Agar	15,00
7	pH final (la 25 ºC) = 6,8±0,2	

Mediul nutritiv Agar *Bifidobacterium* este comercializat în formă uscată de pulbere, care se adaugă în cantitate de 49,3 g la 1000 ml de apă distilată, se amestecă minuțios, se fierbe până la dizolvarea completă și se ajustează pH-ul de 6,8-7,0 prin adăugarea soluției de 0,1 n NaOH sau HCl. În cazul lipsei mediului nutritiv în formă de pulbere pregătirea lui se realizează în felul următor: toți componenții nominalizați se dizolvă într-un litru de apă distilată, minuțios se amestecă, se fierbe până la dizolvarea finită și se ajustează pH-ul de 6,8-7,0 u.c prin adăugarea soluției de 0,1n NaOH sau HCl. Sterilizarea se efectuează în autoclav la 1,1atm (121 ºC) timp de 15 min.

Izolarea, identificarea și determinarea cantității de lactobacili (lactobacterii). Numărul total de lactobacili se determină în două repetări paralele. Din eprubetele cu diluțiile de 10^{-5}, 10^{-6} și 10^{-9}, cu pipeta câte 1,0 ml de suspensie microbiană se transferă în fiecare cutie Petri și se adaugă 10-15 ml de mediu nutritiv – agar MRS. Cutiile Petri cu mostra inoculată se supun incubării în condiții anaerobe la temperatura de (37±1) ºC timp de 48-72 de ore. După expirarea termenului de incubare se numără coloniile crescute pe cutiile Petri cu mediul nutritiv electiv respectiv (GOST 30518-1997).

Tabelul 2.3. Componența mediului nutritiv agar MRS (Compania Himedia M641)

Nr. ord.	Denumirea componentului	Cantitatea (g)
1	Peptonă proteică	10,00
2	Extract de carne de vită	10,00
3	Extract de drojdie	5,00
4	Dextroză	20,00
5	Polisorbat 80	1,00
6	Acetat de sodiu	15,00
7	Citrat de amoniu	2,00
8	Acetat de sodiu	5,00
9	Sulfat de magneziu	0,1
10	Sulfat de mangan	0,05
11	Fosfat dipotasic	2,00
13	Agar	20,00
14.	pH final (la 25ºC) = 5,4±0,2	

Mediul nutritiv agar MRS este comercializat în formă uscată de pulbere, care se adaugă în cantitate de 67,15 g la 1000ml de apă distilată. Se încălzește până la fierbere pentru a dizolva complet mediul. Se sterilizează prin autoclavare, la o presiune de 15 atm (121 °C) timp de 15 minute. Se amestecă bine și se toarnă în cutii Petri sterile.

Izolarea, identificarea și determinarea cantității de escherichii. Numărul de esherichii se determină în două probe paralele. Inițial se pregătesc diluțiile de 10^{-2} și 10^{-7} prin dizolvarea a 1,0 g de conținut intestinal testat în 9 ml de soluție fiziologică de NaCl (0,9% NaCl). Din eprubetele cu diluțiile mostrei de 10^{-2} - 10^{-7}, cu pipeta câte 1,0 ml de suspensie microbiană, se transferă în fiecare din două cutii Petri cu 10-15 ml de mediu nutritiv – agar Endo. Cutiile Petri cu mostra inoculată se supun incubării în condiții aerobe la temperatura de 37±1 ºC timp de 24 de ore. După expirarea termenului de incubare se numără coloniile crescute în cutiile Petri cu mediul nutritiv electiv respectiv (GOST 30518-1997).

Tabelul 2.4. Componența mediului nutritiv agar Endo (Compania Himedia M029R)

Nr. ord.	Denumirea componentului	Cantitatea (g)
1	Peptonă specială	11,50
2	Lactoză	12,90
3	Clorură de sodiu	3,60
4	Hidrofosfat de potasiu	0,48
5	Dihidrofosfat de potasiu	0,22
6	Laurisulfat de sodiu	0,01
7	Fuxină bazică	0,83
8	Agar	19,00
9	pH final (la 25ºC) = 7,3±0,2	

Mediul nutritiv agar Endo este comercializat în formă uscată de pulbere, care se adaugă în cantitate de 40,00 g la 1000 ml de apă distilată, se încălzește până la fierbere și dizolvarea finită, se ajustează pH-ul de 7,3-7,4 cu adăugarea soluției de 0,1n NaOH sau HCl. În cazul lipsei mediului nutritiv în formă de pulbere pregătirea lui se realizează în felul următor: toți componenții nominalizați se dizolvă într-un litru de apă distilată, minuțios se amestecă, se supune încălzirii până la fierbere și dizolvare, finită apoi se ajustează pH-ul de 7,3-7,4 prin adăugarea soluției de 0,1n NaOH sau HCl. Sterilizarea se efectuează în autoclav la 1,1 atm (121 ºC) timp de 15 min.

2.2.2. Cuantificarea tulpinilor de bacterii investigate

Conținutul de microorganisme a fost determinat prin metode microbiologice clasice (Гармашева И.Л., 2011). Fiecare grup de microorganisme a fost studiat și numărat separat.

Pentru determinarea numărului de celule microbiene viabile după inocularea și incubarea acestora pe mediu nutritiv, selectiv pentru fiecare specie de microorganism. Numărul de bacterii viabile în 1 g de conținut intestinal este determinat prin formula:

X = a·10n, unde

X - este numărul de indivizi viabili în 1 g de conținut intestinal;

a - numărul de colonii din ultima cutie Petri în care se înregistrează creșterea;

n - este gradul de diluare.

Activitatea de creștere bacteriană a fost determinată prin numărarea unităților formatoare de colonii (UFC) pe plăci Petri după diluții succesive. Numărul de UFC este exprimat în logaritmi zecimali (lg 10).

Calculul numărului de celule viabile.

Pentru aflarea numărului de germeni viabili s-a utilizat formula de calcul: UFC / ml = numărul de colonii x (coeficientul diluției) x 10x / (volumul suspenziei utilizate – 1 ml). Viabilitatea a fost calculată conform formulei BSR = (lgBL/lgAL) × 100, unde BSR este viabilitatea tulpinii în %, lgBL – logaritmul numărului UFC până la liofilizare și lgAL – logaritmul numărului UFC după liofilizare sau păstrare. Viabilitatea tulpinii după liofilizare în % VB = (lgDL / lgÎL) × 100, unde: VB este raportul logaritmului numărului de celule prezente în suspensie DL la numărul de celule viabile ÎL înmulțit cu 100%. (Золотилова Г.Д., 2004; Нетрусов А.И., 2005).

Testele au fost efectuate în 3 repetări (SM EN ISO 4833-:2014). Cantitatea celulelor microbiene a fost raportată la 1g de conținut intestinal sau la 1 ml de suspensie și exprimată în logaritmi zecimali (lg).

2.3. Descrierea schemelor experimentelor ce au vizat studiul aspectelor fiziologice ale enterococilor

În procesul experimental au fost respectate cerințele și principiile de montare a experimentelor științifice. Experimentele pe animale au fost realizate în conformitate cu Directiva 86/609/CEE din 24 noiembrie 1986 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și au fost aprobate de Comisa metodică și de Comisia etică ale Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova.

2.3.1. Studierea incidenței enterococilor la subiecți umani și la animale

În scopul identificării efectivului enterococilor în funcție de specie au fost prelevate probe de mase fecale de la diferite categorii de animale (Timoșco M., 1990):

- animale domestice de companie (câine, pisică);
- animale de interes economice (agricole) (porcine, cabaline, ovine, bovine, iepuri, păsări);
- animale de laborator (șoareci albi, șobolani albi de laborator linia Wistar, cobai);
- animale sălbatice (hârciog, maimuță, nurcă);
- păsări sălbatice (fazan, lebădă neagră, rață sălbatică).

Datele la păsările sălbatice au fost obținute în anul 2023 (Vrabie V., 2023).

Acțiunea mediului de trai a fost realizată pe diferite specii de păsări din mediul rural, urban și în condiții de îngrijire specială (grădina Zoologică din Chișinău și o gospodărie individuală, s. Tohatin, mun. Chișinău). Drept obiect de studiu au fost:

- porumbelul de casă (*Columba livia* f. domestica);
- malardul (rața sălbatică, specia *Anas platyrhynchos*);
- porumbei de rasă (rasa Creț francez);
- rața mută (lețească).

Incidența și nivelul cantitativ al enterococilor în dependență de vârstă și starea sănătății tubului digestiv a fost efectuată pe două grupe de subiecți (Timoșco M. și al., 2011; Timoșco M. și al., 2015):

- subiecți umani de diferită vârstă: copii cu vârstă de până la 1 an; 1-16 ani; adulți cu vârsta cuprinsă de la 20 până la 80 de ani);
- animale agricole de vârstă juvenilă: purcei cu vârsta de la 30 de zile până la 135 de zile; viței cu vârsta de la 10 până la 30 de zile; și pui cu vârsta de la 10 până la 30 de zile).

Subiecții cercetați au fost divizați în câte 3 loturi:

Lotul I – subiecți sănătoși;

Lotul II – cu dismicrobism intestinal, prin cazurile prezenței schimbărilor neesențiale ale indicilor cantitativi ai enterococilor intestinali;

Lotul III – cu disfuncții intestinale diareice, prezența schimbărilor considerabile ale valorilor numerice a enterococilor intestinali și simptomelor de dereglări funcționale ale tubului digestiv în formă de diaree.

2.3.2. Studierea influenței rației alimentare asupra efectivului de enterococi

Pentru a elucida modificările enterococilor intestinali induse de statutul metabolic al tubului digestiv, urmare a administrării rațiilor alimentare au fost realizate trei serii de experimente. Experimentele au fost efectuate pe animale de laborator – șobolani albi linia Wistar și pe cobai.

Experimentul 1

În prima serie de experimente a fost studiată acțiunea rației alimentare de diferită valoare nutritivă. În aceste rații, nutrienții de bază – proteinele, lipide și carbohidrații au fost administrați în exces. Valoarea (%) a nutrienților este redată în tabelul de mai jos.

Tabelul 2.5. Raportul procentual al nutrienților de bază în rațiile alimentare de diferită valoare nutritivă

Indicii de bază	**Rațiile alimentare testate, conform concentrației nutrienților, %.**			
	Rația standard	***Rația cu exces de proteine***	***Rația cu exces de lipide***	***Rația cu exces de glucide***
Proteine	14,88	24,14	11,66	13,4
Lipide	2,9	13,1	36,44	2,11
Glucide	82,2	62,7	51,9	84,5

Sursa macronutrienților a constituit:

Proteine	**Lipide**	**Carbohidrați**
Oul (albușul) Carnea de pui	Untura de porc	Pâinea

Pentru a evidenția impactul rațiilor alimentare de diferită valoare nutritivă, animalele experimentale au fost divizate în două loturi:

I. Lotul martor – în care animalele au fost hrănite cu rația standard;

II. Lotul experimental – în care animalele au primit respectiv rațiile descrise mai sus.

Analiza efectivului enterococilor a fost realizată în dinamică:

- inițial administrării rației alimentare;
- după 5 zile, 10 zile și 15 zile de administrare a rațiilor alimentare;
- după 7 zile de restabilire la rația standard de alimentare a șobolanilor în condiții de laborator.

Testarea rațiilor (cu exces de proteine, de lipide și carbohidrați) a fost efectuată individual pe fiecare animal (fără totalizarea datelor de la animalele experimentale). Pentru aceasta fiecare animal a fost ținut în cuști separate, iar pe parcursul experimentului a fost hrănit cu rația stabilită. Animalele din lotul martor au fost hrănite cu rația standard pentru șobolanii albi de laborator. Pentru testarea rațiilor cu exces de proteine, lipide și carbohidrați de fiecare dată au fost utilizate animale diferite. Acest principiu de testare a fost aplicat din considerentele reacției individuale a organismului la acțiunea factorului alimentar.

Experimentul 2

În a doua serie de experimente a fost investigată acțiunea rațiilor alimentare experimentale de diferită structură calorică, elaborate în cadrul proiectului 15.817.04.01A „Alimentația în raport cu tipurile constituției. Impactul alimentației asupra sanogenității gameților masculini” (2015-2019) la Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie, conducător de proiect dr. hab., conf. cerc. Tudor Strutinschi.

Au fost concepute 6 rații alimentare, în care nutrienții de bază nu sunt în exces, dar prezintă deosebiri graduale (de majorare sau micșorare) a valorii procentuale a proteinelor, lipidelor și glucidelor (Tabelul 2.6).

Tabelul 2.6. Structura calorică a rațiilor elaborate (%) testate pe șobolani

Indicii de bază	**Variante de rații alimentare**					
	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***
Proteine	8	9	10	11	12	14
Lipide	35	33	31	29	27	25
Carbohidrați	57	58	59	60	61	61

Acțiunea rațiilor asupra valorilor enterococilor (și a altor bacterii) a fost testată în condiții *in vitro* și *in vivo*.

Primul experiment, realizat *in vitro*, a avut drept scop evidențierea rațiilor, care au cel mai pronunțat efect (fie negativ, fie pozitiv) asupra dezvoltării și multiplicării enterococilor. Acest experiment a inclus șapte loturi, fiind testate cele 6 rații alimentare noi, după cum urmează:

Lotul I – martor, în care inocularea enterococilor s-a efectuat separat pe mediul nutritiv cu bilă esculin și azid agar;

Loturile II-VII – loturi experimentale, în care inocularea enterococilor s-a efectuat împreună cu decoctul a șase rații alimentare (tabelul 2.6.).

Experimentul realizat *in vitro*, a prevăzut testarea rațiilor, selectate preventiv în experimentul *in vivo*, cu cel mai pronunțat efect asupra multiplicării enterococilor pe animale de laborator (șobolani albi, linia Wistar).

Structura experimentului este următoarea:

Lotul I – martor (administrarea rației alimentare nr. 1);

Loturile II-VII – experimentale (administrarea rațiilor alimentare nr. 4, 5 și 6).

Experimentul 3

Rații de diferită structură calorică au fost studiate pe animale model de laborator – cobai, întrucât mediul intestinal la aceste animale este mai apropiat de cel uman și permite de a extrapola datele obținute pe subiecții umani.

Rațiile testate pe cobai au diferită structură calorică (% a nutrienților), în special, un procent mai mare de proteine și mai mic de lipide (tabelul 2.7).

Tabelul 2.7. Structura calorică a rațiilor alimentare cu diversă structură calorică (%) testate *in vivo* pe cobai

Componentele de bază	**Cantitatea, % a componentelor nutritive din variantele rațiilor elaborate / numărul lotului experimental**		
	1/Lotul II	2/Lotul III	3/Lotul IV
Proteine	12	16	20
Lipide	35	30	27
Glucide	53	54	53

Animalele de laborator, cobaii, au fost repartizați în 4 loturi:

- Lotul I – martor, animale care au primit rația standard, specială pentru cobai în condiții de vivariu;
- Loturile experimentale: II-IV, animale care au primit rațiile cu diversă structură calorică reprezentată în tabelul de mai sus (Tabelul 2.7).

Pentru a evidența modificările enterococilor în raport cu alte bacterii, au fost colectate probe de conținut intestinal (rectal) de la toate animalele în două etape: la începutul și la sfârșitul experimentelor. Probele au fost supuse cercetării prin metode microbiologice clasice descrise mai sus.

2.3.3. Studierea incidenței enterococilor în funcție de statutul fiziologic al organismului-gazdă

În experimentele ce au vizat elucidarea incidenței enterococilor în funcție de statutul fiziologic al organismului-gazdă au fost realizate două serii de experimente.

I. În prima serie de experimente a fost testată acțiunea inaniției (lipsei hranei) prin monitorizarea valorii numerice a enterococilor și a altor grupe de bacterii din conținutul intestinal la animalele înfometate.

Experimentul a fost efectuat pe animale de laborator – șobolani albi linia Wistar, care au fost divizate în două loturi:

Lotul I – martor, care a prevăzut alimentația conform rației standard;

Lotul II – inaniția, ce a prevăzut deprivarea de la alimentație timp de 72 ore (h).

Monitorizarea greutății și investigarea conținutului enterococilor intestinali a fost efectuată individual pentru fiecare animal din experiment. Animalele din loturile experimentale au fost ținute separat în cuști.

II. În a doua serie de experimente a fost studiată incidența enterococilor la animalele de laborator (șobolani albi linia Wistar) cu diferiți indici ai masei corporale și în corelație cu dieta, special concepută în funcție de greutate.

Pentru acest scop animalele de laborator au fost divizate în două grupe/loturi:

I. Cu masa corporală mică (care probabil fenotopic se atribuie tipului activ);

II. Cu masa corporală mare (care probabil fenotopic se atribuie tipului hipoactiv).

Corelația dintre valoarea bacteriilor investigate la animalele cu diferită greutate și în funcție de administrarea rațiilor alimentare, special concepute pentru aceste animale (în vederea corectării), a fost testată conform schemei reflectate mai jos.

Tabelul 2.8. Schema experimentelor de testare a rațiilor alimentare în funcție de greutatea corporală a animalelor

Componentele nutritive din rațiile alimentare, %	**Subgrupe experimentale**			
	Lotul I (masa corporală mică)			
	1	**2**	**3**	**4**
Proteine	14	16	18	20
Lipide	28	26	25	23
Carbohidrați	58	58	57	57
	Lotul II (masa corporală mare)			
	1	**2**	**3**	**4**
Proteine	20	22	25	30
Lipide	25	23	22	21
Carbohidrați	55	55	53	49

Contorizarea enterococilor în raport cu alte bacterii, din conținut intestinal (rectal) a fost realizată prin metode microbiologice clasice descrise mai sus (subcap.2.2).

2.4. Studierea proprietăților tulpinilor de enterococi în calitate de probiotice

Tulpinile de bacterii au fost selectate în baza principiului de hidrolizare a substraturilor specifice din mediul nutritiv: gelatina, amidonul, hipuratul, esculina și arginina. Interpretarea rezultatelor la hidroliza substanțelor cercetate (reacția de colorare) (Биргер М.О. и др., 1982).

Gelatina:

(+) – mediu lichid in jurul tulpinii de microorganisme identificate

(-) – mediu solid in jurul tulpinii de microorganisme identificate

Amidonul: pe mediul din jurul tulpinii de microorganisme se adaugă soluție de iod

(+) – culoarea mediului rămâne neschimbată

(-) – va forma un complex de culoare albastră

Hipuratul:

(+) – albastru

(-) – incolor, cafeniu deschis

Esculina:

(+) – negru, cafeniu închis

(-) – incolor, cafeniu deschis

Arginina:

(+) – roșu, violet-roșu

(-) – galben, oranj deschis (Anexa 3).

Selectarea monotulpinilor de microorganisme utile pentru macroorganism s-a realizat cu considerația capacității adezive și activității antagoniste ale lor.

2.4.1. Determinarea capacității adezive a tulpinilor izolate de enterococi

Capacitatea adezivă a tulpinilor de bacterii obligative tubului digestiv au fost determinate prin metoda expres „*in vitro*” cu utilizarea masei de eritrocite umane, porcine și bovine, după Брилис Т.А. (1986), Balcázar J.L. (2007) și *in vivo,* conform Collabo M.C. și alții (2007).

Frotiul s-a pregătit în felul următor: într-o picătură de soluție tampon de sodiu-fosfat au fost introduse eritrocitele cu ajutorul ansei (suspensie eritrocitară cu concentrația de 100 mln. la 1 ml) și suspensia microbiană a tulpinii testate, care se găsea pe mediul de cultură fluid. După pregătire, frotiul s-a menținut în condiții separate și umede la temperatura de 37 ºC timp de 30 de min. Apoi s-a supus uscării, fixării și vopsirii prin metode uzuale. L-a microscopie s-a numărat câte celule microbiene au aderat pe suprafața a 25 de eritrocite și s-a calculat indicele mediu al adeziunii (IMA). Dacă IMA era la nivel de 0-1,00 s-a considerat, că microorganismele testate nu

posedau activitate adezivă; de 1,01-2,00 – capacitate adezivă slabă; de 2,01-4,00 – capacitate adezivă medie, iar de la 4,00 – adezivitate sporită.

2.4.2. Determinarea activității antagoniste a tulpinilor de enterococi față de unii reprezentanți ai florei microbiene condiționat-patogene și patogene

Tulpinile de bacterii, care aveau activitate adezivă sporită (de la 4,00 și mai mare) au fost supuse testării în scopul evidențierii activității lor antagoniste față de escherichii și salmonele (cei mai răspândiți agenți microbieni, provocatori de maladii intestinale diareice). Au fost determinate proprietățile antagoniste cu evidențierea indicilor calitativi de combatere a provocatorilor maladiilor intestinale după Егоров Н.С. (1965) apoi celor cantitativi după Перетц Л.Г. (1986). Aceste investigații au fost efectuate în condiții *in vitro*, fiind utilizată metoda difuziei în godeuri de agar pentru a testa activitatea antagonistă a tulpinilor izolate de enterococi împotriva agenților patogeni selectați. Cutiile au fost ulterior incubate timp de 24 de ore la 37 ºC. După perioada de incubare, se evaluează capacitatea tulpinei antagoniste de a inhiba creșterea microorganismului indicator. Se măsoară zonele clare (zonele de inhibiție) din jurul culturii bacteriene antagoniste, unde creșterea microorganismului indicator a fost inhibată. Zonele de inhibare a bacteriilor patogene au fost măsurate cu o riglă transparentă. Au fost efectuate trei repetări pentru fiecare test pentru fiecare specie patogenă evaluată (Nalawade T.M., Bhat K.G., 2016). Calcularea activității antagoniste sau a indicilor de combatere a fost realizată pe baza dimensiunii zonelor de inhibiție. Aceste valori oferă o măsură cantitativă a activității antagoniste a tulpinilor bacteriene testate. Unitatea de măsură pentru indicii de combatere a activității antagoniste a tulpinilor bacteriene testate este în procente (%). Aceasta reflectă raportul dintre numărul final și cel inițial de celule microbiene (escherichii și salmonele) după expunerea la tulpinile bacteriene antagoniste. Procentul indică gradul de reducere a celulelor microbiene provocatoare de maladii intestinale diareice, astfel cuantificând eficiența activității antagoniste a tulpinilor testate.

2.4.3. Investigarea compozițiilor microbiene cu utilizarea tulpinilor de enterococi

Au fost obținute compoziții microbiene experimentale în baza unor asociații de bacterii investigate utile pentru organism: bifodobacterii, lactobacterii, enterococi și escherichii, și testată eficacitatea lor în experimente pe animale de laborator.

Experimentul 1.

Investigațiile au fost efectuate pe animale de laborator, șoareci albi, care au fost divizați în cinci grupe/ loturi a câte 10 animale în fiecare grupă, după cum urmează:

- Lotul I a servit drept control și nu a primit remediu bacterian;

- Lotul II a primit preparatul Bifidumbacterin, pe baza de bifidobacterii, producător Biomed, Federația Rusă;

- Lotul III a primit preparatul Lacidofil WM, ce conține lactobacili, producător, Institutul Rosell Inc., Canada;

- Lotul IV a primit Bifiform, ce conține bifidobacterii și enterococi, producător GlaxoSmith Kline Healthcare, Danemarca;

- Lotul V ce a prevăzut testarea asociației de bacterii, elaborată pentru prima dată pe baza microorganismelor din genul *Enterococcus* (*E. faecium*) și din genurile *Bifidobacterium* și *Lactobacillus*, în cadrul proiectului „*Elaborarea și testarea noilor remedii medicamentoase pentru menținerea coordonată a bacteriocenozei intestinale la nivel sanogen”*, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie.

Experimentul 2.

Asociațiile noi de bacterii ce conțineau enterococi au fost testate în experimente pe cobai în calitate de animale model, care au fost divizați în 3 loturi, după cum urmează:

- Lotul I – martor, animalele nu au primit niciun remediu de origine bacteriană;

- Lotul II – experimental, animalele au primit o asociație microbiană alcătuită din o tulpină de lactococi, una de lactobacili și două de bifidobacterii;

- Lotul III – experimental, animalele au primit o asociație microbiană alcătuită dintr-o tulpină de enterococi, una de lactobacili și una de bifidobacterii.

Probele de conținut intestinal diluat au fost studiate la începutul și sfârșitul experimentului (înainte și după 6 zile de administrare a preparatelor microbiene studiate).

Toate preparatele au fost administrate oral, pe fondul dismicrobiosmului intestinal, timp de 6 zile, câte 1 ml suspensie microbiana (1 miliard de celule microbiene) la 1 animal pe zi (înainte de hrănirea de dimineață).

De la toate animalele au fost colectate mostre de conținut intestinal (rectal), care după diluare până la 10^{-9} s-au inoculat pe medii agarizate elective pentru bifidobacterii, lactobacterii, lactococi și enterococi.

Evidența bacteriilor în conținutul intestinal a fost efectuată după principiile descrise în pct. 2.2.4.

2.4.4. Studierea compatibilității enterococilor cu alte grupe de bacterii

Compatibilitatea a fost testată experimental *in vitro.* Compatibilitatea a fost apreciată după indicii numerici ai bacteriilor investigate, care au fost determinați în conformitate cu metodele clasice descrise mai sus. În acest scop au fost realizate două serii de experimente.

În primul experiment a fost determinată compatibilitatea enterococilor cu 5 specii de bifidobacterii, iar în al doilea experiment au fost studiați aceiași indici ai compatibilității enterococilor cu șase specii de lactobacili.

Compatibilitatea enterococilor a fost elucidată în comparație cu cea a streptococilor și lactococilor. Suspensia microbiană de enterococi, streptococi și lactococi intestinali a fost inoculată separat și în comun cu reprezentanții genului *Bifidobacterium* și *Lactobacillus* în condiții *in vitro*.

În ambele serii de experimente, au fost prevăzute 4 loturi, și anume:

Lotul I – martor, în care speciile de bacterii au fost inoculate separat;

Lotul II – specia *E. faecium*, a fost inoculată cu 5 specii de bifidobacterii și respectiv cu 5 specii de lactobacili, fiind determinată compatibilitatea enterococilor cu bifidobacterii și lactobacilii;

Lotul III – specia *Streptococcus thermophilus* a fost inoculată cu 5 specii de bifidobacterii și 5 specii de lactobacili, fiind determinată compatibilitatea streptococilor cu bifidobacteriile și respectiv cu lactobacilii în comparație cu cea a enterococilor;

Lotul IV – specia de *Lactococcus lactis* a fost inoculată cu 5 specii de bifidobacterii și 5 specii de lactobacili, fiind determinată compatibilitatea lactococilor cu bifidobacteriile și respectiv cu lactobacili în comparație cu cea a enterococilor.

Toate mostrele de suspensie microbiană ale bacteriilor inoculate au fost supuse incubării la temperatura de 37±1ºC timp de 72 de ore, apoi numărării cantității de colonii crescute pe mediu nutritiv – geloză electivă. La finele experimentelor s-a calculat cantitatea de celule microbiene la 1 ml de suspensie microbiană inoculată, iar rezultatele obținute sunt exprimate în logaritmi zecimali (lg/1 ml).

2.5. Metode de prezentare și calculare a rezultatelor obținute

Rezultatele obținute sunt prezentate în logaritmi zecimali la 1g de: suspensie microbiană și/sau conținut intestinal. Datele absolute s-au supus logaritmării zecimale, utilizând calculatorul științific, iar rezultatele medii a investigațiilor finale au fost calculate statistic, conform t-criteriului Student. S-au calculat valorile medii (M), deviațiile standard (m), testul Student (t) și nivelul de semnificație (p).

Rezultatele aprecierilor cantitative ale valorilor parametrilor studiați au fost supuse analizei statistice după metoda cercetării selective cu aprecierea **mediilor aritmetice și a erorilor lor:**

Media aritmetică: $M=\Sigma v/n$, unde:

M – valoarea medie aritmetică a indicilor studiați;

v – valoarea fiecărui indice;

Σ – simbolul sumării;

n – numărul total de investigații.

Deviația standard: $\sigma = \pm\sqrt{\Sigma d^2 p/n}$,

unde:

σ – deviația standard;

d – diferența dintre „V" și „M": d = V−M;

p – frecvența;

n – numărul de cazuri.

Eroarea valorilor medii aritmetice: $m = \sigma\sqrt{n}$, unde:

m – deviația valorii medii aritmetice;

σ – deviația standard;

n – numărul total de cazuri (cercetări).

Gradul și caracterul modificărilor parametrilor studiați a fost apreciat cu utilizarea metodei de calculare a valorilor medii relative și a cazurilor lor. Valoarea medie relativă s-a apreciat după metoda tradițională (Spinei L., 2009).

Eroarea valorilor medii a fost determinată după formula: $m = \sqrt{p\,(100-p)/n}$,

unde**:**

m – deviația valorii relative medii;

p – valoarea relativă medie;

n – numărul total de cazuri.

Diferența valorilor studiate a fost apreciată prin determinarea **criteriului t – Student** (cu o probabilitate mai mare de 95 % ($p<0,05$)), care a fost calculat după formula:

$t = M1\text{-}M2/\sqrt{m1^2 + m2^2}$, unde:

t – criteriul Student;

M1 și M2 – valorile medii aritmetice ale totalităților comparate;

m1 și m2 – erorile mediilor aritmetice ale totalităților comparate.

2.6. Concluzii la capitolul 2

1. Cercetările microbiologice au fost efectuate pe celule bacteriene de enterococi (*Enterococcus* spp) din conținutul intestinal al diverselor obiecte biologice luate în studiu: subiecți umani (copii de diferite vârste și adulți); animale agricole de interes economic și animale de laborator.

2. Investigarea rolului fiziologic al enterococilor a fost efectuată în comparație cu alte grupe de bacterii intestinale – bifidobacterii, lactobacterii și escherichii, care au semnificație în asigurarea sănătății tubului digestiv.

3. Izolarea tulpinilor pure de microorganisme (enterococi, bifidobacterii, lactobacterii și *Escherichia*) din mostrele conținutului intestinal (mase fecale), cuantificarea bacteriilor investigate și identificarea lor a fost efectuată prin metode microbiologice clasice, fiecare grup de microorganisme fiind studiat și numărat separat.

4. Pentru evidențierea rolului fiziologic al enterococilor au fost realizate experimente ce au vizat: incidența enterococilor în funcție de statutul fiziologic al organismului, de starea de sănătatea a tubului digestiv, de acțiunea factorului alimentar, fiind montate experimente, care au respectat condițiile și cerințele de rigoare.

5. Proprietățile de probiotice ale tulpinilor izolate de enterococi au fost cercetate în baza capacității adezive și activității antagoniste față de unii reprezentanți ai florei microbiene condiționat-patogene și patogene și a compatibilității lor cu alte grupe de bacterii, iar eficiența lor a fost testată în asociație și comparativ cu microorganismele ce posedă acțiune probiotică sanogenă dovedită.

6. Experimentele pe animale au fost realizate în conformitate cu Directiva 86/609/CEE din 24 noiembrie 1986 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și au fost aprobate de Comisa metodică a Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova.

3. INCIDENȚA, NIVELUL CANTITATIV ȘI ROLUL FIZIOLOGIC AL ENTEROCOCILOR ÎN TUBUL DIGESTIV UMAN ȘI ANIMAL

Studierea enterococilor ca material biologic în majoritate se referă la rolul lor în fiziologia și patologia umană prin prisma participării lor în apariția și dezvoltarea maladiilor infecțioase (Лоранская И.Д., 2011; Ramos S. et al., 2020). Majoritatea lucrărilor publicate în ultimii 10-15 ani includ rezultate științifice obținute în urma cercetării mostrelor de mase fecale acumulate de la subiecții umani – copii și adulți cu simptome de disfuncții intestinale diareice sau maladii infecțioase. Această informație unilaterală nu permite de a face o viziune corectă referitor la poziția enterococilor în calitate de comensali, implicarea anumitor specii și tulpini de enterococi în patogeneză și beneficiile altora pentru sănătate. Natura dublă a enterococilor ca microorganisme utile și ca factori patogeni determină ambiguitatea și complexitatea interpretării rolului lor fiziologic în asigurarea sănătății sau declanșării patogeniilor. În acest sens, enterococii rămân o enigmă, care urmează a fi dezvăluită.

Cert este faptul, că enterococii reprezintă bacterii indispensabile ale tubului digestiv la diverse animale. Efectivul enterococilor poate varia în funcție de secțiunea tractului gastrointestinal, de părțile corpului, de vârsta și specia obiectului biologic și desigur de modul de viață, în special de nutriție. Sunt cunoscute diverse aspecte fiziologice, care sunt influențate de aceste bacterii. Enterococii sunt implicați activ în diverse cicluri metabolice ale organismului-gazdă (metabolismul carbohidraților, biosinteza nucleotidelor, metabolismul redox etc.), având implicație în reglarea nivelului de colesterol din sânge (Ramsey M. et al., 2014; Yang L. et al., 2021). Enterococii comensali au dezvoltat mecanisme de apărare sofisticate pentru a elimina competitorii enterococici exogeni, patogeni din intestin (Dubin K., Pamer E., 2014). S-a stabilit că anumite tulpini enterococice prezintă caracteristici benefice pentru sănătate și sunt eficiente în gestionarea diareii la copii asociate cu administrarea antibioticelor, iar altele au găsit aplicații ca adjuvant al produselor lactate sau culturi starter, datorită activității lor de fermentare (Fugaban J. et al., 2021).

În lucrările realizate în cadrul Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie, sub conducerea doctorului habilitat, profesor cercetător Maria Timoșco au fost obținute date care confirmă semnificația streptococilor intestinali, inclusiv și a enterococilor (streptococii grupei D, conform clasificării anterioarei anului 1984) în activitatea vitală a organismului-gazdă (Timoșco M. și al., 2011, 2014, 2015; Velciu A., 2008; Bogdan V., 2016; Bogdan V., 2020; Bogdan V. et al., 2021).

Scopul cercetărilor reflectate în acest capitol a fost de a releva rolul fiziologic al enterococilor, prin prisma incidenței și nivelului numeric al acestora în funcție de specie, vârstă, starea sănătății tubului digestiv, statutul fiziologic al organismului-gazdă la acțiunea factorului alimentar. În special, a fost analizată modificarea conținutului enterococilor intestinali în comparație cu alte grupe de bacterii, în scopul evidențierii rolului acestora în menținerea echilibrului microbian intestinal.

3.1. Incidența enterococilor în grupul bacteriilor acidolactice sub formă de coci (lactococi și streptococi)

Enterococii reprezintă un grup destul de controversat de bacterii, nu numai din aspectul gradului de patogenitate al lor, dar, până nu demult, și din punct de vedere sistematic. În literatura de specialitate cu cca jumătate de secol în urmă, enterococii erau considerați streptococi (grupul D de streptococi). Până în prezent mulți cercetători, în special din spațiul post-sovietic consideră speciile de *E. fecalis* și *E. faecicum* ca parte a genului *Streptococcus*. Inclusiv și în cadrul cercetărilor realizate la Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie privind microbiota intestinală, aceste grupe de bacterii erau analizate ca streptococi.

După cum a fost menționat în capitolul 1, în anul 1984, în baza unui studiu al ADN-ului genomic, enterococii au fost clasificați într-un gen separat – genul *Enterococcus* și chiar fac parte dintr-o familie distinctă de streptococi – familia *Enterococcaceae* (Schleifer K.H., Kilpper-Bälz R., 1984).

Enterococii, de rând cu streptococii și lactococii, fac parte din ordinul bacteriilor Lactobacillales, care reprezintă bacterii ce produc acid lactic și care au semnificația lor în sănătatea tubului digestiv. De menționat, că lactococii până în anul 1985, au fost considerați ca streptococi și atribuiți genului *Streptococcus* și erau denumiți streptococii grupului N (N1). Astfel, după anul 1985, pe baza caracteristicilor biochimice și moleculare, reprezentanții genului *Streptococcus*, destul de divers, au fost reclasificați în *Lactococcus, Enterococcus, Vagococcus* și *Streptococcus* (Schleifer K.H. et al., 1985).

Prin producția de acid lactic și de bacteriocine aceste bacterii controlează efectivul microorganismelor patogene. Importanța bacteriilor acidolactice este evidențiată și de statutul lor GRAS, datorită prezenței indispensabile a lor în alimente și contribuției la o microbiotă sănătoasă la animale și om. Pe de altă parte, acidul lactic și alte produse ce rezultă din metabolismul bacteriilor acidolactice, contribuie la profilul organoleptic și textural a produselor alimentare.

Pentru a evidenția corelația dintre nivelul cantitativ al diferitor grupe de bacterii acidolactice, precum și incidența enterococilor în categoria acestor bacterii, a fost studiată valoarea numerică a trei astfel de grupe – ***Enterococcus, Lactococcus și Streptococcus*** la subiecți umani – copii și adulți (Tabelul 3.1.).

Tabelul 3.1. Genurile de microorganisme intestinale, izolate de la subiecții umani de diversă vârstă (Timoșco și al., 2011)

Sursa	**Vârsta, ani**	**Cantitatea de celule microbiene la 1 g de conținut intestinal, logaritmi zecimali (lg)**		
		Enterococcus	***Lactococcus***	***Streptococcus***
Subiecți umani, 1-3 ani				
Copii	1	5,34±0,14	4,20±0,15	6,17±0,13
Copii	2	4,85±0,10	3,72±0,11	5,54±0,15
Copii	3	4,77±0,16	3,64±0,14	5,38±0,12
Subiecți umani, 50-60 de ani				
Adulți	50	6,51±0,13	2,38±0,12	1,64±0,14
Adulți	55	5,76±0,14	2,13±0,10	5,54±0,13
Adulți	60	5,64±0,12	1,90±0,13	5,38±0,15

S-a stabilit că indicii cantitativi ai bacteriilor din genurile investigate variază în funcție de vârstă. În perioada de vârstă 1-3 ani, la subiecții umani predomină cantitativ bacteriile din genul *Streptococcus* și *Enterococcus* comparativ cu bacteriile din genul *Lactococcus* (Tabelul 3.1.). Cele mai înalte valori se atestă la copiii cu vârsta de 1 an, iar cele mai mici – la copiii de 3 ani.

La subiecții adulți modificarea indicilor numerici ai bacteriilor din genurile investigate are un caracter labil, în special, aceasta se referă la genul *Streptococcus*. De menționat, că valorile reduse ale acestor bacterii (1,64 lg/g) înregistrate la subiecții cu vârsta de 50 de ani, pot fi atribuite unor factori externi și/sau interni, întrucât microorganismele florei intestinale sunt extrem de sensibile la diferite devieri de mediu, ce influențează organismul. Cu excepția acestui caz, la subiecții umani adulți odată cu înaintarea vârstei se constată diminuarea efectivului numeric al bacteriilor acidolactice.

Totalizând datele obținute putem conchide că incidența enterococilor în primii ani de viață este mai mică decât cea a streptococilor și mai mare decât a lactococilor. În perioada adultă, conținutul enterococilor este mai mare comparativ cu conținutul microorganismelor din genurile *Lactococcus* și *Streptococcus*.

Diferențele dintre membrii genurilor analizate pot fi determinate de răspândirea lor în mediul ambiental și de rolul lor în organism. De exemplu, bacteriile ce aparțin genului

Lactococcus au o răspândire largă în mediul natural, în special în pajiști (ceea ce explică incidența ridicată a lor în laptele bovinelor și mai mică în tubul digestiv) și sunt utilizați pe scară largă în fermentarea alimentelor, în timp ce reprezentanții genului *Streptococcus* și *Enterocccus* conțin atât specii benefice sănătății, cât și agenți patogeni (Turner C.E. et al., 2012). Totodată, enterococii și streptococii, având semnificație dublă, sunt sensibili la diverse modificări ale mediului (intrinseci și extrinseci) inclusiv și schimbările de vârstă (Byappanahalli M.N. et al., 2012).

3.2. Incidența și nivelul cantitativ al enterococilor în diferite obiecte biologice luate în studiu în funcție de specie, mediul de trai, vârstă și starea sănătății tubului digestiv

Enterococii intestinali sunt foarte răspândiți în natură, sunt rezistenți la acțiunea diverșilor factori ambientali și se adaptează rapid la mediu înconjurător. Adaptabilitatea largă a speciilor de *Enterococcus* permite microorganismelor să colonizeze diverse nișe ecologice (Lebreton et al. 2014). Totodată, incidența enterococilor în tubul digestiv, în mare măsură, depinde și de condițiile ambientale de viață, în special de acțiunea asupra organismului-gazdă a factorilor nefavorabili ai mediului ambiant, mai ales, a celor climaterici – temperaturi extreme, poluarea etc. (Джафаров М.М., 2009; Tropini C., 2021). Studierea incidenței enterococilor la diferite obiecte biologice și în funcție de așa factori, precum mediul de viață, vârstă și starea sănătății tubului digestiv ar permite de a elucida rolul acestor bacterii în aspectul comensal-patogen.

3.2.1. Incidența și nivelul cantitativ al enterococilor în conținutul intestinal la diverse specii de animale și în diferite medii de trai

Enterococii sunt bacterii comensale intestinale întâlnite la om și animalele domestice, sunt destul de răspândiți la animalele sălbatice, păsări și insecte, plante, dar pot fi detectați și în mediu abiotic – sol și apă. Deseori, aceste bacterii sunt utilizate ca indicatori ai igienei precare în apă și a calității produselor alimentare. Având o largă răspândire în natură, s-a propus de a elucida efectivul acestor bacterii la diferite grupe de animale, care diferă filogenetic și care au diferite medii de trai. Multe specii de enterococi sunt asociate în principal cu intestinele animalelor domestice, fiind totodată depistate și la reprezentanții faunei sălbatice. Fiind considerați ca potențiali patogeni pentru organismul uman, este important de a releva incidența acestor bacterii la animalele care au cea mai mare tangență la activitatea oamenilor, cum ar fi animalele de companie și animalele de fermă. Acest aspect are importanță, întrucât diverse animale pot servi ca focare de răspândire a unor tulpini patogene de enterococi, rezistente la

antibiotici (urmare a aplicării pe larg a medicamentelor animalelor de companie și animalelor de fermă).

În studiile precedente efectuate sub conducerea dnei dr. hab., prof. cerc. Timoșco M. (Тимошко М. А., 1990; Timoșco M. et al., 2014) au fost obținute date privind incidența enterococilor la diferite animale: domestice, de laborator utilizate în scopuri științifice, de interes agricol/economic și sălbatice (Tabelul 3.2.).

Tabelul 3.2. Indicii cantitativi ai enterococilor în conținutul intestinal al diferitor specii de animale (Тимошко М. А., 1990**)**

Animale	Indicii cantitativi ai enterococilor intestinali, (lg) la 1 g de conținut intestinal
Animale domestice de companie	
Câine	9,9±0,4
Pisică	8,5±0,4
Animale de interes economic (agricole)	
Porcine	7,9±1,0
Cabaline	8,5±0,8
Ovine	6,7±0,5
Bovine	5,4±0,2
Iepuri	3,6±0,6
Păsări	7,1±0,4
Animale de laborator	
Șoarece	5,6±0,9
Șobolan	8,2±0,6
Cobai	6,9±1,8
Animale sălbatice*	
Hârciog	5,1±1,5
Maimuță	7,3±1,4
Nurcă	9,2±0,3
Păsări sălbatice*	
Fazan	7,11±0,3
Lebăda neagră	8,8±0,15
Rața sălbatică	7,8±0,74

Notă: * - date obținute la animale din Grădina Zoologică din Chișinău.

S-a constatat că valoarea cantitativă a enterococilor diferă la diverse grupe de animale luate în studiu. În mediu, valori mai mari ale acestor bacterii au fost depistate la animalele domestice de companie – câine și pisică. Indicii numerici generali ai enterococilor la aceste animale depășește cu 2,7 unități efectivul acestora la animale de fermă, cu 1,6 unități la animalele de laborator, cu 2 unități la animalele sălbatice și cu 1,2 unități la păsările sălbatice (Figura 3.1.). Dacă analizăm incidența în parte la fiecare specie, atunci valori înalte ale enterococilor au fost înregistrate la câine (care sunt cele mai mari în comparație cu toate animalele investigate), la nurcă și la lebăda neagră (Tabelul 3.2).

Astfel, cantitativ enterococii predomină la animalele de companie, ceea ce confirmă și alte studii, referitor la răspândirea largă a enterococilor la aceste animalele, fapt care la rândul său, datorită contactului restrâns al acestora cu oamenii și partajării unor medii comune, poate duce la transferul încrucișat de aceste bacterii, inclusiv și a formelor patogene (Nilsson O., 2012; Wu S., 2022).

Pe de altă parte, nivelului numeric al enterococilor este deseori utilizat pentru aprecierea stării sănătății organismului. Dintre bacteriile microflorei intestinale s-a propus de a studia corelația dintre nivelul cantitativ al enterococilor cu cel al bifidobacteriilor, lactobacteriilor (lactobacililor) și a *E. coli*, întrucât reprezentanții acestor grupe de bacterii sunt în obiectivul mai multor investigații ce vizează semnificația microbiotei pentru sănătatea organismului-gazdă, iar valoarea numerică a lor reprezintă un indice al stării sănătății tubului digestiv. În acest caz, incidența enterococilor a fost investigată în comparație cu aceste grupe de bacterii (Figura 3.1.).

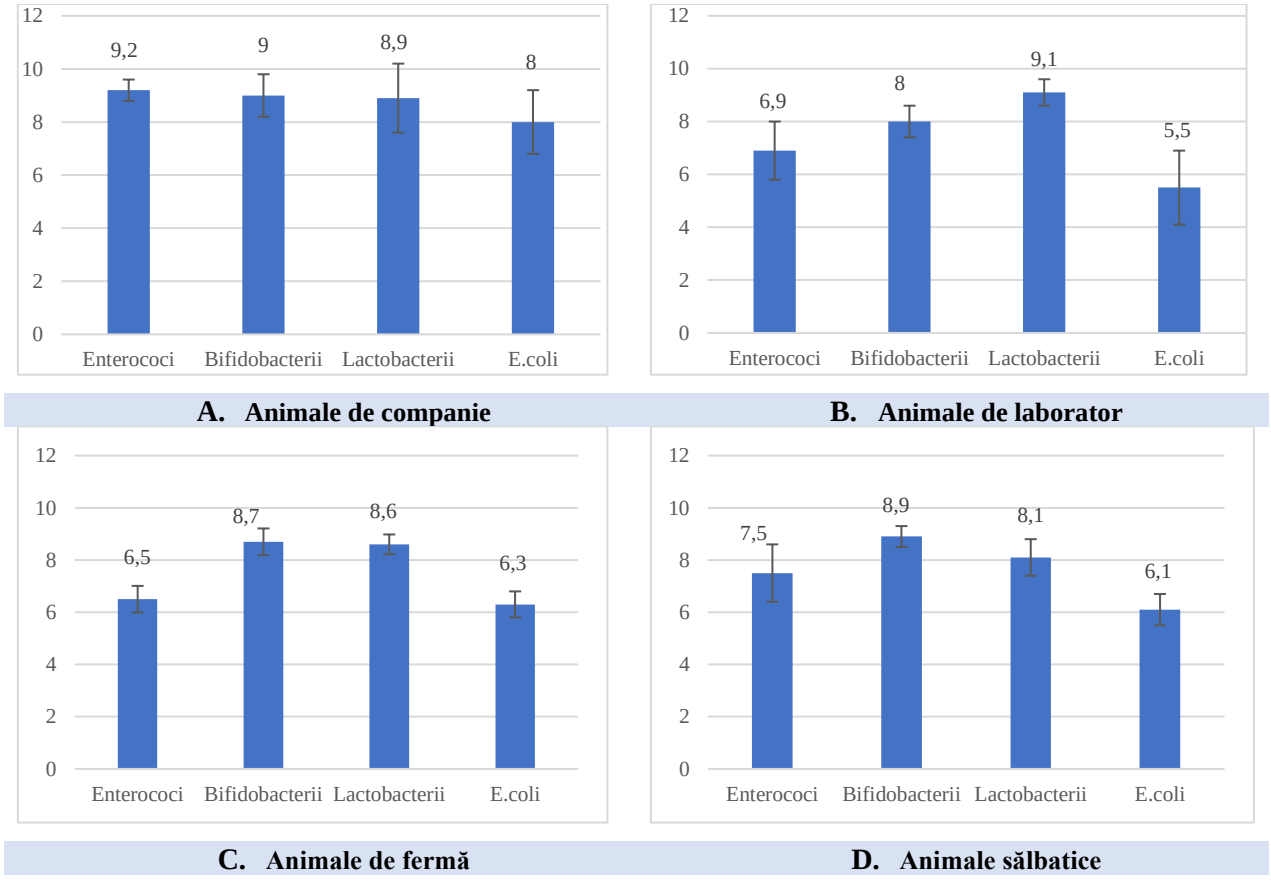


Figura 3.1. Nivelul cantitativ al enterococilor, bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli* în conținutul intestinal (masele fecale) la diverse animale (cantitatea de celule bacteriene în lg la 1 g de conținut intestinal)

Datele obținute atestă o corelație între indicii numerici ai enterococilor cu cei a bifidobacteriilor și lactobacteriilor și indică la o posibilă „cooperare" a acestor bacterii, ce

menține efectivul de *E. coli* la un nivel ce nu permite dezvoltarea diferitor patologii intestinale (Figura 3.1.).

Cel mai bine acest lucru se observă la animalele de laborator, animalele de fermă și animalele sălbatice, la care nivelul cantitativ al enterococilor este mai mic comparativ cu cel al bifidobacteriilor și lactobacteriilor și mai mare comparativ cu *E. coli*. De exemplu, la animalele de laborator, valoarea numerică a bifidobacteriilor și respectiv a lactobacteriilor este de 1,15 și 1,3 ori mai mare, iar a *E. coli* de 1,25 mai mică comparativ cu cea a enterococilor (Figura 3.1. B). La animalele de fermă indicele numeric al enterococilor este de cca 1,3 ori mai mic comparativ cu cel al bacteriilor benefice și aproximativ la același nivel cu *E. coli* (Figura 3.1. C). În cazul animalelor sălbatice nivel enterococilor în mostrele examinate este mai mic respectiv de 1,18 și 1,1 ori față de bifidobacterii și lactobacterii și de 1,23 ori mai mare comparativ cu *E. coli*. De menționat, că la animalele sălbatice, incidența enterococilor este mai mare comparativ cu animalele de laborator și animalele de fermă, dar mai mică față de animalele de companie. Mai mult, în cazul animalelor domestice a fost înregistrat un indice numeric mai mare al escherichiilor (Figura 3.1. A). Aceasta relevă că contactul frecvent al oamenilor și animalelor, în special în viața de zi cu zi, poate fi cauza schimbului reciproc de bacterii, inclusiv patogene, ceea ce poate să se răsfrângă negativ asupra sănătății tubului digestiv atât la oameni, cât și la animale.

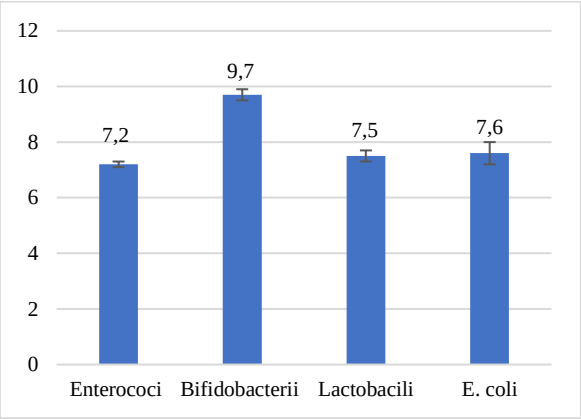
Acest fapt a determinat analiza incidenței enterococilor la speciile de animale, habitatul cărora diferă, și anume în mediul rural, unde animalele sunt îngrijite de om și în mediul urban, în care acțiunea antropogenă este evidentă. Cercetările au fost efectuate pe păsări, întrucât păsările, în special cele sălbatice, au diverse obiceiuri de hrănire și capacitatea de a se deplasa la distanțe lungi, fiind în contact cu mai multe și diverse locuri și spații (parcuri, grădini, lacuri, păduri). Deseori, microflora intestinală a păsărilor este percepută ca indicator ecologic al stării ecosistemelor naturale (Waite D.W., Taylor M.W., 2015; Wu H. et al., 2021).

Analiza indicilor numerici ai enterococilor în comparație cu alte grupe de bacterii (benefice și patogene), ar permite de a elucida aspectele de influență a factorului uman în mediul rural și urban asupra microbiocenozelor intestinale la animale, care la rândul său reflectă starea de sănătate a organismului.

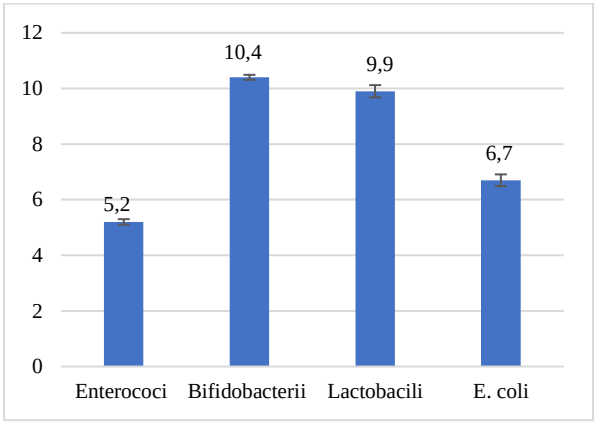
În studiu au fost luate 2 grupe de păsări: în mediul urban – porumbei și rațe sălbatice; în mediul rural – porumbei de casă, porumbei de rasă (rasa Creț francez) și rața mută (leșească). De menționat, că porumbelul simplu din mediul urban și rural este porumbelul de casă (*Columba livia* f. domestica), care se întâlnește în apropierea așezărilor umane, la sat și în oraș. Rața sălbatică reprezintă malardul sau specia *Anas platyrhynchos*. În mediul urban mostrele de la rațele sălbatice au fost colectate din parcul Valea Morilor, iar de la porumbei din scuarul de pe

strada Academiei. În mediul rural mostrele au fost colectate de la gospodării casnice individuale. De asemenea, în comparație, au fost analizate datele obținute la rața sălbatică de la Grădină Zoologică din Chișinău.

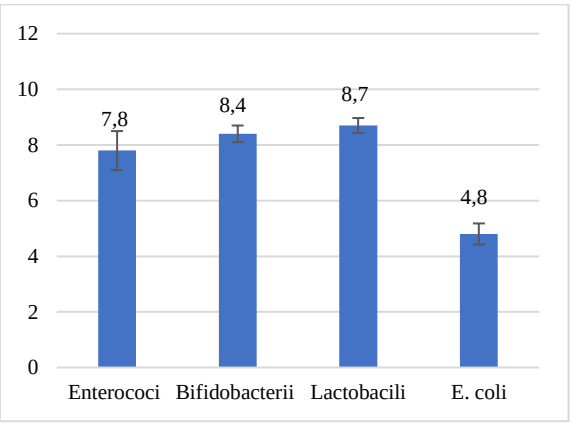
Datele obținute relevă o valoare numerică mai mare a enterococilor în mediul rural, comparativ cu mediul urban la toate păsările luate în studiu (Figura 3.2. și Figura 3.3.).



A. Mediul rural (rața mută)



B. Mediul urban (rața sălbatică)



C. Grădina Zoologică (rața sălbatică)

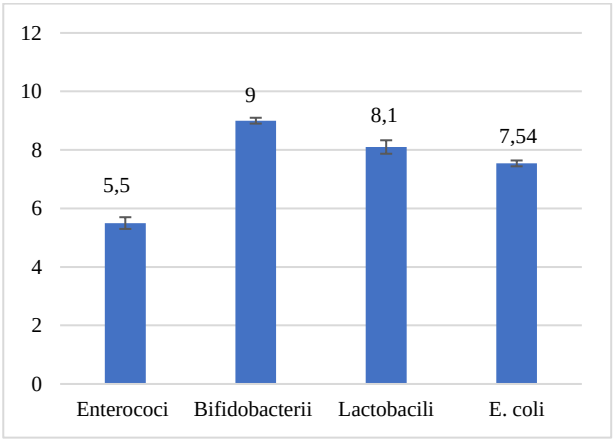
Figura 3.2. Nivelul cantitativ al enterococilor, bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli* în conținutul intestinal la rațe în mediul rural, urban și grădina zoologică (la 1 g de conținut intestinal, exprimat în lg)

Astfel, nivelul enterococilor la rața mută domestică din mediul rural este de cca 1,4 ori mai mare față de nivelul lor la rața sălbatică din mediul urban (Figura 3.2. A și B). Este interesant de menționat că la rața sălbatică din Grădina Zoologică din Chișinău, valoarea numerică a enterococilor în conținutul intestinal este cea mai mare și constituie 7,8 (lg/g), fiind aproape de valoarea stabilită în condiții rurale (7,2 lg/g) (Figura 3.2. A și C.). Cea mai mică valoare a enterococilor a fost contorizată la rațele sălbatice (malardul) din condiții urbane (5,2 lg/g). Aici, însă, este necesar de menționat că probele au fost colectate din parcul „Valea Morilor", în care habitatul păsărilor este asemănător celui natural, inclusiv și sursele de hrană. Despre aceasta denotă și valoarea numerică a escherichiilor la aceste păsări, care este mai mare comparativ cu

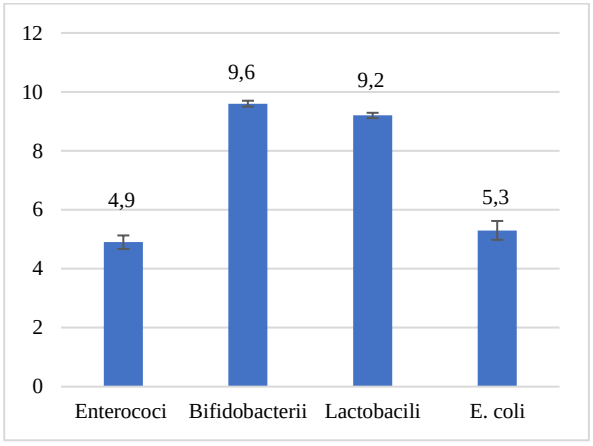
păsările sălbatice ținute în captivitate în condiții controlate și mai mică comparativ cu păsările domestice din gospodăriile rurale individuale.

Analizând valorile bacteriilor benefice (bifido- și lactobacteriilor) în comparație cu cele ale enterococilor și *E. coli*, se observă că starea bacteriocenozei intestinale la păsările din mediul rural este mai puțin favorabilă față de cea a păsărilor din mediul urban și grădina zoologică, fapt ce denotă că în mediul rural, contactul cu alte animale domestice, precum și cu omul, determină prezența unor focare de infecții, care pot afecta microflora.

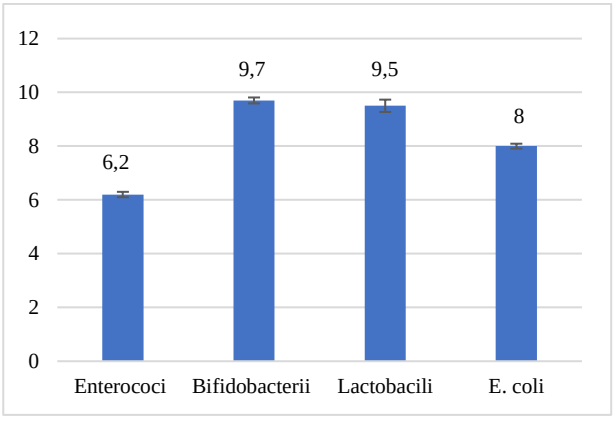
Aceiași tendință de dominanță numerică a enterococilor se atestă la porumbeii de rasă, crescuți în condiții de casă și a porumbeilor de casă, ambii din mediul rural comparativ cu păsările din mediul urban (Figura 3.3.).



A. Mediul rural (porumbel de casă)



B. Mediul urban (porumbel de casă)



C. Mediul rural (porumbel de rasă)

Figura 3.3. Nivelul cantitativ al enterococilor, bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli* în conținutul intestinal la porumbei în mediul rural și urban (la 1 g de conținut intestinal, exprimat în lg)

Astfel, cantitatea enterococilor la porumbeii de rasa (Creț Francez) a constituit 6,2 lg/g în conținutul intestinal, fiind de cca 1,12 ori mai mare comparativ cu conținutul acestor bacterii la porumbeii de casă din mediul rural și de cca 1,3 ori mai mare față de nivelul enterococilor la porumbeii de casă din mediul urban (Figura 3.3.). Cauzele valorii numerice mai mari ale

enterococilor în mediul rural pot fi diferite și depind, în mare măsură, de sursa hrănii. Se cunoaște că în condiții de captivitate, hrana, mai degrabă decât apartenența filogenetică a organismului-gazdă, este principalul factor care modulează microbiomul intestinal, în special la păsări (Xiao et al., 2021;Vrabie V., Bogdan V. et al., 2023).

Pe de altă parte, după cum a fost relatat anterior, în cazul incidenței enterococilor la animalele de companie, nivelul ridicat al acestora la păsările din mediul rural poate fi determinat de contactul permanent cu oamenii (cu anumite persoane) sau, după cum a fost menționat, cu alte animale care pot fi o sursă suplimentară de bacterii, indicând că mediul rural nu este cel mai bun pentru sănătatea tubului digestiv al vețuitoarelor.

Faptul, că omul poate fi o sursă de bacterii pentru animalele cu care intră în contact, reprezintă și datele privind nivelul bacteriilor de *E. coli* la păsările din mediul rural, în special la porumbelul de rasă, la care valoarea numerică este de cca 1,3 ori mai mare comparativ cu cea a enterococilor la porumbeii din mediul urban.

La păsările din mediul urban se atestă o corelație mai pozitivă dintre enterococi, bifidobacterii și lactobacterii în menținerea efectivului numeric al escherichilor la un nivel mai mic. Astfel, nivelul bifidobacteriilor la păsările din mediul urban este de aproximativ 2 ori mai mare comparativ cu a enterococilor și de cca 1,6-1,8 mai mare comparativ cu nivelul de escherichia, iar cel al lactobacteriilor este de cca 1,9 ori mai mare față de enterococi și de 1,5-1,7 ori mai mare față de *E. coli* (Figura 3.2. și 3.3.).

În mediul rural această diferență este mai mică, indicele numeric al bifidobacteriilor fiind de 1,4-1,6 ori mai mare față de enterococi și de 1,2-1,3 ori mai mare față de *Escherichia*, iar a lactobacteriilor de 1-1,5 ori mai mare față de enterococi și doar de 1,2 ori mai mare față de escherchia (la porumbelul de rasă), iar la rața domestică, nivelul lactobacteriilor fiind mai mic comparativ cu esherichia (Figura 3.2. și Figura 3.3.).

Incidența enterococilor la diferite animale este reflectată destul de amplu în literatura de specialitate. În lucrarea sa de sinteză Lebreton F. și al. (2014) menționează că enterococii apar sporadic printre mamiferele erbivore și par să colonizeze în mod natural tractul intestinal al rozătoarelor și animalelor ce se alimentează variat. Cel mai probabil, compoziția microbiotei în relație cu modul de nutriție și diversitatea nutrienților în rația alimentară ale unor animale, determină dacă enterococii sunt capabili să supraviețuiască și să prospere în tractul gastrointestinal (Lebreton F. et al., 2014).

Un alt factor important ce influențează microbiota intestinală reprezintă factorii de mediu, care influențează interacțiunile dintre microorganismele intestinale, precum și ale acestora cu gazdele lor. Diverși factori ai mediului, cu care se confruntă animalele în habitatul lor fie natural,

fie antropogen, pot provoca un dezechilibru mare al diferitor tipuri de microorganisme intestinale, inducând diverse probleme digestive (Anwar H. et al., 2021). Enterococii, reprezentând partea componentă obligatorie a bacteriocenozei intestinale, îndeplinesc un rol semnificativ în activitatea vitală a organismului, iar numărul lor poate indica starea sănătății acestuia în diferite condiții dictate de mediul de trai.

În baza datelor obținute putem susține, că incidența enterococilor variază la diverse grupe de animale, depinde în mare măsură de mediul de viață al animalelor și este influențată semnificativ de contactul frecvent cu oamenii și de factorii antropogeni.

3.2.2. Incidența și nivelul cantitativ al enterococilor în dependență de vârstă și starea sănătății tubului digestiv

Un alt obiectiv al cercetărilor a vizat evidențierea nivelului cantitativ al enterococilor în funcție de statutul fiziologic al tubului digestiv. În acest scop, au fost efectuate experimente pe subiecți umani de diferită vârstă și pe diverse grupe de animale cu statut sănătos al tubului digestiv și cu disfuncții intestinale. Subsecvent, în cercetările efectuate s-a urmărit de a releva și specificul modificării efectivului de enterococi odată cu schimbările de vârstă, fiind monitorizată valoarea numerică a celulelor bacteriene la subiecți umani în primul an de viață și la subiecți cu vârstă cuprinsă între 1 și 80 de ani. Investigațiile pe animale au fost realizate doar în perioada juvenilă a lor.

Datele reflectate în figura 3.4. relevă că în primul an de viață la subiecții umani (copii), conținutul enterococilor se stabilește la un nivel destul de înalt chiar în primele zile după naștere, însă, cele mai mari valori se atestă în perioada de 61-90 de zile și 181-240 de zile.

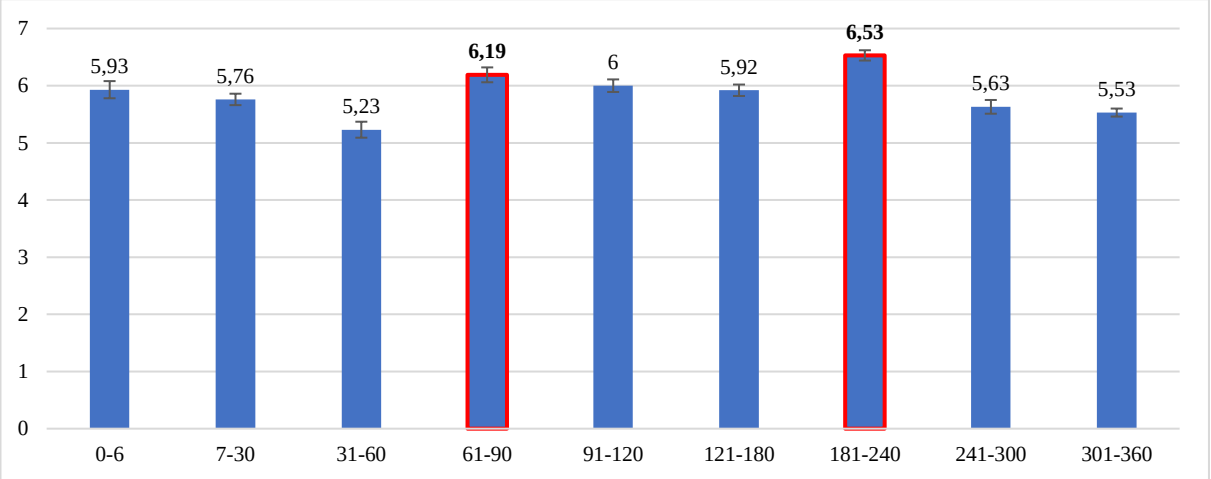


Figura 3.4. Cantitatea de enterococi (exprimată în lg, la 1 g de conținut intestinal) la subiecții umani (copii) în primul an de viață (0-360 de zile)

Caracterul variabil al modificărilor cantitative ale celulelor de enterococi în această perioadă poate fi determinat de mai mulți factori, în special alimentari, care contribuie cel mai mult la formarea microbiotei intestinale.

Modificările indicelui numeric al enterococilor la subiecții umani cu vârsta mai mare de 1 an sunt relatate în figura ce urmează (Figura 3.5.).

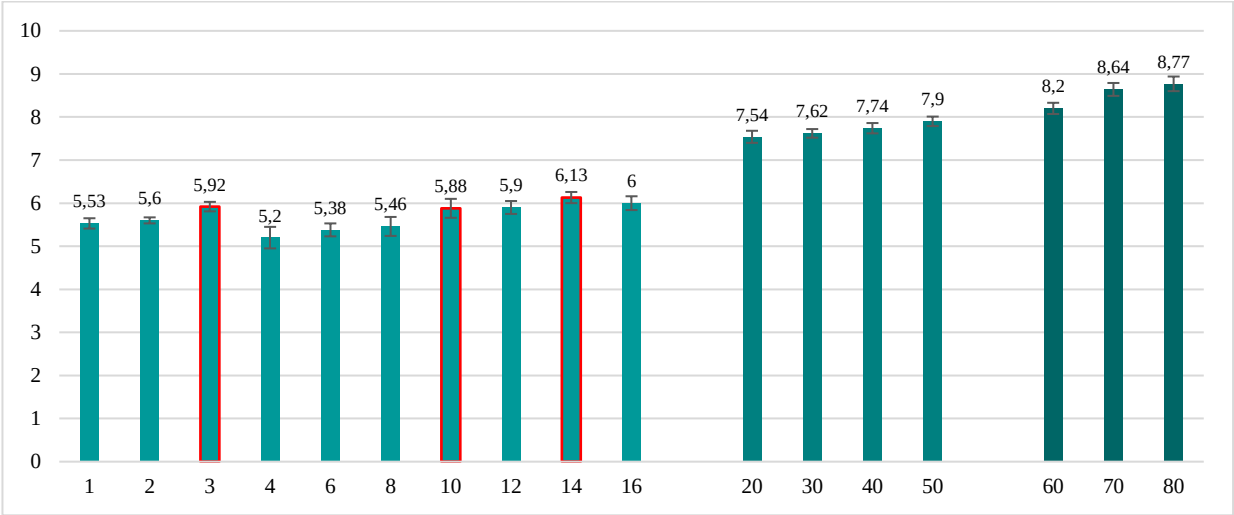


Figura 3.5. Modificarea valorii numerice a enterococilor (lg, la 1 g de conținut intestinal) la subiecții umani de diferită vârstă (ani)

Datele obținute constată tendința de majorare a efectivului enterococilor odată cu înaintarea în vârstă la subiecții umani. În perioada de 1-3 ani indicii numerici ai enterococilor variază de la 5,5 lg/g până la 5,9 unități, ulterior cantitatea de celule microbiene scade la nivelul de 5,2-5,4 lg/g la vârsta de 4-6 ani, urmând din nou o creștere a valorii acestora de la 5,5-5,9 lg/g la subiecții cu vârsta de 8-10 ani și de 12-16 ani (Figura 3.5.).

La subiecții cu vârsta cuprinsă între 20 și 50 de ani se observă o majorare a indicilor numerici ai enterococilor de cca 1,3 ori comparativ cu perioada precedentă, iar cantitatea de celule bacteriene variază de la 7,54 lg/g la vârsta de 20 de ani până la 7,9 lg/g la vârsta de 50 de ani (Figura 3.5.).

La persoanele vârstnice se atestă cele mai înalte valori ale cantității de enterococi, ce constituie 8,2 lg/g la subiecții de 60 de ani, 8,64 lg/g la subiecții de 70 de ani și 8,72 lg/g la subiecții ce au 80 de ani (Figura 3.5.).

Analiza variației conținutului enterococilor la subiecții umani în diferite perioade de vârstă relevă că în perioada de 1-16 ani nivelul enterococilor nu este stabil și variază de la 3 la 4 ani și de la 10 ani la 14 ani. În perioada 20-50 de ani nivelul celulelor microbiene este relativ

stabil, iar în perioada vârstei de 60-80 de ani nivelul enterococilor este într-o ascensiune constantă.

Rezultatele privind incidența enterococilor (valoarea numerică a lor) la subiecții umani sănătoși reflectă tendința de majorare a indicilor numerici ai acestor bacterii odată cu înaintarea în vârstă. La copii, nivelul cantitativ al enterococilor este destul de variabil și nu se atestă o stabilitate în funcțiile de vârstă precisă a acestora, ceea ce denotă despre faptul că microbiota copiilor chiar și la vârsta de 16 ani este în proces de formare și diferă de cea a subiecților adulți. La persoanele cu vârstă de până la 50 de ani s-a constat o creștere a valorii numerice a enterococilor de la vârsta de 20 de ani până la vârsta de 50 de ani, deși, această majorare nu este semnificativă și indică că microflora intestinală în această perioadă a vieții este stabilă. Asemenea tendință a modificării numerice a enterococilor a fost stabilită și la persoanele cu vârsta de după 50 de ani.

Instabilitatea nivelului de enterococi în perioada de 1-16 ani poate fi explicată prin faptul că profilul microbiotic al florei intestinale în această perioada nu este format și, după cum relatează studiile recente, încă nu atinge profilul caracteristic organismului adult (Hollister E.B. et al., 2015).

Datele obținute în perioadele ulterioare ale vieții denotă că compoziția și abundența microbiotei continue să se schimbe până la vârsta adultă. Diferențele individuale (de văzut datele incluse în subcapitolul 3.1.), care sunt înregistrate, reflectă cel mai probabil stilul de viață și statutul organismului la momentul recoltării probelor.

Nivelul ridicat de enterococi la persoanele vârstnice (perioada 60-80 de ani) poate fi cauzat de faptul că odată cu îmbătrânirea cresc cazurile de disbioză, iar microbiota intestinală a persoanelor vârstnice este îmbogățită în comensali proinflamatori în detrimentul microbilor benefici (Ragonnaud E., Biragyn A., 2021). O schimbare majoră a compoziției lor în intestin poate declanșa inflamații locale și sistemice dăunătoare (disbioză). În ultimul timp este susținută ipoteza că disbioza este una din cauzele principale a morbidităților asociate îmbătrânirii și, prin urmare, a morții premature a persoanelor în vârstă. Astfel, putem deduce că valorile înalte ale conținutului de enterococi la subiecții de 80 de ani sunt cauzate sau asociate cu evenimentele patologice și inflamatorii. Mai mult, însăși, enterococii pot cauza procese inflamatorii și în raport cu organismul se formează o relație reciprocă dintre cauză și efect (Bar K. et al, 2006). Toate acestea intensifică inflamația sistemică care poate duce la patologii corelate cu procesul îmbătrânirii (Ragonnaud E., Biragyn A., 2021).

Microbiota intestinală, după cum a fost relatat mai sus, este semnificativ influențată de starea de sănătate a tubului digestiv, și anume, de disbioză. Disbioza se caracterizează prin

scăderea diversității microbiene și creșterea speciilor proinflamatorii. În acest caz, microbiota dezechilibrată nu poate să asigure protecția față de organismele patogene, iar acestea la rândul său pot declanșa procesele inflamatorii și produce genotoxine sau chiar metaboliți cancerigeni. Deseori, disbioza a fost asociată cu cancerul colorectal, gastric și esofagian (Cameron R. et al., 2023).

Din literatura de specialitate se cunoaște că enterococii reprezintă cele mai eficiente bacterii-colonizatoare, fiind printre primele care se instalează în TGI la om și animale datorită faptului că sunt bacterii aerobe facultative, care stabilesc mediu anaerob prielnic pentru dezvoltarea ulterioară a bacteriilor anaerobe (obligatorii). Prin urmare, competența lor în colonizarea TGI îi poziționează să exploateze eficient disbioza ecologică, facilitând tranziția către o stare patogenă, ceea ce determină caracterul dual al enterococilor – ca bacterii comensale și patogene (Banla et al., 2019).

Investigarea nivelului de enterococi la subiecții umani sănătoși și cu disfuncții intestinale în primul an de viață ar elucida unele aspecte de stabilire a nivelului „sanogen" al enterococilor și a perioadei „critice" pentru aceste bacterii în cazurile de disbioză. Aceasta are o importanță ulterioară în formarea sănătății atât a sistemului digestiv, cât și a organismului în întregime. În acest scop a fost studiată incidența (indicii numerici) ai enterococilor la copii sănătoși (lotul I) și cu disfuncții intestinale (lotul II) pe perioade de vârstă de până la un an (Tabelul 3.3.).

Tabelul 3.3. Indicii cantitativi ai enterococilor intestinali la copiii mici (până la 360 de zile) în funcție de starea sănătății tubului digestiv

Vârsta, zile	**Numărul celulelor microbiene în 1 g din conținutul intestinal, logaritmi zecimali (lg)**		**Deosebirea dintre lotul I și II, %**
	I (subiecți sănătoși)	**II (subiecți cu dereglări intestinale)**	
0-6	5,93±0,15	6,63±0,12**	+11,80
7-30	5,76±0,10	6,84±0,12***	+18,75
31-60	5,23±0,14	7,17±0,16***	+37,09
61-90	6,19±0,13	6,57±0,14	+6,13
91-120	6,00±0,11	6,04±0,13	+0,66
121-180	5,92±0,10	5,65±0,11	-4,56
181-240	6,53±0,09	6,49±0,12	-0,61
241-300	5,63±0,12	6,38±0,17**	+13,32
301-360	5,53±0,07	6,63±0,11***	+19,89

Notă: **– $p \leq 0,01$(statistic distinct semnificativ); ***– $p \leq 0,001$ (statistic foarte semnificativ).

Datele prezentatele în tabelul de mai sus nu relevă deosebiri cantitative semnificative ale enterococilor în primul an de viață. O majorare neesențială se atestă în perioada de 61-90 de zile și 181-240 de zile. La subiecții cu disfuncții intestinale (lotul II), se observă o majorare cu 6-37% a nivelului cantitativ al enterococilor. Cea mai mare diferență dintre lotul I și lotul II (+37,09 %)

s-a constatat în perioada 31-60 de zile de la naștere. Astfel, putem deduce că această perioadă este mai „critică”, în ceea ce privește dereglarea homeostaziei bacteriene intestinale. La celelalte perioade, chiar și pe fondalul unor disfuncții intestinale, nivelul cantitativ al enterococilor se menține la un nivel uniform.

Aceasta denotă despre profilul de comensali al enterococilor și despre statutul sănătos al tubului digestiv. Un rol important în menținerea unui nivel stabil al acestor bacterii, cel mai probabil, îl are laptele matern cu care se hrănește copilul în primul an de viață. Se cunoaște că laptele matern reprezintă sursa primară de „probiotice”, ca sursă principală de bacterii benefice și funcționează ca „prebiotic”, fiind bogat în oligozaharide și este factorul principal, care modelează microbiomul intestinal (Urashima et al., 2012).

Pentru a elucida „comportamentul” enterococilor în perioadele următoare ale vieții în cazurile de disfuncții intestinale s-a propus de a analiza conținutul acestor bacterii în conținutul intestinal la subiecții umani sănătoși (lotul I), subiecții cu dismicrobism intestinal (lotul II) și subiecții cu disfuncții intestinale diareice (lotul III). În cazul de dismicrobism intestinal (lotul II) au fost atestate schimbări neesențiale ale indicilor cantitativi ai streptococilor intestinali, iar cele mai grave fiind dereglările funcționale ale tubului digestiv în formă de diaree documentate în lotul III. Datele obținute pe subiecții umani cu diferit statut al sănătății tubului digestiv sunt prezentate în tabelul 3.4.

Este cunoscut faptul că printre copii, în special cei de vârstă mică (1-3 ani) se atestă o răspândire largă a patologiilor intestinale în formă de dismicrobism și disfuncții diareice. Datele obținute privind nivelul cantitativ al enterococilor la copii cu dismicrobism intestinal (lotul II) și la cei cu disfuncții intestinale diareice (lotul III) confirmă aceasta. La copii cu dismicrobism intestinal (lotul II) s-a constatat o majorare de 1,2-1,4 ori a indicilor cantitativi ai enterococilor, iar la cei cu disfuncții diareice – o creștere de 1,3-1,7 ori a valorii numerice a acestor microorganisme. În cazurile de dismicrobism intestinal (lotul II) cele mai mari diferențe cu copii sănătoși au fost relatate în perioada de 1-2 ani și 6-10 ani. De remarcat faptul, că cea mai mare divergență se atestă la copiii cu disfuncții intestinale diareice (lotul III), în aceleași perioade de vârstă, în special la vârsta de 4 ani, fiind constantă majorarea cu 66,3% față de subiecții sănătoși (Tabelul 3.4.). Desigur, riscul de dezvoltare a dismicrobismului intestinal există și în alte perioade de vârstă a copiilor (5-6 ani și 7-8 ani), însă, analizând valorile numerice ale enterococilor în comparație cu valorile bacteriilor benefice (bifidobacteriilor și lactobacililor) și patogene (*E. coli*) perioada de 3-4 ani este cea mai vulnerabilă în acest aspect (Anexa 1, Tabelul A1.).

Tabelul 3.4. Indicii cantitativi ai enterococilor la subiecții umani (copii și adulți) în dependență de starea sănătății tubului digestiv (Timoșco și al., 2014)

Sursa	Vârsta, ani	Cantitatea de celule microbiene la 1g de conținut intestinal, logaritmi zecimali (lg)		
		Loturile experimentale		
		I	II	III
Copii	1	5,53±0,12	7,49±0,11***	8,45±0,18***
	2	5,60±0,07	7,90±0,13***	8,30±0,19***
	3	5,92±0,11	7,88±0,17***	8,46±0,20***
	4	5,20±0,25	6,30±0,46	8,65±0,46***
	6	5,38±0,15	7,20±0,40**	8,77±0,48***
	8	5,46±0,22	7,53±0,32***	8,17±0,50***
	10	5,88±0,22	7,86±0,32***	8,43±0,51***
	12	5,90±0,15	7,92±0,17***	8,04±0,22***
	14	6,13±0,13	7,76±0,18***	7,88±0,21***
	16	6,00±0,16	7,54±0,14***	7,64±0,25***
Adulți până la 50 de ani	20	7,54±0,14	8,43±0,18**	9,38±0,22***
	30	7,62±0,10	8,54±0,20**	9,49±0,23***
	40	7,74±0,12	8,64±0,19**	9,54±0,21***
	50	7,90±0,11	8,49±0,17*	9,60±0,22***
Adulți după 50 de ani	60	8,20±0,13	8,92±0,18*	9,77±0,20***
	70	8,64±0,15	8,96±0,21	9,80±0,23**
	80	8,77±0,17	9,20±0,20	9,88±0,19**

Notă: *– $p \leq 0,05$(statistic semnificativ); **– $p \leq 0,01$(statistic distinct semnificativ); ***– $p \leq 0,001$ (statistic foarte semnificativ).

La adulții cu vârsta de până la 50 de ani nivelul enterococilor s-a majorat de 1,0-1,1 ori la subiecții cu dismicrobism intestinal (lotul II) și de circa 1,2 ori la subiecții din lotul III cu disfuncții intestinale diareice. Modificări în funcție de vârsta concretă (20 de ani sau 50 de ani) nu au fost observate (Tabelul 3.4.).

La adulții cu vârsta de după 50 de ani valoarea numerică a enterococilor s-a majorat de 1 ori la subiecții din lotul II și de 1,1-1,2 ori la subiecții din lotul III. Cea mai mică diferență a indicilor cantitativi dintre loturi s-a constatat la subiecții cu vârstă de 80 de ani (Tabelul 3.4.). Diferența mică, la această categorie de vârstă, dintre subiecții sănătoși și cei bolnavi cu disfuncții intestinale poate fi explicată prin valori inițial mai mari ale enterococilor la persoanele vârstnice.

Astfel, rezultatele obținute denotă despre sensibilitatea mare a enterococilor intestinali la modificările mediului intestinal la copii, în special, în primii 4 ani de viață. La adulți, pe fondalul dereglărilor microflorei intestinale, nivelul enterococilor nu se modifică semnificativ comparativ cu valoarea lor la subiecții sănătoși. Aceste diferențe cantitative ale conținutului de enterococi la subiecții umani în funcție de vârstă, în mare parte, se datorează atât modului de viață, cât și schimbărilor fiziologice ce decurg odată cu înaintarea vârstei, care nemijlocit afectează și microbiota intestinală.

Incidența enterococilor în funcție de starea de sănătate a tractului digestiv a fost studiată și la animale de fermă: pui, purcei și viței. Datele obținute pe animale de fermă sunt prezentate în tabelul 3.5.

Ca și la copiii de vârstă fragedă (1-3 ani), la animalele de 1-30 de zile o răspândire largă o au patologiile intestinale sub formă de dismicrobism și disfuncții diareice. Analiza rezultatelor obținute și reflectate în tabelul 3.5. demonstrează elocvent majorarea indicilor numerici ai enterococilor la animalele din lotul II și III, respectiv cu dismicrobism intestinal și disfuncții intestinale diareice.

La puii de 10 zile cu dismicrobism intestinal (lotul II) s-a constatat creșterea de 1,6 ori, iar la cei din lotul III – de 1,7 ori a nivelului cantitativ de enterococi. La puii de 20 de zile în ambele loturi a fost documentată majorarea de 1,5 ori a efectivului enterococilor.

Tabelul 3.5. Indicii cantitativi ai enterococilor intestinali la diferite grupe de animale de interes economic în funcție de starea sănătății tubului digestiv (Timoșco și al., 2014)

Sursa	**Vârsta, zile**	**Cantitatea de celule microbiene la 1g de conținut intestinal, logaritmi zecimali (lg)**		
		Loturile experimentale		
		I	**II**	**III**
Pui de găină	10	5,43±0,12	8,54±0,18***	9,38±0,22***
	20	5,88±0,10	8,79±0,17***	8,92±0,19***
Purcei	10	5,25±0,13	7,88±0,19***	8,72±0,21***
	20	5,64±0,12	8,73±0,16***	9,41±0,20***
	30	6,34±0,11	8,92±0,21***	9,86±0,23***
	45	6,80±0,11	8,14±0,16***	8,53±0,23***
	75	6,66±0,11	8,04±0,21***	8,30±0,19***
	105	6,53±0,10	7,08±0,17*	8,07±0,21***
	135	6,49±0,13	7,46±0,20**	7,82±0,20***
Viței	10	6,53±0,14	8,49±0,14***	9,23±0,19***
	20	6,43±0,12	8,30±0,12***	8,94±0,17***
	30	6,20±0,13	8,43±0,11***	8,79±0,15***

Notă: *– p≤0,05(statistic semnificativ); **– p≤0,01(statistic distinct semnificativ); ***– p≤0,001 (statistic foarte semnificativ).

De asemenea, și la purcei în primele 10-30 de zile de la naștere se atestă o majorare a valorii numerice a enterococilor de 1,5 ori în lotul II și de 1,7 ori în lotul III. La purceii în perioada de vârstă 45-135 de zile atât din lotul cu dismicrobism intestinal, cât și din cel cu disfuncții diareice s-a constatat creșterea de maximum 1,2 ori a indicilor numerici ai enterococilor.

La viței, însă, a fost documentat un tablou invers al modificărilor valorilor numerice a enterococilor din loturile experimentale. În primele 20 de zile s-a stabilit majorarea de 1,3 ori la animalele din lotul II și de 1,1-1,4 ori la cele din lotul III a indicilor numerici ai enterococilor. La

vârsta de 30 de zile în ambele cazuri de disfuncții intestinale s-a constatat un nivel de 1,4 ori mai mare a numărului de enterococi, comparativ cu cel descris la animalele sănătoase (Tabelul 3.5.).

Din analiza rezultatelor observăm că la pui și purcei odată cu majorarea vârstei efectivul numeric al enterococilor scade în cazurile de disfuncții intestinale, iar la viței crește. Aceste modificări pot fi cauzate iarăși de specificul fiziologic al tubului digestiv (în special filogenetic), precum și de modul de nutriție și condițiilor de întreținere controlată.

Datele obținute relevă că enterococii reprezintă bacterii comensale care populează tractul intestinal la om și animale. Modificări în pattern-ul enterococilor sunt determinate de vârstă și statutul fiziologic al tubului digestiv.

În condiții de disbioză, și anume, de dismicrobism intestinal și disfuncții intestinale diareice conținutul enterococilor se majorează. La subiecții umani, cele mai mari diferențe între indivizii sănătoși și cu dereglări ale homeostaziei intestinale s-au observat la grupa de copii cu vârsta de 31-60 de zile și de 1-4 ani. Odată cu înaintarea vârstei, diferențe dintre valoarea enterococilor la subiecții sănătăți și cu disfuncții intestinale nu este atât de evidentă. Cele mai mici diferențe dintre subiecții sănătăți și bolnavi a fost înregistrată la persoanele cu vârsta după 50 de ani, în special, de 80 de ani.

La animalele de fermă cu disbioză intestinală, sporirea nivelului cantitativ al enterococilor a fost mai pronunțată decât la subiecții umani, fiind înregistrate valori de 1,7 ori mai mari comparativ cu valorile constatate la animalele sănătoase și care sunt mai mari la pui comparativ cu purceii și vieții.

După cum este menționat în literatura de specialitate, speciile de enterococi datorită caracteristicilor sale au proprietatea de a căpăta trăsături virulente și de a trece de la forme comensale la forme patogene. Însă, formele virulente ce se caracterizează prin rezistență, de regulă, se formează fie în mediul spitalicesc fie în alte condiții cu risc crescut de infecții (Guzman Prieto A.M. et al., 2016; Ramos S. et al., 2020; Krawczyk B. et al., 2021). Acest lucru este valabil atât organismului uman, cât și animal, iar capacitatea *Enterococcus* spp. de a provoca infecții a fost asociată cu caracteristicile de specie și mediul de trai al animalelor (Pillay S. et al., 2018). Mecanismele de rezistență față de sistemul imunitar înnăscut care permit acestor bacterii comensale să devină patogene nu sunt încă bine cunoscute. În acest aspect, flexibilitatea genetică a enterococilor este o caracteristică importantă, întrucât genele de rezistență la antibiotice și de virulență care au fost obținute (sau activate) pot fi transferate.

În baza datelor obținute putem presupune că în primele, zile, luni și ani de viață, formele sau tulpinile comensale ale enterococilor pot deveni virulente, în cazurile când se creează condițiile respective de infectare (de dismicrobism intestinal și disfuncții intestinale diareice). La

subiecții umani, cele mai vulnerabile perioade identificate au fost perioada de 1-2 luni în primul an de viață și la 1-4 ani de dezvoltare postnatală. De menționat, că valorile bacteriilor benefice – bifidobacteriile și lactobacilii, la subiecții cu dismicrobism intestinal și disfuncții intestinale diareice în perioadele menționate au valori semnificativ mai mici comparativ cu subiecții sănătoși, ceea ce confirmă presupunerea că enterococii devin aliați în dezvoltarea infecțiilor (Anexa 1, Tabelul A1.)

Pentru animalele de fermă aceiași tendință s-a constatat în primele zile și luni de viață, în special la animalele, mediul de întreținere a cărora contribuie la dezvoltarea infecțiilor, de exemplu, la pui și purcei.

3.3. Influența rației alimentare asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali

Alimentația determină în mare măsura starea de sănătate a organismului, în particular, prin acțiunea asupra microflorei intestinale. Recent s-a dovedit că prin reglarea nivelului și compoziției de autoanticorpi ce au legătură cu hormonii reglatori ai apetitului, microbiota controlează aspecte ale comportamentului legat de apetit și ale fiziopatologiei tulburărilor alimentare (Lam Y.Y. et al., 2017). Pe de altă parte, semnificația bacteriocenozei intestinale constă în producerea de substanțe (compuși) care la rândul său au un efect pozitiv sau negativ nu numai asupra sistemului digestiv, dar și a întregului organism (Gibson G.R., Roberfroid M.B., 1995). Există date privind influența microorganismelor intestinale asupra metabolismului organismului-gazdă. Microbiota are enzime care nu sunt codificate de genomul uman, dar care sunt necesare pentru îndeplinirea unor sarcini fiziologice sau pentru completarea acțiunii enzimelor digestive de a descompune așa substanțe precum polizaharide, polifenoli și de a sintetiza vitamine, aminoacizi etc., reglând echilibrul energetic al metabolismului celular și al organismului (Baghbani T. et al., 2020).

Enterococii reprezintă un model de studiu al influenței rațiilor alimentare asupra microflorei intestinale și al modului în care alimentele consumate pot contribui la sănătatea tubului digestiv (Tannock G.W., Cook G., 2002). De asemenea, aceste bacterii sunt utilizate în studii privind modul în care organismul face față pentru a coexista cu o varietatea de tulpini benefice și dăunătoare ale aceleiași specii, reușind, cel mai probabil, să le selecteze pe cele care sunt mai avantajoase. Prin urmare, *Enterococcus* spp. poate fi utilizat ca indicator al acțiunii factorului alimentar, în special, al coraportului substanțelor nutritive din rația alimentară, precum și al modului în care anumiți nutrienți pot proteja gazda, favorizând (sau nu) creșterea unor tulpini cu diferite niveluri de siguranță (Penders J. et al., 2006; Timoșco M. et al., 2015). Cu alte

cuvinte, valoarea numerică a enterococilor și corelația lor cu bacteriile benefice tubului digestiv ar permite de a argumenta acțiunea prebiotică a rațiilor alimentare cu o anumită valoare nutritivă și structură calorică asupra microbiotei intestinale.

După cum a fost menționat mai sus, raţiile alimentare au o acţiune nemijlocită asupra microflorei intestinale. Modificarea concentraţiei nutrienţilor în raţii poate influenţa diferenţiat microbiota intestinală, inclusiv și enterococii. Astfel, un obiectiv al cercetărilor efectuate a constat în studierea modului de acţiune a diverselor raţii alimentare cu diferită valoare nutritivă și structură calorică asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali, ceea ce prezintă interes în aspect fiziologic în vederea modulării microbiotei intestinale, și respectiv, a funcţiilor acesteia în direcţia fortificării sănătăţii organismului.

3.3.1. Influența raţiei alimentare de diferită valoare nutritivă asupra incidenței enterococilor intestinali

Valoarea nutritivă, conform definiţiilor existente, reprezintă contribuţia energetică și plastică a nutrienţilor din alimentele consumate de oameni sau animale. Această valoare depinde de cantitatea hranei consumate (digerate și absorbite) și de cantitatea nutrienţilor esenţiali din hrană (proteine, glucide, lipide etc.)

Valoarea nutritivă diferită a raţiei alimentare administrată, în cazul experimentelor efectuate, a fost determinată de cota-parte a principalilor nutrienţi din raţie. Astfel, au fost administrate trei raţii alimentare, respectiv cu exces de proteine, lipide și carbohidraţi.

Testarea raţiilor de diferită valoare nutritivă a fost realizată individual pe animale de laborator (șobolani albi linia Wistar). Contorizarea separată a fost efectuată din considerentele că microbiota intestinală se formează într-un mod specific fiecărui organism și reacţionează în mod diferit la acţiunea anumitor factori. Evidenţa modificărilor comunităţii microbiene individual ar oferi o informaţie mai concretă privind acţiunea factorului alimentar asupra „comportamentului” microorganismelor intestinale și a corelaţiei dintre microbi cu organismul gazdei.

Analiza enterococilor la acţiunea raţiilor alimentare a fost realizată în comparaţie cu conţinutul bifidobacteriilor, lactobacteriilor și escherichiei, pentru a avea o imagine mai amplă a modului, în care factorul alimentar influenţează microbiota intestinală.

Experimentele au fost divizate în trei serii, în fiecare fiind testată raţia cu exces de un anumit macronutrient: proteine, lipide și carbohidraţi, care reprezintă substanţele organice esenţiale pentru creșterea și dezvoltarea organismului atât uman, cât și animal.

Testarea a fost realizată în dinamică: inițial administrării rației; după 5 zile, 10 zile și 15 zile de la administrarea rațiilor alimentare de diferită valoare nutritivă și după 7 zile de restabilire la rația standard de alimentare a șobolanilor în condiții de laborator.

Acțiunea rației alimentare cu exces de proteine asupra valorii numerice a enterococilor și a grupelor de bacterii, analizate în comparație, este reflectată în figura 3.6.

Proteinele alimentare ingerate pot modifica atât diversitatea, cât și compoziția microbiotei intestinale (Portune K.J. et al., 2016), în special, datorită faptului că proteinele sunt substratul principal pentru producerea de către microflora intestinală a SCFA și a metaboliților putrefactivi dăunători (cum ar fi amoniacul, aminele, hidrogenul sulfurat, fenolii și indolii), care la rândul său influențează sănătatea organismului gazdei, în primul rând al tubului digestiv (Wu S. et al., 2022).

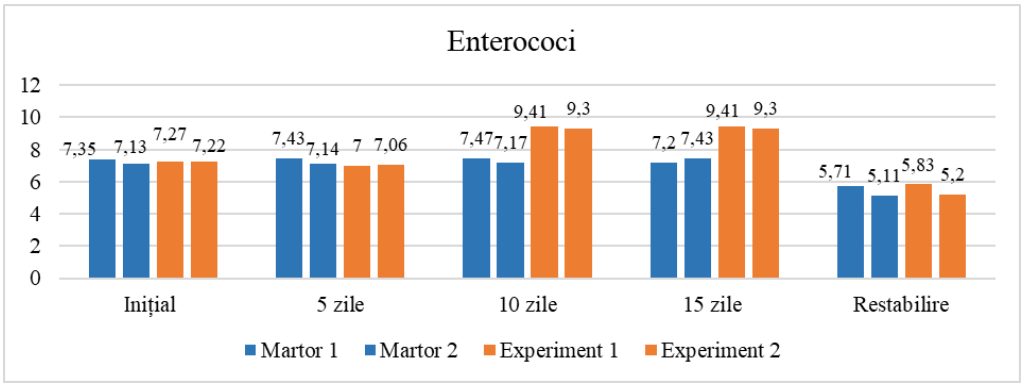
S-a constatat că din toate grupele de bacterii investigate anume valoarea numerică a enterococilor s-a majorat semnificativ la administrarea rației alimentare cu exces de proteine, atât comparativ cu datele inițiale, cât și față de martor (Figura A3.6.).

După 5 zile de la administrarea rației cu exces de proteine, nivelul enterococilor la animalele din loturile experimentale a scăzut cu 3,7% și respectiv 2,2%. La administrarea în continuare (după 10 zile și 15 zile) a rației preponderent proteice s-a constatat majorarea indicelor numerici ai enterococilor cu cca 29,4% și 28,8% comparativ cu datele inițiale, fiind, totodată, monitorizată sporirea conținutului și comparativ cu datele din lotul martor.

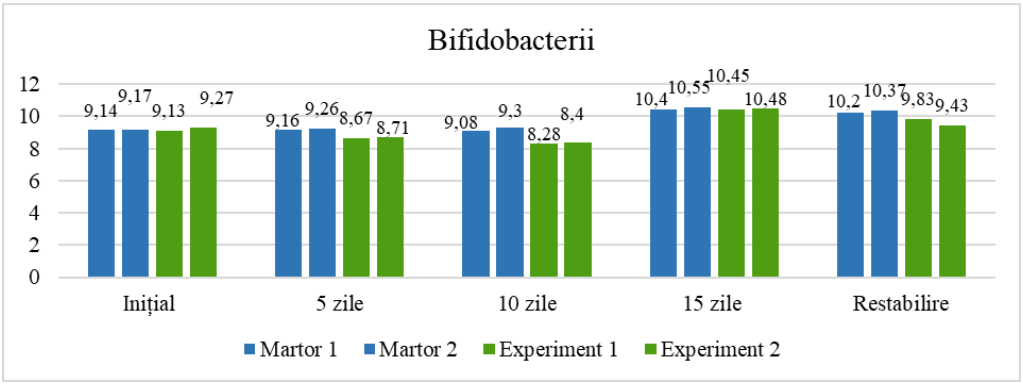
Trecerea animalelor experimentale la alimentația conform rației standard (după 7 zile de restabilire) a determinat micșorarea cotei părți a enterococilor comparativ cu datele inițiale (Figura 3.6.A). De menționat, că atât la animalele din lotul martor, cât și la cele experimentale, nivelul enterococilor după 7 zile de restabilire a alimentației conform rației standard, a fost mai mic în comparație cu datele inițiale. Cel mai probabil, conținutul redus al enterococilor la această etapă a experimentului a fost determinat de acțiunea altor factori, care nu au fost posibil de contorizat.

Pentru a elucida pe deplin care este „comportamentul fiziologic” al enterococilor intestinali la influența rației alimentare cu exces de proteine, modificările conținutului acestor microorganisme au fost monitorizate în comparație cu conținutul bacteriilor benefice ale microbiotei – bifidobacteriile și lactobacteriile, precum și cu cel al bacteriilor patogene – *E. coli*.

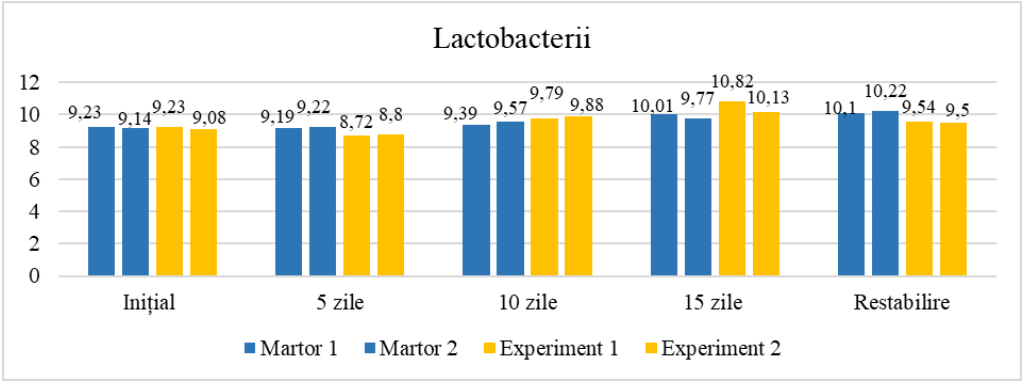
A



B



C



D

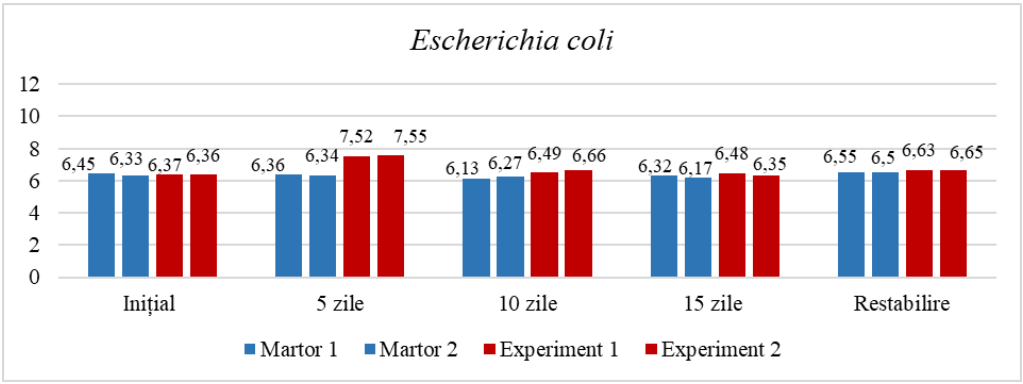


Figura 3.6. Cantitatea de celule bacteriene de enterococi (A), bifidobacterii (B), lactobacterii (C) și *E. coli* (D) (lg la 1 g de conținut intestinal) la acțiunea în dinamică a rației cu exces de proteine

Legenda: Martor (1, 2) – șobolani albi de laborator hrăniți cu rația standard; Experiment (1, 2) - șobolani albi de laborator hrăniți cu rație cu exces de proteine.

Astfel, după 5 zile de administrare a rației cu exces de proteine la animalele experimentale s-a constatat micșorarea conținutului de bifidobacterii respectiv cu 5,1% și 6,1%, iar după 10 zile de regim alimentar cu 9,3% și 9,4% față de datele inițiale. De asemenea, s-a stabilit și reducerea nivelului acestor bacterii comparativ cu valorile înregistrate la animalele din lotul martor. După 15 zile de regim alimentar cu exces de proteine, indicii numerici ai bifidobacteriilor s-au majorat cu 14% și respectiv 13% față de datele inițiale, fiind aproximativ la același nivel cu datele din lotul martor. Revenirea la regimul alimentar standard determină reconstituirea nivelului cantitativ inițial al acestor bacterii (Figura 3.6. B).

Modificările valorilor numerice ale lactobacteriilor sunt asemănătoare cu cele ale bifidobacteriilor, și anume, micșorarea conținutului de celule bacteriene respectiv cu 5,5% și 3,1% după 5 zile de administrare a rației cu exces de proteine. Însă, spre deosebire de bifidobacterii, conținutul lactobacteriilor s-a majorat comparativ cu datele inițiale (și lotul martor) după 10 zile de regim alimentar preponderent proteic: cu 6,1% și respectiv cu 8,8%, iar după 15 zile – respectiv cu 17,2% și 11,6%. După restabilirea regimului alimentar standard, conținutul lactobacteriilor continuă să înregistreze valori mai mari comparativ cu datele inițiale, dar mai mici comparativ cu datele din lotul martor (Figura 3.6. C).

Un alt indicator al statutului fiziologi al tubului digestiv în funcție de dietă, reprezintă modificările bacteriilor patogene, în cazul dat al *E. coli*. Datele obținute relevă că *E. coli* este mai sensibilă la modificarea regimului alimentar, fiind înregistrate valori mai mari (de cca 1,2 ori) ale conținutului acestor bacterii după 5 zile de administrare a rației cu exces de proteine. După 10 zile și 15 zile de regim alimentar preponderent proteic, nivelul escherichiilor scade comparativ cu etapa de 5 zile, dar continuă să înregistreze valori mai mari comparativ cu datele inițiale și cu datele din lotul martor. Aceeași tendință se observă și după restabilirea regimului alimentar normal (standard), când conținutul de *E. coli* rămâne a fi mai mare, dar nu cu mult (cu cca 4%), față de datele din etapa premergătoare administrării rațiilor alimentare și cu cca 1% față de datele din lotul martor (Figura 3.6. D).

Astfel, rația bogată în proteine, în primele 5 zile de administrare induce modificări ale valorilor numerice ale bacteriilor investigate, prin micșorarea conținutului enterococilor, care corelează cu modificările bifidobacteriilor și lactobacteriilor și majorarea nivelului escherichiilor. La administrarea pe o perioadă mai lungă a dietei cu exces de proteine (10-15 zile), se observă majorarea evidentă a efectivului enterococilor de rând cu cel al bacteriilor benefice și patogene. Revenirea la regimul normal de alimentare induce, după 7 zile, restabilirea valorilor numerice a bacteriilor investigate la nivelul datelor inițiale sau la valori identice lotului martor.

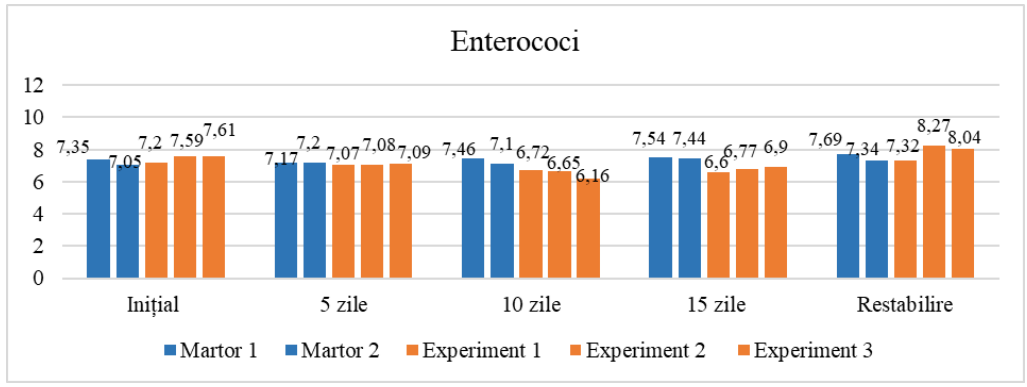
Într-o altă serie de experimente s-a propus de a elucida acțiunea rației alimentare cu exces de lipide (grăsimi). Se cunoaște că lipide reprezintă macronutrenții care furnizează cel mai eficient energia din alimente și care constituie componenta indispensabilă a membranelor celulare, asigurând respectiv funcționalitatea sistemelor fiziologice. Metaboliții lipidici sunt extrem de esențiali pentru o gamă largă de comunicări celulare și metabolism celular, inclusiv, și prin interacțiunea cu microbiota intestinală. Pe de altă parte, microbiota intestinală influențează metabolismul lipidelor organismului-gazdă, prin producerea unor metaboliții, cum ar fi SCFA, acizii biliari secundari și trimetilamina și prin factorii bacterieni derivați proinflamatori, cum ar fi lipopolizaharidele (Schoeler M. et al., 2019).

Rezultatele privind indicii numerici ai enterococilor și a altor grupe de bacterii în conținutul intestinal la animalele de laborator experimentale în rezultatul administrării rației alimentare cu exces de grăsimi timp de 15 zile și după 7 zile de restabilire a regimului normal de alimentare sunt prezentate în figura 3.7. Modificările conținutului enterococilor intestinali la acțiunea rației cu exces de lipide a fost monitorizată din nou în comparație cu alte bacterii – benefice și patogene pentru a elucida modul în care rația cu exces de lipide determină statutul microbiocenozelor intestinale.

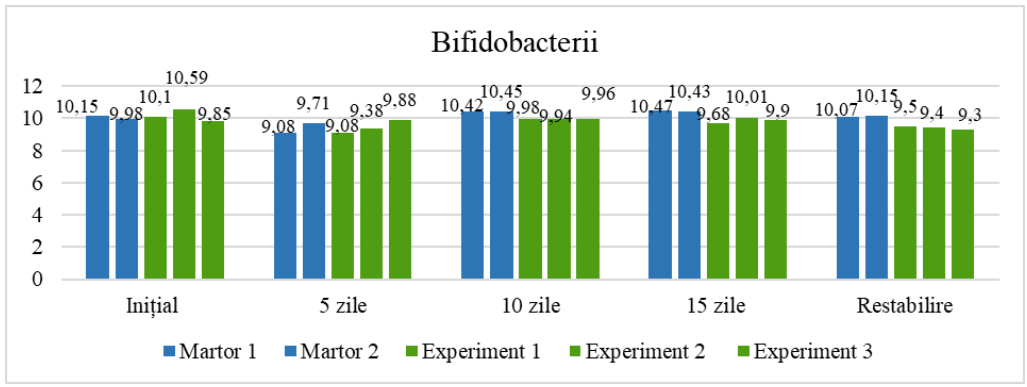
Datele obținute arată că rația bogată în grăsimi cauzează reducerea nivelului de enterococi cu cca 1,8-6,6% chiar din primele 5 zile de regim alimentar stabilit, în comparație cu datele inițiale, înregistrate până la administrarea rației experimentate. O micșorare semnificativă a valorii numerice a enterococilor cu 6,7%; 12,4% și 19,1% se atestă după 10 zile de regim alimentar cu exces de lipide. Dieta bogată în lipide administrată timp de 15 zile a condiționat reducerea efectivului enterococilor la animalele experimentale respectiv cu 8,3%; 9,4% și 10,8% comparativ cu datele inițiale. Aceeași tendință de modificare a cantității de celule bacteriene enterococice se observă și în comparație cu lotul martor (Figura 3.7. A).

După 7 zile de la încetarea administrării rației cu exces de grăsimi și restabilirea regimului alimentar corespunzător animalelor de laborator, nivelul enterococilor tinde către un efect de supercompensare, care a fost dedus din valorile mai mari ale acestor bacterii în conținutul intestinal la animalele experimentale, comparativ cu datele inițiale și cu valorile enterococilor înregistrate la animalele din lotul martor.

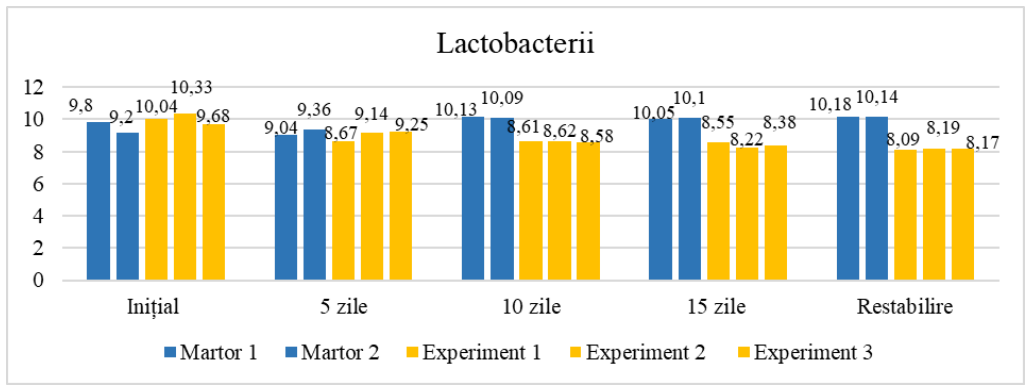
Dieta bogată în lipide a cauzat micșorarea indicelui numeric al bacteriilor benefice – bifidobacteriilor și lactobacteriilor. În cazul bifidobacteriilor s-a observat reducerea valorii numerice a acestora cu 10% - 11,4% după 5 zile; cu 1,2% - 6,1% după 10 zile și cu 4,2% - 5,5% după 15 zile de regim alimentar cu exces de lipide (Figura 3.7. B).



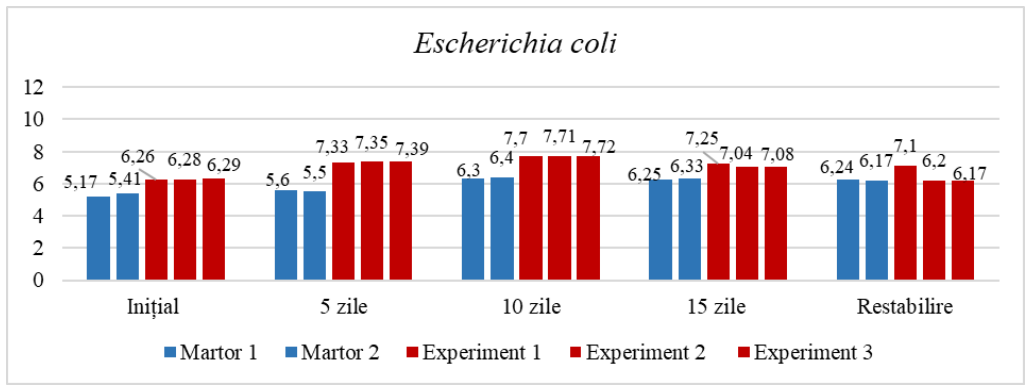
A



B



C



D

Figura 3.7. Cantitatea de celule bacteriene de enterococi (A), bifidobacterii (B), lactobacterii (C) și *E. coli* (D) (lg la 1 g de conținut intestinal) la acțiunea în dinamică a rației cu exces de lipide

Legenda: Martor (1, 2) – șobolani albi de laborator hrăniți cu rația standard; Experiment (1, 2, 3) - șobolani albi de laborator hrăniți cu rație cu exces de lipide.

Cantitatea de lactobacterii în conținutul intestinal la animalele experimentale scade la administrarea rației preponderent lipidice, corespunzător cu: 4,4%; 11,5% și 13,6% după 5 zile; 4,3%; 11,4%; și 16,6% după 10 zile și cu 13,4%; 14,8% și 20,6% după 15 zile de administrare a rației bogate în lipide (Figura 3.7.C).

Atât în cazul bifidobacteriilor, cât și a lactobacteriilor nivelul acestor bacterii nu revine la nivelul datelor inițiale și a lotului martor după 7 zile de restabilire a regimului alimentar standard (Figura 3.7. B,C). Cel mai mult a fost afectat efectivul lactobacteriilor comparativ cu cel al bifidobacteriilor. Aceasta denotă despre acțiunea negativă a rațiilor cu exces de lipide asupra microflorei intestinale.

Mai mult, despre aceasta relevă valorile ridicate ale escherichiei în conținutul intestinal al animalelor experimentale care au primit timp de 15 zile rația bogată în lipide, cele mai mari diferențe cu datele inițiale au fost înregistrate după 10 zile de regim alimentar preponderent cu grăsimi, când a fost atestată majorarea cu 22-23% față de datele inițiale. Restabilirea regimului alimentar normal (după 7 zile) a condiționat restaurarea efectivului de *E. coli* la nivelul datelor inițiale și a lotului martor (Figura 3.7. D).

Astfel, excesul de grăsimi în rația alimentară (grăsimi de origine animală – intura), induce reducerea conținutului enterococilor din conținutul intestinal de rând cu cel al bifidobacteriilor și lactobacteriilor și majorarea conținutului de *E. coli*, ceea ce relevă despre dezechilibrul microbiocenozei intestinale. În acest caz, este important de menționat, că „efectul negativ" al rației bogate în grăsimi se menține și după încetarea administrării, despre ce denotă nivelul redus al bacteriilor benefice – bifidobacteriilor și lactobacteriilor după 7 zile de regim alimentar normal, instalat după 15 zile de dietă cu exces de lipide.

Dintre macronutrienții esențiali organismului uman și animale, carbohidrații au fost cel mai frecvent analizați în aspectul acțiunii lor (sau a rației bogate în glucide) asupra microbiotei intestinale. Acest lucru, în mare parte, se datorează faptului că carbohidrații, în special, carbohidrații complecși, reprezintă o sursă naturală de fibre, care la rândul său este unul din substraturile cele mai preferate și activ utilizate și de către microflora intestinală în activitatea sa metabolică. Pe de altă parte, carbohidrații simpli au o acțiune mai puțin benefică asupra organismului, inclusiv și asupra microbiotei intestinale (Mora-Flores L.P. et al., 2023). Astfel, există o legătură strânsă dintre microbiota intestinală și tipul carbohidraților din rația alimentară.

În seria de experimente în care s-a propus de a stabili acțiunea rației cu exces de glucide asupra efectivului de enterococi intestinali (în comparație cu bacteriile benefice și patogene), sursa de carbohidrați a fost pâinea (Figura 3.8.).

Acțiunea rației bogate în glucide a avut cel mai mare efect (în comparație cu celelalte rații alimentare) de inhibare a efectivului de enterococi. După 5 zile de administrate a rației cu exces de carbohidrați se atestă reducerea nivelului de enterococi cu 14,6%-16,2%. Menținerea regimului alimentar preponderent glucidic (după 10 zile) a condiționat micșorarea cea mai mare a valorii numerice a enterococilor – cu 19,7%-21% comparativ cu datele inițiale, înregistrate până la administrarea rației experimentate. După 15 zile de hrănire a animalelor de laborator cu glucide în exces se atestă, însă, o diminuare mai mică a nivelului de enterococi – cu 11,1%-14,9% comparativ cu etapele precedente de monitorizare (Figura 3.8.A)

Astfel, putem presupune că enterococii sunt sensibili la modificarea procentului de carbohidrați din rația alimentară, ceea ce denotă modificarea valorii numerice a enterococilor în primele 5-10 zile de alimentație cu exces de glucide.

Revenirea la regimul alimentar normal (după 7 zile) a determinat restabilirea conținutului de enterococi intestinali la animalele experimentale la nivelul anterior administrării rației testate.

Pentru a înțelege mai bine care este rolul enterococilor pe fondalul modificărilor induse de rația cu conținut ridicat de glucide în microbiocenoza intestinală a fost monitorizat conținutul bifidobacteriilor și lactobacteriilor – ca model de bacterii benefice și cel al *E. coli* – ca model de agenți patogeni.

Bifidobacteriile și lactobacteriile au fost mai puțin sensibile, comparativ cu enterococii, la introducerea excesului de glucide în hrana animalelor. După 5 zile de regim alimentar bogat în glucide nivelul bifidobacteriilor s-a micșorat cu 2,6%-2,7%, iar a lactobacteriilor cu 7,9%-10,6%. La administrarea timp de 10 zile a rației cu conținut ridicat de glucide se atestă o micșorare dramatică a efectivului de bifidobacterii cu 21,4%-22,2%, pe când nivelul lactobacteriilor s-a redus cu 10,3%-18,0% comparativ cu datele inițiale (Figura 3.8. B, C).

Respectiv, la această etapă de monitorizare (înregistrare) s-a constatat cea mai mare diferență a conținutului de bifidobacterii și enterococi intestinali la animalele experimentale comparativ cu datele inițiale. Nivelul bifidobacteriilor din conținutul intestinal continuă să înregistreze valori joase și după 15 zile de regim alimentar cu exces de glucide: cu cca 20,2% mai mici față de datele inițiale și datele lotului martor. În cazul lactobacteriilor această diferență între valorile inițiale și cele de după 15 zile de hrănire cu glucide în exces a fost de 13,9%-16,8% (Figura 3.8. B, C).

Încetarea administrării rației cu exces de glucide și trecerea la alimentația conform rației standard a condiționat stabilirea efectivului bifidobacteriilor la un nivel mai mare față de datele inițiale, are la același nivel cu datele lotului martor, iar a lactobacteriilor – restabilirea nivelului identic cu cel anterior experimentării rației (Figura 3.8. B, C).

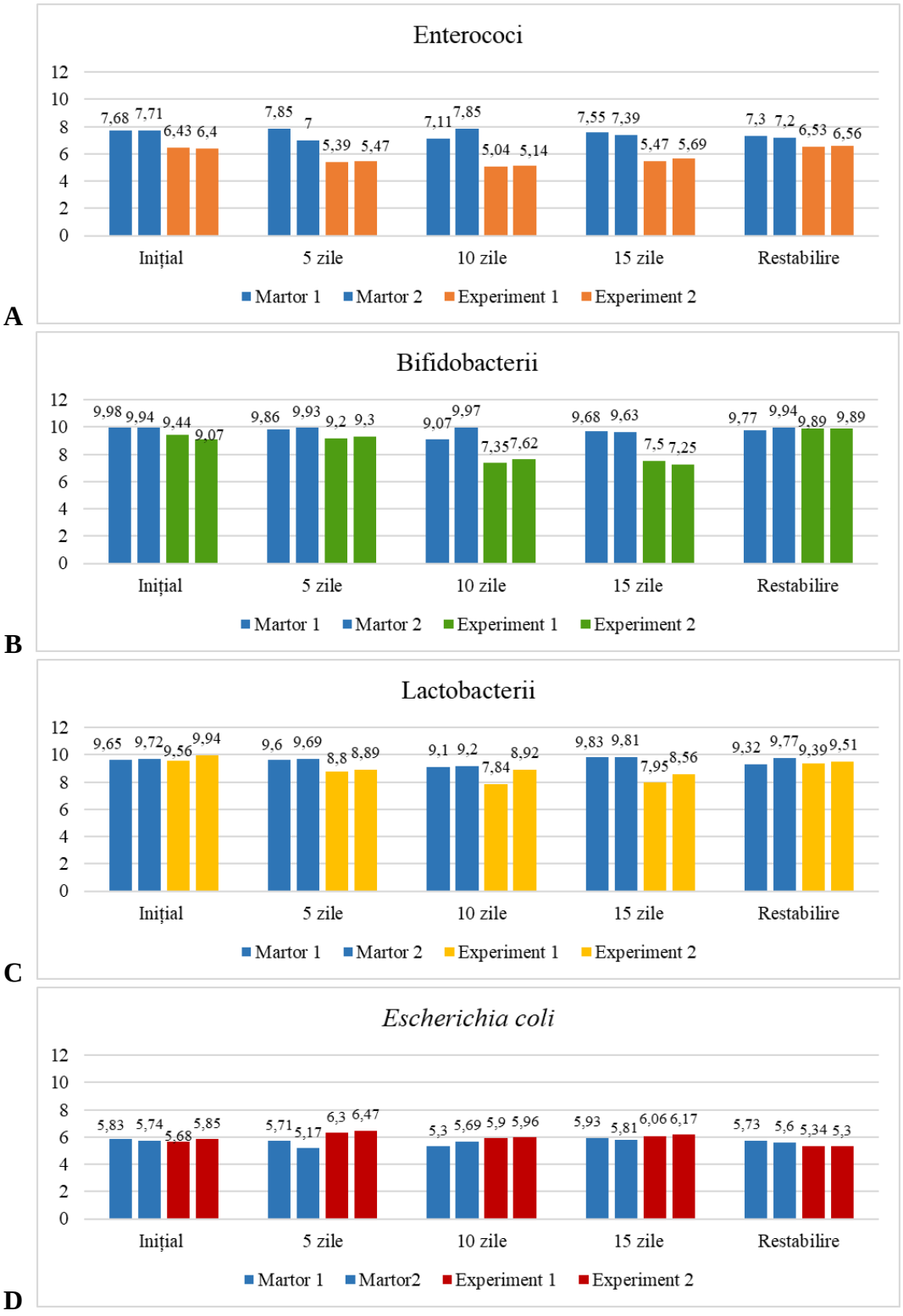


Figura 3.8. Cantitatea de celule bacteriene de enterococi (A), bifidobacterii (B), lactobacterii (C) și *E. coli* (D) (lg la 1 g de conținut intestinal) la acțiunea în dinamică a rației cu exces de carbohidrați

Legenda: Martor (1, 2) – șobolani albi de laborator hrăniți cu rația standard; Experiment (1, 2) – șobolani albi de laborator hrăniți cu rație cu exces de carbohidrați.

Pe de altă parte, rația bogată în glucide a contribuit la majorarea valorii numerice a escherichiilor, după cum urmează: după 5 zile de regim alimentar cu exces de glucide – cu 10,6%-10,9%; după 10 zile – cu 1,9%-3,9% și după 15 zile – cu 5,5%-6,7%. Astfel, *Escherichia* a reacționat prin creșterea mai evidentă a efectivului în primele zile de administrare a rației bogată în carbohidrați, dar nu în măsura cu care au reacționat bacteriile benefice (Figura 3.8. D).

Restabilirea regimului alimentar obișnuit animalelor experimentale a determinat micșorarea valorii numerice a *E.coli* cu 6,0%-9,4% comparativ cu datele inițiale, aceasta fiind mai mică și față de datele înregistrate la lotul martor.

Astfel, excesul de glucide din rația alimentară, și anume de glucide procesate (pâinea), a condiționat micșorarea efectivului enterococilor, bifidobacteriilor și lactobacteriilor și majorarea escherichiilor, ceea ce presupune inducerea dereglării echilibrului benefic al microflorei intestinale.

Totalizând datele obținute privind modificările enterococilor, de rând cu modificările bifidobacteriilor, lactobacteriilor și escheriichiilor din conținutul intestinal la animalele de laborator, provocate de rațiile alimentare cu exces de proteine, lipide și glucide administrate în dinamică pe o perioadă de 15 zile, cu restabilirea ulterioară a alimentației normale, constatăm următoarele:

- Efectivul enterococilor se majorează la administrarea mai mult de 5 zile a rației cu exces de proteine și se micșorează la administrarea rației bogate în grăsimi și carbohidrați. De menționat, că în primele 5 zile de administrare a rației cu exces de proteine, conținutul enterococilor scade, însă, la administrarea timp de 10-15 zile a rației predominant proteice, valorile numerice ale acestor bacterii cresc de circa 1,3 ori. Restabilirea regimului normal (standard) de alimentare determină revenirea efectivului bacteriilor la un nivel identic cu cel inițial experimentării rațiilor alimentare.
- Nivelul numeric al bifidobacteriilor din conținutul intestinal al animalelor experimentale: scade în primele 10 zile de administrare a rației bogate în proteine, iar după 15 zile revine la un nivel mai mare comparativ cu datele inițiale și la același nivel înregistrat la animalele martor; scade pe tot parcursul administrării rației cu exces de lipide și carbohidrați, iar după restabilirea la rația standard, revine la nivelul inițial doar în seriile de experimente în care a fost administrată rația cu exces de proteine și glucide. Regimul alimentar cu exces de grăsimi afectează semnificativ efectivul bifidobacteriilor, care nu se restabilește după 7 zile de alimentație normală conform standardului.
- Valorile numerice ale lactobacteriilor sunt mai mult sau mai puțin identice cu datele inițiale și cu datele din lotul martor, la administrarea rației bogate în proteine și

diminuează la acțiunea excesului de grăsimi și carbohidrați din alimente. Trecerea la regimul standard de alimentare induce restabilirea efectivului lactobacteriilor în seria de experimente, în care a fost testat excesul de proteine și carbohidrați. În seria de experimente în care a fost administrată hrana cu conținut ridicat de grăsimi, la restabilirea regimului alimentar normal, conținutul lactobacteriilor nu revine la nivelul inițial și nici la nivelul depistat la animalele martor. Rația cu exces de grăsimi, ca și în cazul bifidobacteriilor, a avut un efect de inhibare a lactobacteriilor.

- Nivelul cantitativ al escherichhilor se majorează în toate seriile de experimente de administrare a raţiilor alimentare cu exces de proteine, lipide și carbohidrați. Cea mai evidentă majorare a efectivului bacteriilor de *E.coli* se atestă la administrarea raţiei cu conținut ridicat de grăsimi.

În baza datelor descrise, putem presupune că:

- Rația alimentară cu exces de proteine, nu provoacă un dezechilibru evident al microbiocenozei intestinale, întrucât valorile mai mari ale enterococilor, în special după 10-15 zile de administrare a raţiei respective, corelează cu valori înalte ale bacteriilor benefice – bifido- și lactobacteriilor, iar efectivul escherichiilor se menține aproape de nivelul acestor bacterii din lotul martor și la nivelul datelor inițiale. De menționat, că majorarea mai mare a valorii numerice a escherichiilor în primele 5 zile de administrare a hranei bogate în proteine corelează cu micșorarea conținutului de enterococi.
- Rația alimentară cu conținut ridicat de grăsimi a cauzat diminuarea efectivului de enterococi de rând cu scăderea efectivului de bifido- și lactobacterii (a bacteriilor benefice) și majorarea cotei părți a bacteriilor patogene (*E. coli*), ceea ce deduce că excesul de grăsimi condiționează dezechilibrul microflorei intestinale. Mai mult, acest dezechilibru se menține și după încetarea administrării hranei cu exces de lipide, întrucât efectivul bifidobacteriilor și lactobacteriilor, comparativ cu cel al enterococilor și *Escherichia*, nu se restabilește la nivel inițial sau la nivelul lotului martor.
- Excesul de carbohidrați și rația alimentară induce modificări esențiale ale microbiocenozei intestinale, cauzând diminuarea indicilor numerici ai enterococilor, bifidobacteriilor și lactobacteriilor și majorarea conținutului bacteriilor patogene – *E. coli.* Modificările microflorei intestinale nu sunt atât de dramatice, precum în cazul administrării raţiei cu exces de grăsimi, deoarece la restabilirea regimului normal de alimentare, efectivul enterococilor și cel al bacteriilor benefice revine la nivelul inițial și cel al lotului martor, iar cel al patogenilor scade.

Datele obținute în lucrare corelează cu alte studii care au vizat legătură dintre modificările microflorei intestinale a organismului gazdei cu variația și compoziția nutrienților din sursele alimentare. După cum a fost repetat menționat anterior, factorul alimentar, în particular, cantitatea și echilibrul macronutrienților (carbohidrați, proteine și grăsimi) din rația alimentară influențează microbiota intestinală (Jeffery I.B., O'Toole P.W., 2013).

Proteinele alimentare ingerate pot modifica atât diversitatea, cât și compoziția microbiotei intestinale (Portune K.J. et al., 2016), în special, datorită faptului că proteinele sunt substratul principal pentru producerea SCFA și a altor metaboliți ce au acțiune asupra sănătății tractului gastrointestinal și respectiv a organismului (Wu S. et al., 2022).

În unele studii s-a stabilit că dieta bogată în proteine a avut efecte benefice asupra diversității microbiene și asupra modificării speciilor de bacterii *Akkermansia* spp. și *Bifidobacterium* spp., precum și diminuarea bacteriilor *Prevotella* spp., în comparație cu valoarea inițială (Dong T.S. et al., 2020). De menționat, că în studiul la care se face referință, dieta bogată în proteine a fost suplimentată cu fibre vegetale, ceea ce explică efectul benefic al acesteia.

Hrana bogată în carbohidrați a fost asociată cu disbioza și creșterea speciilor de patogeni anaerobi, în special *Bacteroides* (Bhute S.S. et al., 2022). De asemenea, în studii realizate pe șoarecii de laborator, s-a constatat reducerea diversității filogenetice și abundența bacteriilor benefice – *Akkermansia muciniphila*, *Lactobacillus* și *Bifidobacterium* la administrarea grăsimilor de origine animală (untură) (Caesar R. et al., 2015).

Rolul fiziologic al enterococilor în modificările microbiotei induse de rațiile alimentare cu exces de macronurienți derivă din activitatea metabolică prestată pe fondalul substraturilor alimentare din mediul intestinal.

Creșterea conținutului de enterococi la administrarea rației cu exces de proteine a fost documentată și în alte lucrări, fiind observată majorarea efectivului și altor bacterii patogene – *Escherichia* și *Streptococcus* (Mu C. et al., 2017). Abundența sporită a unor bacterii cu potențial patogen, inclusiv și a enterococilor, cel mai frecvent este asociată cu dizbioza intestinală. Însă, majorarea valorii numerice a bacteriilor benefice (cu potențial probiotic) *Lactococcus* și *Lactobacillus* spp. (Varsha K.K. et al., 2016; Wu S. et al., 2022), iar în cazul lucrării de față – a bifidobacteriilor și lactobacteriilor care prezintă și proprietăți proteolitice, poate fi considerată un rezultat benefic, ce echilibrează creșterea bacteriilor patogene.

Pe de altă parte, majorarea indicilor numerici ai enterococilor la administrarea îndelungată a rației bogată în proteine (10, 15 zile) poate fi determinată de faptul că enterococii produc amine biogene în rezultatul reacției de decarboxilare a aminoacizilor (care derivă din

proteinele administrate). Astfel, cu cât mai multe proteine primește organismul, cu atât mai mult crește fondul de aminoacizi, care la rândul său reprezintă substrat pentru activitatea bacteriilor intestinale, inclusiv și pentru enterococi. Aminele biogene care se formează în rezultatul activității metabolice a enterococilor pot fi produse în cantități controlate de organismul uman, unde joacă roluri reglatoare în diferite activități fiziologice, însă, aportul lor excesiv prin dietă poate provoca simptome severe, cu pericol iminent pentru sănătatea consumatorului (Wu S. et al., 2022).

Se cunoaște că în lumenul intestinal aminoacizii suferă o altă reacție de catabolizare și, anume, deaminarea, care rezultă cu producerea amoniacului (un metabolit extrem de toxic) și de cetoacizi, care ulterior servesc în calitate de substrat pentru formarea de către bacteriile intestinale a SCFA – butiratului, lactatului, succinatului etc. Acești metaboliți ai microbiotei intestinale pot servi ca sursă de energie pentru microbiota intestinală, iar o concentrație mare de SCFA poate inhiba creșterea unor bacterii intestinale. Este necesar de a menționa, că SCFA – lactatul, succinatul și formiatul ce rezultă din metabolizarea aminoacizilor proteici și, anume a aminoacizilor BCAA, sunt mai puțin eficienți în combaterea altor bacterii (în special patogene) comparativ cu SCFA, produși în rezultatul metabolizării carbohidraților complecși (fibre) de către bacteriile microflorei intestinale și, anume a butiratului, acetatului, propionatului etc. (Sun Y., O'Riordan M.X., 2013; Diether N.E., Willing B.P., 2019; Liu J. et al., 2022).

Metabolizarea aminoacizilor de către bacteriile proteolitice specializate în colonul distal, ca sursă de energie și material plastic pentru formarea de noi proteine microbiene, are ca rezultat și acumularea diverșilor metaboliți dăunători, care afectează negativ celulele epiteliale ale intestinului și care sunt cauza unor boli (Portune K.J et al., 2016). Aceasta relevă că administrarea îndelungată a dietei proteice afectează negativ sănătatea tubului digestiv și a organismului gazdei.

Astfel, creșterea valorii numerice a enterococilor, precum și a bacteriilor benefice după administrarea timp de 10-15 zile a dietei cu exces de proteine, poate fi considerată ca o reacție de răspuns (compensare) la majorarea aminoacizilor în lumenul intestinal și o reacție de control al patogenilor. Drept argument este nivelul redus al esherichiilor, comparativ cu enterococii, bidifidobacteriile și lactobacteriile, la administrarea timp de aproximativ 2 săptămâni a rației cu exces de proteine. Pe de altă parte, pentru sănătatea tubului digestiv aportul de proteine în rația alimentară trebuie să fie echilibrat: un aport mai mare sau mai mic de proteine ar putea avea un impact negativ asupra microbiotei intestinale și, ulterior, asupra sănătății organismului gazdei.

După cum a fost relatat anterior, hrana bogată în lipide, iar în cazul experimentului efectuat în grăsimi de origine animală (untura), induce diminuarea efectivului enterococilor, bifidobacteriilor și lactobacteriilor și majorarea nivelului de *Escherichia*.

În informația din literatura de specialitate se menționează studiile (în special efectuate pe animale de laborator), prin care s-a constatat că dieta cu conținut ridicat de grăsimi afectează rapid și semnificativ microbiomul intestinal. S-a stabilit că microbiota intestinală este capabilă să transforme lipidele digerate în colon, inclusiv acizii grași sau colesterolul, contribuind la producerea de metaboliți cu efecte potențiale asupra sănătății (Gérard Ph., 2020). Prin urmare, lipidele influențează microbiota intestinală atât ca substrat pentru procesele metabolice bacteriene, cât și prin inhibarea creșterii bacteriilor ca rezultat al acțiunii toxice a metaboliților lor (Schoeler M., Caesar R., 2019).

Legătura dintre consumul de lipide, starea microbiotei intestinale și sănătatea organismului este determinată de mai mulți factori, principalul fiind natura lipidelor consumate. La nutriția cu lipide „sănătoase" – acizi grași nesaturați, microbiota intestinală este capabilă să-i transforme în molecule biologic active ce influențează imunitatea gazdei și sănătatea metabolică (Ye Z. et al, 2021).

Pe de altă parte, consumul mai mare de grăsimi, în special de origine animală, este asociat cu modificări nefavorabile ale microbiotei intestinale, cu valori ridicate ale factorilor proinflamatori plasmatici, care au consecințe pe termen lung asupra sănătății organismului gazdei (Wan Y. et al., 2019).

Microbiota intestinală mediază metalismul lipidic al organismului gazdei prin producerea de metaboliți cum ar fi: SCFA, acizi biliari secundari și trimetilamină, precum și prin factorii bacterieni proinflamatorii ca lipopolizaharidele (Schoeler M., Caesar R., 2019). Datele mai multor studii relevă că consumul în cantități mai mari sau pe termen lung de lipide induce disbioză intestinală, prin inducerea proceselor inflamatorii din intestin și creșterea permeabilității intestinale. În particular, se constată modificări ale funcției barierei intestinale în intestinul subțire și gros (Hamilton M.K. et al., 2015), ale permeabilității transcelulare în intestinul gros, procese inflamatorii în ileon și expansiunea unor patobionți, precum și creșterea incidenței de colită (Devkota S. et al., 2012). Disbioza intestinală ca rezultat al dezechilibrului dintre bacteriile benefice și dăunătoare, transformă comunitatea microbiocenozei intestinale, astfel încât speciile dominante de bacterii sunt depășite numeric de microbii subprezenți, care cresc în abundență, fiind constatată, drept urmare, degradarea mucusului și reducerea barierei intestinale care cauzează ulterior „inflamația sistemică de grad scăzut" (Tran C.D. et al., 2019).

Procesele inflamatorii intestinale condiționate de consumul ridicat de lipide sunt mediate de lipopolizaharidele produse de bacterii, iar creșterea permeabilității intestinale de reducerea joncțiunilor strânse intestinale și degradarea stratului de mucus intestinal (Rohr MW et al., 2020). În particular, rația cu conținut ridicat de lipide provoacă disbioza intestinală prin creșterea raportului dintre bacteriile Gram negative/Gram pozitive. Deplasarea raportului către bacteriile Gram negative, corelează cu creșterea concentrației de lipopolizaharide plasmatice, ceea ce condiționează procese inflamatorii în intestin.

În general, studiile relativ recente au arătat că o dietă bogată în grăsimi de origine animală și acizi grași saturați poate modifica microbiota intestinală, prin creșterea lipopolizaharidelor, trimetilaminei-N-oxid și scăderea concentrației de SCFA. S-a constatat că alimentația cu exces de acizi grași saturați, induce diminuarea nivelului bacteriilor: *Bacteroides, Prevotella, Lactobacillus* ssp. și *Bifidobacterium* spp. (Cani P.D., et al., 2008; Murphy E.F. et al., 2010; Zhang C. et al., 2010), iar profilul microbiotei intestinale devine identic cu cel al persoanelor și animalelor obeze.

Într-un studiu realizat de către Zhang C. și alții (2010) s-a stabilit reducerea conținutului de enterococi în cazul, când șoarecii de laborator au fost hrăniți cu dietă bogată în grăsimi. În cercetările ulterioare a fost constatat din nou tendința de diminuare a efectivului enterococilor și majorarea conținutului de *Escherichia* de rând cu alte bacterii patogene (Beam A. et al., 2021).

Corelarea inversă dintre enterococii intestinali cu consumul ridicat de calorii sau grăsimi, a fost stabilită într-un studiu realizat pe copii sugari, și anume, a fost constatată adăugarea excesivă în greutate în timpul alăptării la subiecții care au avut o abundență redusă de enterococi intestinali (Laursen M.F. et al., 2020).

Astfel, în baza datelor privind indicii numerici ai enterococilor, a bacteriilor benefice și a celor patogene, obținute în rezultatul administrării rației cu exces de grăsimi de origine animală, putem presupune că aceasta, după cum a fost relatat mai sus, condiționează dezechilibrul microbiotei intestinale, proces ce este însoțit de modificarea statutului fiziologic în mediul intestinal (inflamații și modificarea funcției barierei intestinale). Diminuarea valorii numerice a enterococilor, indică faptul că aceștia nu capătă caractere patogene (virulente) în condițiile dezechilibrului microbiocenozei intestinale și mai degrabă se comportă ca comensali, întrucât valorile acestora corelează cu cele ale bifidobacteriilor și lactobacteriilor.

Mai mult, întrucât în alte studii s-a dovedit că unele tulpini de enterococi (de exemplu *E. faecium* WEFA23) pot avea efecte benefice asupra sindromului metabolic la șobolani, indus de dieta bogată în grăsimi sau înalt calorice, prin scăderea semnificativă a greutății corporale, a nivelului lipidelor serice (colesterol total, triacilgliceroli), a nivelului de glucoză și rezistența la

insulină (Zhang F. et al., 2017), putem presupune rolul benefic al enterococilor în menținerea sănătății tubului digestiv pe fondalul consumului ridicat de grăsimi.

Datele privind legătura dintre microbiota intestinală și consumul de carbohidrați sunt destul de controversate pe motiv că sursa și natura glucidelor din rația alimentară influențează în mod diferit componentele microbiocenozei intestinale. Carbohidrații reprezintă sursa cea mai importantă de energie nutritivă pentru organismul uman și animal. Particularitățile digestiei și metabolizării carbohidraților și conexiunea acestor procese cu microbiota intestinală sunt în vizorul mai multor studii. A fost dovedită corelația pozitivă dintre consumul hranei bogate în fibre și oligozaharide și bacteriile benefice ale microflorei intestinale. Pe de altă parte, consumul alimentelor bogate în amidon induce modificări în microbiota intestinală prin creșterea coraportului bacteriilor potențial patogene (Mora-Flores L.P. et al., 2023).

Efectul benefic al consumului de carbohidrați complecși (fibre alimentare) asupra microflorei intestinale se rezumă la producția de SCFA, care după cum a fost menționat anterior, influențează pozitiv procesele fiziologice intestinale cu repercursiune asupra sănătății organismului gazdei. SCFA, în special, acidul butiric are multiple efecte benefice asupra sănătății intestinale, deoarece poate fi absorbit rapid de celulele epiteliale ale ileonului terminal și intestinului gros, în special în colon, oferind astfel energie celulelor epiteliale pentru a stimula proliferarea, diferențierea, maturarea acestora și de a reduce apoptoza celulară (Cummings J.H., Macfarlane G.T., 1997). SCFA participă astfel în homeostazia răspunsului imun, reglează producția de citokine proinflamatorii de către macrofagele colonice, având efect protector demonstrat față de bolile inflamatorii.

Utilizarea carbohidraților complecși, precum și a oligozaharidelor care sunt cunoscute ca „prebiotice”, ar putea avea un potențial mare în prevenirea și eventual tratamentul obezității și a bolilor cardiometabolice și inflamatorii asociate cu modificări ale microbiotei intestinale.

În ce constă efectul benefic al lor? Carbohidrații complecși, și anume fibrele (numite și carbohidrați nedigerabili), întrucât nu sunt metabolizați enzimatic în intestinul subțire, ajung în intestinul gros (cu cea mai mare și diversă abundență a microorganismelor intestinale), unde sunt supuși degradării de către microorganismele rezidente. Fibrele reprezintă sursa principală de carbohidrați accesibili microbiotei, ce pot fi utilizați de către microbii intestinali ca sursă de energie și de către organismul-gazdă ca sursă de carbon. În acest proces, aceste glucide modifică mediul intestinal, ceea ce le cataloghează ca „prebiotice eficiente” și determină abundența bacteriilor benefice – bifidobacteriile, bacteriile acidolactice, lactobacilii etc. Sursele de prebiotice includ cereale integrale bogate în fibre și oligozaharide nedigerabile, cum ar fi fructanul, polidextroza, inulina, fructooligozaharidele, galactooligozaharidele și

arabinooligozaharidele. Valori înalte ale bifidobacteriilor s-a constatat și la administrarea mono- și dizaharidelor naturale (Seo Y.S. et al., 2020).

Pe de altă parte, consumul ridicat de glucide ușor digerabile, în special de către populația din mediul urban, care corelează și cu modul sedentar de viață, provoacă dereglări în tubul digestiv legate de modificarea permeabilității intestinale și ale bacteriocenozei intestinale (David L.A. et al., 2014; Seo Y.S. et al., 2020).

Consumul de carbohidrați ușor digerabili (rafinați/simpli) și procesați tehnologic pot inversa modificările benefice ale metabolismului microbian intestinal care sunt determinate de consumul de carbohidrați complecși. Microbiota, în acest caz, de asemenea are un rol cheie în medierea efectelor nocive intestinale cauzate de dieta bogată în carbohidrați (Zhang Y. et al., 2020).

În ultimul timp în literatura de specialitate este utilizat termenul de „microbiota intestinală industrializată", care se referă la bacteriocenoza lipsită de capacitatea de a degrada fibrele alimentare, sau/și care este reprezentată de tulpini sau grupe de bacterii necaracteristice sau neîntâlnite anterior în microbiota populației umane (mai des urbane decât rurale), trăsături, care cel mai probabil sunt atribuite schimbărilor recente ale stilului de viață (Sonnenburg E.D., Sonnenburg J.L., 2019). Formarea acestei „microbiote industrializate" este în mare parte condiționată de consumul carbohidraților simpli. S-a stabilit că aportul ridicat de carbohidrați simpli – glucoză și fructoză este asociat cu dezvoltarea bolii hepatice grase nealcoolice la subiecții umani și animalele de laborator (șoareci), și corelează cu abundența modificată a unor grupe de bacterii intestinale, cum ar fi *Bifidobacterium, Lactobacillus*, Bacteroides și *Ruminococcus* (Coker J.K. et al., 2021). Cel mai frecvent, dieta bogată în carbohidrați este asociată cu disbioza și creșterea speciilor de patogeni anaerobi, în special, *Bacteroides* (Bhute S.S. et al., 2022). De exemplu, șoarecii hrăniți cu zaharoză au prezentat disbioză intestinală cu o abundență crescută de *Bacteroides* și scăzută de *Lactobacillus reuteri* (Seo Y.S. et al., 2020). Șobolanii cu acces *ad libitum* la soluția de zahăr aveau o abundență mai mare de bacterii patogene, inclusiv, din phylumul *Proteobacteria*, în comparație cu șobolanii din lotul martor, cărora li s-a administrat apă (Noble E.E. et al., 2016).

Calitatea celui mai popular aliment din toate timpurile – pâinea, de asemenea, are efect asupra sănătății organismului, inclusiv și asupra microbiocenozei intestinale, în special datorită ingredientelor și procesului tehnologic. Pentru a fi accesibilă unui grup mare de populație (în special social vulnerabile) în producerea pâinii simple nu se utilizează carbohidrații complecși, benefici sănătății și se aplică un proces tehnologic rapid, cu utilizarea aditivilor alimentari, care afectează negativ calitatea ingredientelor (Wang Y. et al., 2023). Aceasta are o influență negativă

asupra microbiotei intestinale. Consumul pâinii din făină rafinată, fără adaos de fibre (cereale integrale) induce o abundență mai mare a bacteriilor patogene proinflamatorii și mai mică a bacteriilor benefice, implicate în degradarea fibrelor, ceea ce condiționează dezvoltarea disbiozei intestinale și a consecințelor acesteia – procese inflamatorii și modificarea funcției barierei intestinale, fiind asociate cu sindromul colonului iritabil (Costabile A. et al., 2014).

Modificările microbiotei intestinale, cauzate de consumul excesiv de carbohidrați, în special rafinați, induc obezitatea, rezistența la insulină, inflamația și disfuncția metabolică, ceea ce contribuie la dezvoltarea sindormului metabolic (Mousavi S.M. et al., 2022).

Rolul fiziologic al enterococilor la consumul excesiv de carbohidrați nu este elucidat. Se cunoaște că fermentarea carbohidraților de către enterococi permite acestui gen să prospere în diverse medii. Cel puțin 13 zaharuri sunt metabolizate de toate speciile de *Enterococcus* și încă peste 30 sunt utilizate de cel puțin doi membri ai genului. Metabolizarea diverșilor carbohidrați (nu numai monomeri, dar și polimeri) oferă enterococilor avantaj în colonizarea mediilor competitive, în special a tractului gastrointestinal la om și animale (Ramsey M. et al., 2014).

În experimente pe animalele de laborator a fost dovedită eficiența unor tulpini de bacterii acidolactice în reducerea hiperglicemiei induse de zaharoză. Tulpina enterococică – *Enterococcus faecalis* YM0831, de asemenea, a demonstrat proprietatea de a diminua hiperglicemia indusă de zaharoză (Matsumoto Y. et al., 2019).

Datele obținute în rezultatul testării rației cu conținut ridicat de carbohidrați au relevat diminuarea efectivului enterococilor, precum și a bifidobacteriilor și lactobacteriilor, ceea ce corelează cu informația din literatura de specialitate. Sincronizarea dintre nivelul numeric al enterococilor cu cel al bacteriilor benefice (ce contribuie la sănătatea tubului digestiv) la consumul în exces de carbohidrați, ne permite să deducem caracterul de comensali al acestora, întrucât, după cum a fost menționat anterior, microbiota comensală este afectată de consumul sporit de carbohidrați rafinați sau procesați, ce rezultă cu multiplicarea bacteriilor patogene (în cazul dat al escherichiilor) și, respectiv, cu dezvoltarea disbiozei.

Rezultatele obținute și analizate indică cert că consumul rațiilor în care predomină substanțial un anumit macronutrient are efecte negative asupra microbiocenozei intestinale și respectiv asupra sănătății organismului gazdei. Mai mult, tendințele de a controla greutatea corporală prin administrarea monodietelor, care sunt destul de populare, nu i-au în calcul efectele nocive și riscul pentru sănătate a persoanelor ce le-au urmat.

3.3.2. Influența rației alimentare cu diferită structură calorică asupra incidenței enterococilor intestinali

În scopul menținerii echilibrului microbiocenozelor intestinale în vederea asigurării sănătății tubului digestiv și, respectiv, a organismului gazdei, consumul alimentelor trebuie să fie echilibrat. Pentru a elucida în ce mod diferite coraporturi dintre nutrienții esențiali (care nu depășesc limitele recomandate de specialiști) influențează efectivul enterococilor în raport cu alte grupe de bacterii deja analizate, s-a propus de a studia acțiunea rațiilor alimentare cu diferită structură calorică.

Rațiile cu diferită structură calorică au fost elaborate și testate în cadrul Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie în cadrul proiectului 15.817.04.01A „Alimentația în raport cu tipurile constituției. Impactul alimentației asupra sanogenității gameților masculini" (2015-2019).

Pentru atingerea obiectivului propus au fost realizate două serii de experimente: *in vitro* și *in vivo.* Primul experiment efectuat *in vitro* și a avut ca scop evidențierea rațiilor cu efect mai pronunțat asupra enterococilor intestinali. Acest experiment a inclus 7 loturi, fiind testate 6 rații alimentare noi elaborate, după cum urmează: Lotul I – lotul martor, în care inocularea *enterococilor* a fost efectuată în mod separat, pe mediu nutritiv destinat studiului enterococilor; loturile II-VII – loturi experimentale, în care inocularea *enterococilor* a fost efectuată în comun cu decoctul a șase variante de rații alimentare. Detaliat schema experimentelor și structura rațiilor elaborate este descrisă în capitolul 2.

Rezultatele obținute în experimentele efectuate *in vitro* (Tabelul 3.6.) relevă despre acțiunea diferențiată a rațiilor alimentare utilizate asupra indicilor cantitativi ai enterococilor.

Datele obținute demonstrează că inocularea separată a enterococilor pe mediul nutritiv selectiv al lor, a asigurat multiplicarea până la nivelul cantitativ de 8,69 lg/ml. Inocularea în comun (asociere) cu decoctul a 6 variante de rații alimentare nou-elaborate a condus la obținerea diferitor rezultate. Astfel, în loturile unde au fost utilizate rațiile cu nr. 1, 2, 3, ce se caracterizează printr-o concentrație mai mare de lipide, cantitatea de celule microbiene este mai mică, comparativ cu lotul I, și anume – 6,38; 6,63 și 6,17 lg/ml. Rațiile alimentare 4, 5, 6 (cu concentrație mai mare de proteine și glucide) au asigurat un nivel cantitativ al celulelor microbiene identic cu cel al lotului I (martor) – 8,59; 8,77 și 8,50 lg/ml. Reiese, că rațiile alimentare utilizate au acționat asupra procesului de multiplicare a enterococilor în mod diferit, asigurând un nivel divers de dezvoltare al acestor bacterii – de la 6,17 până la 8,77 lg/ml (Tabelul 3.6.).

Tabelul 3.6. Valoarea numerică a enterococilor inoculați *in vitro* separat și în comun cu rațiile elaborate în premieră

Loturile	Modul de inoculare	Cantitatea de celule microbiene vii la 1 ml de suspensie, logaritm zecimal (lg / ml)	Diferența față de control, %
I – martor	*	8,69±0,65	
II	** inocularea în comun cu rația 1	6,38±0,39	-26,58
III	** inocularea în comun cu rația 2	6,63±0,39	-23,70
IV	** inocularea în comun cu rația 3	6,17±0,48	-28,99
V	** inocularea în comun cu rația 4	8,59±0,63	-1,15
VI	** inocularea în comun cu rația 5	8,77±0,67	+0,92
VII	**, inocularea în comun cu rația 6	8,50±0,64	-2,18

Notă: * inoculare pe mediu standard, ** inoculare în comun cu 6 rații alimentare.
Rațiile alimentare testate în loturile II-VIII sunt rațiile alimentare prezentate în tabelul 2.6. din capitolul 2.

Este necesar de menționat că bacteriile din genul *Enterococcus* în experimentele efectuate au demonstrat sensibilitate diferită la componența primară a rațiilor alimentare.

Astfel, o acțiune inhibitoare asupra enterococilor au manifestat rațiile alimentare 1, 2, 3. De menționat, că rația 1 (ce conține 8% proteine, 35% lipide și 57% carbohidrați) și 3 (ce conține 10% proteine, 31% lipide și 59% carbohidrați) a avut cel mai mare efect de inhibare numerică a bacteriilor. Rațiile 4 și 6 au contribuit într-o măsură mai mică la micșorarea numerică a acestor microorganisme. Rația alimentară 5 (ce conține 12% proteine, 27% lipide și 61% glucide) a acționat ca stimulant, contribuind la creșterea neesențială a numărului acestor bacterii.

Având în vedere că în tractul digestiv toți reprezentanții bacteriocenozei se dezvoltă în asociere, s-a propus de a studia „comportamentul” enterococilor în corelație cu alte bacterii intestinale – reprezentanți ai genurilor: *Bifidobacterium, Lactobacillus* și *Escherichia* la cultivarea atât pe mediul nutritiv standard, cât și pe medii ce conțineau decoctul rațiilor alimentare elaborate, în conformitate cu schema descrisă mai sus. Rezultatele obținute sunt reflectate în tabelul 3.7.

Cultivarea în asociație a bacteriilor pe mediul de cultură standard (lotul martor) a evidențiat dominanța numerică a bifidobacteriilor, lactobacteriilor și a enterococilor, comparativ cu *E.coli*. Inocularea acestor bacterii pe medii în comun de decoctul rațiilor alimentare studiate (loturile I-VI) a relevat aceeași corelație între indicii numerici ai bifidobacteriilor, lactobacteriilor, enterococilor și *Escherichia*, deosebirea fiind față de datele din lotul martor. Concentrația minimă a reprezentanților genurilor *Bifidobacterium, Lactobacillus* și *Enterococcus*

a fost observată în lotul I (inocularea cu decoctul rației nr. 1, cu structura calorică: 8% proteine, 35% grăsimi și 57% glucide). În loturile II (inocularea cu rația nr. 2 cu structura calorică: 9% proteine, 33% grăsimi și 58% glucide) și lotul III (inocularea cu rația 3 cu structura calorică: 10% proteine, 31% grăsimi și 59% glucide) se atestă majorarea conținutului bacteriilor genurilor enumerate comparativ cu lotul I, însă, această majorare este mica, în comparație cu grupa de control (martorul).

Tabelul 3.7. Cantitatea de bacterii din genurile obligative și facultative ale tractului digestiv la cultivarea *in vitro* pe rațiile elaborate în premieră

Varianta rației	Genul bacteriei	Numărul de celule microbiene vii la 1 ml de suspensie, în logaritmi zecimali (lg/ml)	Diferența față de control, %
Martor * inocularea separată	*Bifidobacterium*	11,63±0,48	
	Lactobacillus	9,96±0,45	
	Escherichia	6,53±0,55	
	Enterococcus	9,59±0,15	
I ** inocularea în comun cu rația 1	*Bifidobacterium*	8,38±0,44	-27,94
	Lactobacillus	7,17±0,48	-28,01
	Escherichia	5,49±0,58	-15,92
	Enterococcus	8,32±0,39	-13,24
II ** inocularea în comun cu rația 2	*Bifidobacterium*	9,50±0,52	-18,31
	Lactobacillus	8,46±0,45	-15,06
	Escherichia	5,82±0,45	-11,02
	Enterococcus	8,38±0,49	-12,61
III ** inocularea în comun cu rația 3	*Bifidobacterium*	8,75±0,45	-25,02
	Lactobacillus	7,98±0,30	-19,87
	Escherichia	5,88±0,58	-9,95
	Enterococcus	8,69±0,46	-9,38
IV ** inocularea în comun cu rația 4	*Bifidobacterium*	11,34±0,45	-2,49
	Lactobacillus	9,43±0,36	-5,32
	Escherichia	4,59±0,62	-29,70
	Enterococcus	9,46±0,48	-1,35
V ** inocularea în comun cu rația 5	*Bifidobacterium*	11,92±0,37	+2,49
	Lactobacillus	10,20±0,41	+2,40
	Escherichia	4,50±0,35	-31,08
	Enterococcus	9,96±0,45	+3,85
VI ** inocularea în comun cu rația 6	*Bifidobacterium*	11,73±0,41	+0,85
	Lactobacillus	10,17±0,45	+2,10
	Escherichia	4,79±0,69	-26,64
	Enterococcus	9,69±0,48	+1,04

O majorare evidentă a nivelului de bacterii a fost depistată în lotul IV (inocularea cu rația nr. 4 cu structura calorică: 11% proteine, 29% grăsimi și 60% glucide), indicii numerici ai bifidobacteriilor, lactobacteriilor și enterococilor fiind aproximativ la nivelul celor din lotul martor (Tabelul 3.7.).

În lotul V (inocularea cu rația nr. 5, cu structura calorică: proteine – 12%, grăsimi – 27% și glucide – 61%), a fost marcată creșterea considerabilă a valorii numerice a bifidobacteriilor, lactobacteriilor și enterococilor atât comparativ cu lotul-martor, cât și în raport cu celelalte loturi experimentale, constatându-se cel mai prielnic mediu nutritiv pentru efectivul asociației de bacterii luate în studiu. Astfel, concentrația bacteriilor genului *Bifidobacterium* a crescut cu 2,49%, a genului *Lactococcus* cu 2,40% și a genului *Enterococcus* cu 3,85%.

În lotul VI (inocularea cu rația nr. 6, cu structura calorică: proteine – 14%, grăsimi – 25% și glucide – 61%) numărul genurilor de bacterii investigate a scăzut ușor comparativ cu varianta V, dar a rămas la un nivel cantitativ mai mare în comparație cu controlul.

Pe de altă parte, nivelul cantitativ al bacteriilor *E. coli* în toate loturile experimentale a semnalat o descreștere față de valorile din varianta control. Cea mai semnificativă diminuare a acestor bacterii comparativ cu lotul martor – cu -31,08%, s-a constatat în lotul V, fiind, totodată, și cea mai mare din loturile experimentale. Referitor la acest fapt trebuie de remarcat, că *E. coli* se referă la microorganismele condiționat patogene, iar menținerea acestei bacterii la un nivel mic, relevă atât despre efectul benefic al rațiilor testate, cât și a „parteneriatului" stabilit între bifidobacterii, lactobacterii și enterococi ce, probabil, menține efectivul acestor bacterii la un nivel ce nu determină dezvoltarea patogenității lor.

În cazul enterococilor, la inocularea în asociație cu alte bacterii pe medii ce conțin rațiile cu nr. 1, 2, 3, s-a observat aceeași tendință de diminuare a valorii numerice, însă, această diminuare a fost mai mică: cu 13,24%, 12,61% și 9,38% respectiv. Spre comparare, în cazul inoculării exclusiv numai a enterococilor pe mediile ce conțineau rațiile 1, 2 și 3, cantitatea enterococilor s-a micșorat cu 26,58%, 23,70% și 28,99% respectiv (tabelul 3.6). Putem presupune că inocularea în asociere cu alte bacterii intestinale, în special, cu bifidobacteriile și lactobacteriile, influențează favorabil efectivul de enterococi.

Mai mult, în loturile în care inocularea s-a efectuat pe medii ce conțineau rațiile alimentare cu nr. 4, 5 și 6 s-a constatat o diminuare nesemnificativă (în lotul IV) și o majorare a indicilor numerici ai enterococilor ca și în cazul precedent (inoculării separate a lor) (Tabelul 3.6. și 3.7).

Așadar, în baza rezultatelor obținute s-a constat că rațiile alimentare testate au avut acțiune diferită asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a bacteriilor genului *Enterococcus*. Rațiile 1, 2 și 3 au manifestat acțiune de inhibare a microorganismelor, iar rația 5 a avut o acțiune de stimulare asupra acestor bacterii.

Deși, creșterea indicilor numerici ai enterococilor este deseori asociată cu disfuncții intestinale, în cazul dat majorarea nivelului acestora nu indică o anumită stare patologică,

întrucât valoarea numerică a enterococilor corelează cu cea a bacteriilor benefice – a bifidobacteriilor și a lactobacteriilor.

Deci, se poate afirma că indicii cantitativi ai enterococilor, în mare măsură, depind de componența rațiilor alimentare. De aceea, considerăm că valoarea numerică a lor poate fi reglată și menținută nu numai cu ajutorul preparatelor microbiene cu acțiune probiotică, ci și prin utilizarea rațiilor alimentare, care reflectă influența prebiotică a lor asupra microbiotei, inclusiv, a enterococilor intestinali.

În scopul confirmării rezultatelor obținute *in vitro* au fost efectuate experimente *in vivo* pe șobolani albi de laborator, linia Wistar. Pentru testarea *in vivo* a acțiunii rațiilor alimentare asupra enterococilor intestinali, șobolanii au fost grupați în patru loturi experimentale. În primul lot a fost administrată rația alimentară, ce conținea 8% proteine, 35% lipide și 57% glucide (rația 1); în lotul II – rația cu structura de 11% proteine, 29% lipide și 60% glucide (rația 4); în lotul III – rația cu structura de 12% proteine, 27% lipide și 61% glucide (rația 5) și lotul IV – rația ce conține 14% proteine, 25% lipide și 61% glucide (rația 6). În general, au fost selectate rațiile care au manifestat acțiune diferită asupra indicilor numerici ai enterococilor (în experimente *in vitro*). De exemplu, în cazul rației nr. 1 (cu structura de 8% proteine, 35% lipide și 57% glucide) au fost înregistrați cei mai mici indici numerici ai bacteriilor, iar în cazul rațiilor 4, 5 și 6 – valori pozitive ale lor.

Structura rațiilor alimentare testate și gruparea animalelor de laborator conform loturilor experimentare sunt indicate în tabelul 3.8.

Tabelul 3.8. Structura calorică a rațiilor alimentare elaborate și testate *in vivo*, %

Componentele nutritive	**Cantitatea, %, în corespundere cu rațiile alimentare testate / loturile experimentale**			
	1/I	**4/II**	**5/III**	**6/IV**
Proteine	8	11	12	14
Lipide	35	29	27	25
Carbohidrați	57	60	61	61

În rezultatul testărilor a fost determinată masa corporală a animalelor experimentale și indicii cantitativi ai bacteriilor *Enterococcus*, iar datele sunt prezentate în tabelul 3.9 și 3.10.

Analiza datelor obținute privind masa corporală a animalelor testate a relevat impactul pozitiv al rațiilor alimentare testate, cu structură calorică variată. Cea mai mică creștere a masei corporale (cu 34,15%) pe parcursul administrării rațiilor alimentare testate a fost stabilită în lotul I. Celelalte variante de rații alimentare testate (rațiile 4, 5 și 6) au contribuit la o creștere mai mare a masei corporale, pe perioada administrării acestora respectiv cu 46,70%; 52,39% și 45,22%. În conformitate cu datele obținute privind masa corporală (creșterea în greutate) a

animalelor de laborator s-a constatat că cea mai optimă raţie testată s-a dovedit a fi raţia alimentară 5, care a fost administrată animalelor din lotul III.

Tabelul 3.9. Masa corporală a şobolanilor utilizaţi în testarea raţiilor alimentare elaborate în premieră

Loturile experimentale	Masa corporală a şobolanilor în g/animal		Adaosul masei corporale, g/animal	Diferenţa cu datele iniţiale, %
	Datele iniţiale	Date finale		
I	242,4±17,96	325,2±26,70**	82,8	34,15
II	242,8±13,49	356,2±22,58**	113,4	46,70
III	242,0±15,36	368,8±21,60**	126,8	52,39
IV	242,8±12,22	352,6±29,64**	109,8	45,22

Notă: **– p≤0,01(statistic distinct semnificativ).

În continuare, a fost determinată acţiunea raţiilor testate asupra bacteriilor din genul *Enterococcus,* ca parte componentă a florei microbiene intestinale.

Rezultatele obţinute în condiţii *in vivo*, la testarea „comportamentului" enterococilor la administrarea raţiilor alimentare cu diferită structură calorică nu confirmă datele obţinute în condiţii *in vitro*, când a fost monitorizată modificarea indicilor numerici ai bacteriilor pe medii nutritive, ce conţinea aceste raţii. În baza datelor obţinute (Tabelul 3.10) se observă, că în condiţii *in vivo* caracterul modificărilor bacteriilor studiate diferă de cel stabilit *in vitro.* Astfel, indicii numerici finali ai microorganismelor din genul *Enterococcus* au crescut cu 69,27%, în lotul I, ceea ce indică la dezvoltarea ambundentă a acestor bacterii în cazul administrării raţiei nr. 1.

Tabelul 3.10. Modificarea indicilor numerici ai enterococilor în conţinutul intestinal al şobolanilor hrăniţi cu raţii cu diferită structură calorică

Lotul	Cantitatea celulelor microbiene la 1g de conţinut intestinal, exprimată în logaritmi zecimali (lg), conform timpului determinării		Diferenţa, %	
	date iniţiale	date finale	comparativ cu datele iniţiale	comparativ cu lotul I
I	5,11±0,36	8,65±0,42***	+69,27	
II	5,50±0,39	6,58±0,48	+19,63	-23,93
III	5,67±0,41	6,63±0,39	+16,93	-23,35
IV	5,23±0,22	6,17±0,41	+17,97	-28,67

Notă: **– p≤0,01(statistic distinct semnificativ).

La animalele din loturile experimentale II, III și IV pe parcursul administrării rațiilor testate s-a observat o creștere neesențială a cantității celulelor microbiene. Astfel, valoarea numerică a bacteriilor cercetate s-a majorat respectiv cu 19,36%; 16,39% și 17,97%. Însă, comparativ cu animalele din lotul I, indicii numerici ai enterococilor a scăzut respectiv cu 23,93%, 23,35% și 28,67%.

Diferențele în datele obținute în condiții *in vivo* și *in vitro*, denotă despre faptul că în intestinul animalelor, bacteriile unui sau altui gen de microorganisme obligative sau facultative nu acționează separat, ci în asociere. Cel mai frecvent se manifestă o influență antagonistă a reprezentanților microflorei intestinale. Pe de altă parte, se știe că în intestin dintre enterococi predomină cantitativ specia *E. faecalis* comparativ cu *E. faecium*. Faptul că la administrarea rațiilor alimentare testate în condinții *in vivo* nu se atestă o creștere numerică mare a enterococilor (cu excepția lotului I) denotă despre impactul pozitiv al acestora.

Acest lucru este evident la compararea indicilor numerici ai enterococilor cu cei ai bacteriilor din genul *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* și *E. coli* (Figura 3.9.).

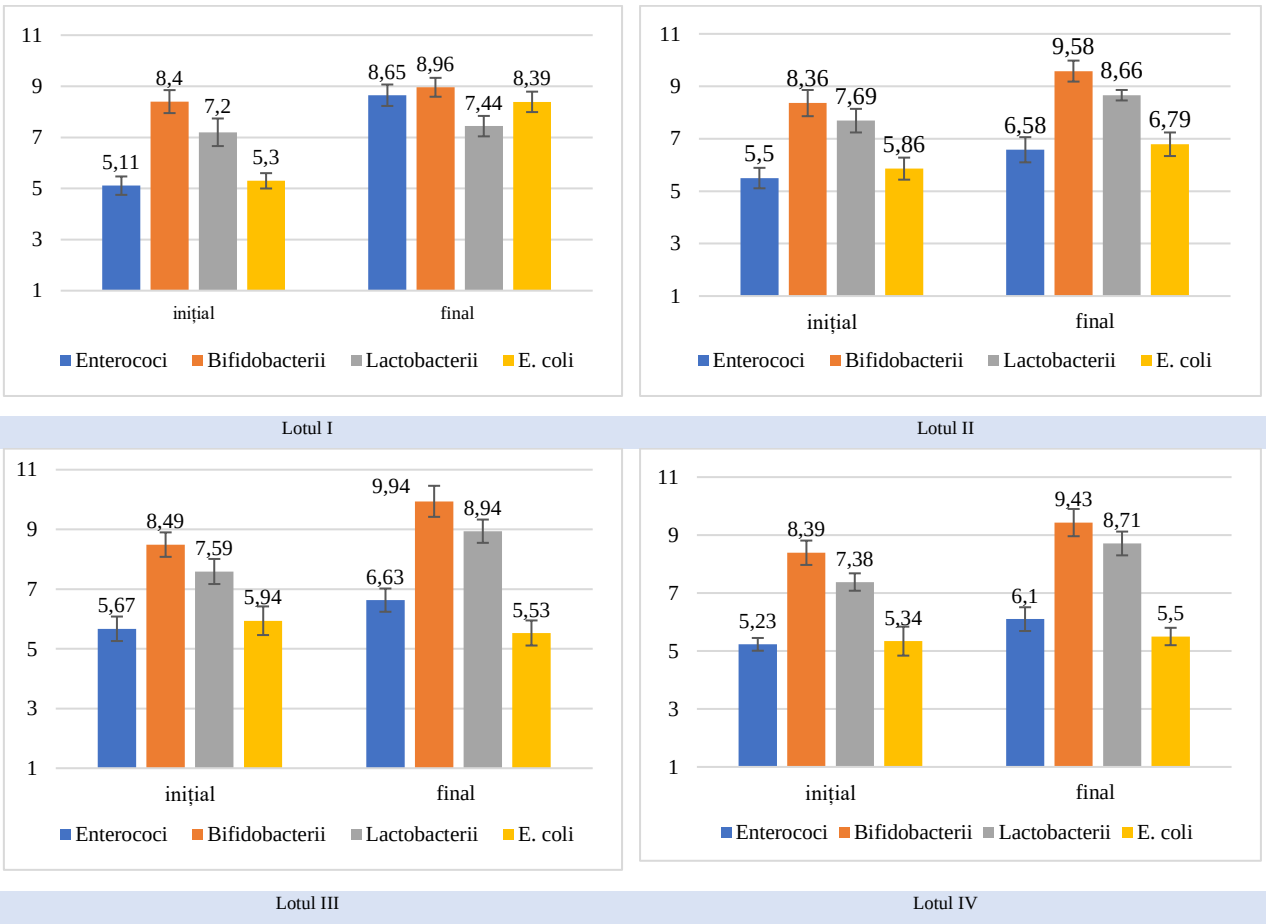


Figura 3.9. Modificarea indicilor numerici ai enterococilor în comparație cu alte bacterii intestinale la șobolani în funcție de administrarea rațiilor alimentare cu diversă structură calorică (lg la 1 g de conținut intestinal)

La analiza datelor prezentate în figură se constată un anumit raport dintre indicii numerici ai enterococilor și ai celorlalte grupe de bacterii până la administrarea rațiilor alimentare (inițial), care este aproape identic în toate loturile experimentale. De fapt, se atestă o dominanță numerică a bacteriilor benefice – bifidobacteriilor și lactobacteriilor, care la rândul lor determină menținerea la un nivel „optim" a escherichiilor și enterococilor. Tabloul modificărilor corelațiilor dintre grupele de bacterii se schimbă după administrarea rațiilor alimentare (final), ceea ce denotă despre reacția bacteriocenozei la structura calorică a nutrienților din componența rațiilor alimentare.

Astfel, nivelul cantitativ al bifidobacteriilor și lactobacteriilor se majorează nesemnificativ (respectiv cu 6,5 și 3,8%), iar cel al *E. coli* și enterococilor crește substanțial (cu 51,7% și 69,3%) în lotul I, în care animalelor de laborator le-a fost administrată rația ce conține 8% proteine, 35% lipide și 57% glucide. Majorarea nivelului cantitativ al enterococilor și al *E. coli* în raport cu celelalte grupe de bacterii, în special cele benefice, indică la o posibilă disbioză intestinală. Putem presupune că rația cu această structură calorică nu are cea mai favorabilă acțiune asupra bacteriocenozei intestinale.

În loturile experimentale II, III și IV, care au avut rezultate pozitive în testarea *in vitro* se atestă o majorare mai mare (în medie cu 13-14%) a indicilor numerici ai bifidobacteriilor și lactobacteriilor și sporire cu circa 17% a nivelului enterococilor (Figura 3.9.). Putem presupune că există o corelație pozitivă dintre cantitatea de enterococi cu cea de bifidobacterii și lactobacterii. Mai mult, această corelație pozitivă determină inhibarea multiplicării *E. coli*, ceea ce denotă despre starea de sănătate bună a tubului digestiv. Cel mai bine acest lucru se observă în lotul III, unde a fost administrată rația alimentară nr. 5, ce conținea 12% proteine, 27% lipide și 61% glucide. În această variantă experimentală s-a constatat cel mai înalt nivel cantitativ de bifidobacterii, lactobacterii și enterococi și cea mai mare descreștere a nivelului de *E. coli*. De remarcat, că în cazul enterococilor s-a observat cea mai mică diferență (majorarea cu 16,9%) dintre datele finale și cele inițiale (Figura 3.9). Dintre rațiile testate, rația cu nr. 5 (lotul III) a avut cel mai bun rezultat, în ceea ce privește modificarea numerică a enterococilor în conținutul intestinal.

Din experimentele descrise mai sus, s-a observat că rațiile alimentare cu un procent mai mare de proteină, și anume rațiile cu nr. 4, 5 și 6 (Tabelul 3.8.) au avut cea mai benefică influență asupra indicilor numerici ai enterococilor și celorlate grupe de bacterii. Aceste date corelează cu datele descrise în subcapitolul 3.3.1. obținute la administrarea rației alimentare cu exces de proteine.

Așadar, s-a constat că rațiile alimentare cu diferită structură calorică manifestă acțiune diferită asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali. Despre faptul că aceste modificări ale efectivului de enterococi sunt benefice sau mai puțin benefice, se poate de dedus din corelația acestora cu alte grupe de bacterii intestinale. Și anume, în cazul în care indicii numerici mai mari ai enterococilor corelează cu un nivel sporit de bifidobacterii și lactobacterii se atestă cea mai favorabilă interrelație dintre aceste bacterii, ceea ce poate determina eubioza intestinală. Enterococii, fiind bacterii facultativ anaerobe, creează mediu anaerob pentru dezvoltarea și multiplicarea bacteriilor strict anaerobe cum sunt bifidobacteriile și lactobacteriile.

Pe de altă parte, corelarea valorilor înalte ale enterococilor cu cele ale *E. coli*, denotă despre disfuncțiile intestinale. Multiplicarea bacteriile patogene, din care face parte și *E. coli*, creează condiții pentru dezvoltarea excesivă a enterococilor, în special a tulpinilor ce provoacă infecții, care la rândul său inhibă efectivul bacteriilor benefice.

Din considerentele că proteinele în diferit coraport cu alte substanțe nutritive (lipide și glucide) pot fi unul din factorii care ar avea influență asupra modulării microbiocenozei intestinale, într-o altă serie de experimente, efectuate pe cobai, a fost investigată modificarea efectivului enterococilor la administrarea rațiilor alimentare ce conțineau un procent mai mare de proteine.

Structura calorică a rațiilor alimentare și repartizarea animalelor în loturile experimentale este prezentată în tabelul 3.11. Descrierea detaliată a experimentului este prezentată în capitolul 2.

Tabelul 3.11. Structura calorică a rațiilor alimentare cu diversă structură calorică (%) testate *in vivo* pe cobai

Componentele de bază	**Cantitatea, % a componentelor nutritive din variantele rațiilor elaborate / numărul lotului experimental**		
	1/Lotul I	**2/Lotul II**	**3/Lotul III**
Proteine	12	16	20
Lipide	35	30	27
Glucide	53	54	53

Animalele de laborator, cobaii, au fost repartizați în 4 loturi: lotul martor, care a primit rația standard, specială pentru cobai în condiții de vivariu; 3 loturi experimentale, care au primit rația cu diversă structură calorică reprezentată în tabelul de mai sus. De remarcat, că în această serie de experimente, în structura rației alimentare nr. 1 se atestă același procent de proteine (12%) ca și în varianta rației nr. 5 din experimentul precedent, cu diferența cotei-parte a lipidelor – 35 *vs* 27 și a carbohidraților – 53 *vs* 57.

Modificarea numărului de celule bacteriene în conținutul intestinal la cobai în funcție de structura calorică a rațiilor elaborate și administrate este prezentată în tabelul 3.12.

Ca și în experimentul precedent valoarea numerică a enterococilor a fost studiată în comparație cu alte bacterii, ce au semnificație pentru sănătatea tubului digestiv. Până la administrarea rațiilor alimentare (date inițiale), în conținutul intestinal la cobai se atestă o corelație dintre indicii numerici ai enterococilor cu bifidobacteriile, lactobacteriile și *E. coli*. Însă, la cobai, raportul escerichiilor este mai mare comparativ cu nivelul cantitativ al enterococilor (de circa 1,2 ori), precum și cel al bifidobacteriilor (de circa 1,5 ori) și lactobacteriilor (de circa 1,6 ori).

Modificări în coraportul dintre enterococi cu celelalte bacterii descrise se observă după administrarea rațiilor elaborate (date finale). Nemijlocit, în cazul enterococilor, în lotul I și III s-a constat o majorare nesemnificativă a numărului de celule bacteriene (de circa 1,01 și 1,03 ori respectiv) în comparație cu datele inițiale. O diferență mai mare dintre datele inițiale și cele finale (de 1,2 ori) s-a observat în lotul II experimental. Putem presupune că majorarea cotei părți de proteină în structura rației alimentare, practic nu influențează efectivul enterococilor.

Tabelul 3.12. Indicii numerici ai enterococilor în comparație cu bacteriile intestinale obligative și facultative la cobai, la administrarea rațiilor alimentare cu diversă structură calorică

Varianta rației	Genul bacteriei	Cantitatea celulelor microbiene la 1g de conținut intestinal, logaritmi zecimali (lg), conform timpului determinării	
		date inițiale	date finale
Martor	*Bifidobacterium*	4,38±0,14	4,56±0,15
	Lactobacillus	4,2±0,25	4,59±0,31
	Escherichia	6,67±0,25	6,82±0,15
	Enterococcus	5,36±0,26	5,62+0,19
Lotul I	*Bifidobacterium*	4,43±0,15	6,07±0,2***
	Lactobacillus	4,34±0,14	5,69±0,15***
	Escherichia	6,61±0,34	4,82±0,14**
	Enterococcus	5,08±0,18	5,14±0,2
Lotul II	*Bifidobacterium*	4,89±0,14	6,5±0,14***
	Lactobacillus	4,46±0,15	5,96±0,2***
	Escherichia	6,61±0,34	4,43±0,15***
	Enterococcus	4,82±0,38	5,83±0,15*
Lotul III	*Bifidobacterium*	4,96±0,27	5,94±0,14*
	Lactobacillus	4,64±0,34	5,62±0,14*
	Escherichia	6,41±0,15	4,74±0,15***
	Enterococcus	4,92±0,35	5,08±0,25

Notă: *– p≤0,05 (statistic semnificativ); **– p≤0,01 (statistic distinct semnificativ); ***– p≤0,001 (statistic foarte semnificativ).

Analiza corelației dintre numărul de enterococi cu cel ai bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli* relevă aceiași tendință de cooperare dintre enterococi cu bifidobacteriile și lactobacteriile în inhibarea multiplicării *E. coli* (Figura 3.10.).

Cea mai evidentă majorare a nivelului de bifidobacterii, lactobacterii și de enterococi, și micșorare a nivelului de *E. coli* s-a relatat în lotul II, în care a fost testată rația alimentară ce conținea 16% de proteine, 30% de lipide și 54% de glucide. Și anume, nivelul bifidobacteriilor în lotul II s-a majorat de 1,33 ori, a lactobacteriilor de 1,34 ori, a enterococilor de 1,2 ori, iar a *E. coli* s-a micșorat de 1,5 ori (Figura 3.10.).

Rezultatele obținute, de asemenea, relevă sensibilitatea enterococilor și a celorlalte bacterii intestinale la o anumită componență și coraport al substanțelor nutritive din rația alimentară.

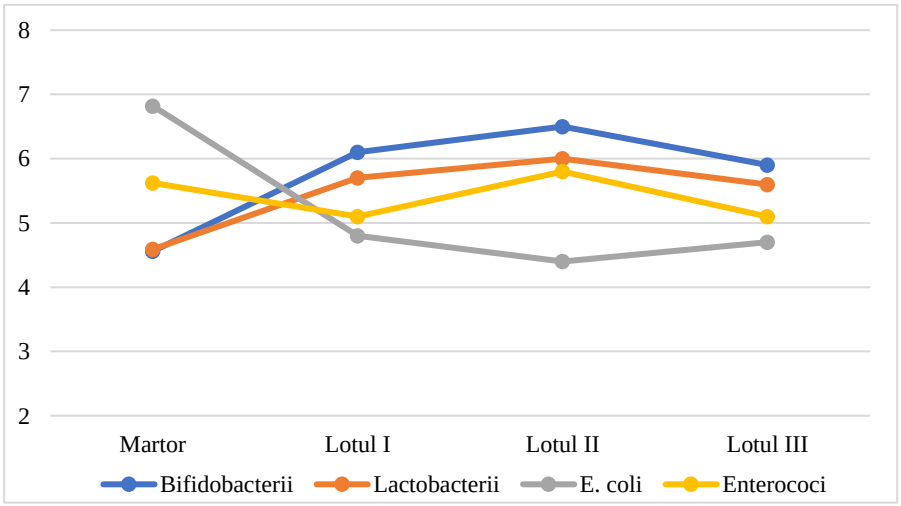


Figura 3.10. Corelarea indicilor numerici ai enterococilor cu cei ai bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli* în conținutul intestinal al cobailor la administrarea rațiilor alimentare cu diferită structură calorică (lg la 1 g conținut intestinal)

După cum a fost menționat mai sus, în experimentul pe cobai, proteinele din structura rațiilor alimentare au influențat mai mult sau mai puțin identic pattern-ul enterococilor în loturile experimentale, excepție fiind lotul II. De remarcat, că în cazul administrării rației cu nr. 1, ce conținea 12% de proteină (lotul I cobai), deși au fost înregistrate date pozitive (majorarea efectivului de bacterii benefice și micșorarea celor condiționat patogene), totuși nu a fost atins acel efect benefic descris în experimentul pe șobolani (în cazul rației cu nr. 5 din experimentul precedent). O explicație ar fi procentul mai mare de lipide (35%) în seria experimentelor pe cobai. În experimentele pe șobolani acest procent de lipide a fost inclus în rația cu nr. 1, la care s-au înregistrat cele mai negative rezultate (majorarea considerabilă a numărului de *E. coli*). Întrucât raportul procentual al carbohidraților din structura rațiilor, practic nu a fost semnificativ

modificat, nu putem să ne pronunțăm referitor la influența acestor substanțe asupra efectivului bacteriilor intestinale.

Datele obținute privind acțiunea rațiilor alimentare de diferită structură calorică susțin rezultatele testării rațiilor de valoare nutritivă diferită, prin exces de anumiți nutrienți (vezi subcapitolul 3.3.1).

Astfel, în baza analizei rezultatelor obținute și a celor analizate în subcapitolul 3.3.1, putem presupune că raportul procentual moderat de proteine (12-16%) și lipide (27-30%) din structura rațiilor alimentare au o acțiune stimulatoare asupra dezvoltării și multiplicării enterococilor în corelație cu bifidobacteriile și lactobacteriile, iar cota-parte mai mare a acestor nutrienți exercită o acțiune mai mare sau chiar inhibitoare asupra bacteriilor cu efect sanogen din bacteriocenoza intestinală. Referitor la acțiunea carbohidraților, putem constata că acel procent caloric din rațiile testate nu provoacă inhibarea multiplicării bacteriilor benefice, care a fost stabilit în experimentele cu exces de carbohidrați descris în subcapitolul 3.3.1.

Este evident că în stabilirea unei homeostazii intestinale benefice sănătății organismului, un rol important aparține coraportului dintre componenții nutritivi din rația alimentară, care la rândul său determină formarea unei corelații pozitive dintre bacteriile microflorei intestinale, ce nu permite dezvoltarea disfuncțiilor intestinale și contribuie la sănătatea tubului digestiv și a organismului în întregime.

Deci, se poate afirma că indicii cantitativi ai enterococilor, depind în mare măsură de componența rațiilor alimentare. De aceea, considerăm că valoarea numerică a lor poate fi reglată și menținută nu numai cu ajutorul preparatelor microbiene cu acțiune probiotică, ci și prin utilizarea rațiilor alimentare, care reflectă influența prebiotică asupra bacteriocenozei intestinale. Experimental, s-a constatat că factorul alimentar (rațiile alimentare), cu o structură calorică echilibrată contribuie la menținerea la un nivel optimal pentru organism al conținutului de enterococi intestinali.

3.4. Valoarea numerică a enterococilor în corelație cu statutul fiziologic al organismului gazdei

Statutul fiziologic al organismului omului și animalelor este strâns corelat cu diverși indici, ce reflectă funcționarea normală sau dereglarea proceselor fiziologice și biochimice. Îndeosebi, a fost evidențiată acțiunea factorilor stresogeni, fiind descris de către academicianul T. Furdui „fenomenul degradării morfofuncționale a organelor de importanță vitală condiționată de influența cronică stresogenă, care mai târziu a fost estimat și în societatea umană și care se manifestă prin tendința pronunțată de creștere a incidenței maladiilor somatice și psihice,

creșterea procentului de copii cu dereglări funcționale ale organelor vitale, descreșterea indicilor spermogramei umane etc.” (Фурдуй Ф.И., 1986; 1989; 2016; 2017). Microbiota intestinală reprezintă unul din acești indici, care de fapt cuprinde aspectul fiziologic și biochimic al stării de sănătate a macroorganismului. A fost demonstrat că factorii stresogeni inhibă microflora obligativă a TGI și contribuie la dezvoltarea celei condiționat-patogene (Фурдуй Ф.И., 1986; 1989; 2016; 2017). Anterior s-a menționat că principalele funcții fiziologice ale microbiotei intestinale sunt digestia, sinteza vitaminelor și metabolismul. S-a raportat că microbiota intestinală crește producția de energie din alimente, contribuie la reducerea proceselor inflamatorii (în special intestinale) și are un impact asupra compoziției de acizi grași din țesuturi. Toate acestea indică la o legătură dintre starea microbiocenozei intestinale cu aspecte de sănătate asociate cu greutatea corporală dereglată (Aoun A. et al., 2020). Au fost observate modificări în compoziția și funcționalitatea microbiotei intestinale în cazurile de patogeneză legate atât de obezitate, cașexie și malnutriție (Boscaini S. et al., 2022), iar creșterea anumitor specii bacteriene benefice și reducerea speciilor dăunătoare (patogene) poate nemijlocit afecta sănătatea gazdei (Aoun A. et al., 2020).

În ultimul timp, oamenii de știință au un interes crescut în utilizarea microbiotei intestinale pentru controlul greutății corporale, deoarece are un rol important în extracția energiei din alimente, precum și în biotransformarea nutrienților (Boscaini S. et al., 2022). Efectivul de bacterii într-un organism influențează unele aspecte metabolice ale organismului-gazdă, cum ar fi secreția de enzime digestive, peristaltica și excreția. Pentru a menține o comunitate și un ecosistem intestinal stabil, microbiota intestinală „trebuie” să-și regleze rata de creștere și populația ca răspuns la disponibilitatea nutrienților și la modificările densității populației microbiene care sunt „comunicate/semnalizate” prin *Quorum sensing* (David, L. et al., 2014). Aceasta rezultă cu o cascadă de modificări ciclice ale densității și diversității microbiotei intestinale, care sunt prestabilite de modelele/obiceiurile de alimentație (timpul administrării hranei și frecvența hrănirii) și de compoziția nutrienților (Zarrinpar A. et al., 2014).

Legătura dintre microbiomul intestinal și starea de sănătatea asociată cu greutatea corporală (obezitatea, malnutriția) nu este încă bine definită. Înțelegerea rolului microbiomului intestinal în gestionarea greutății și a sănătății poate duce la schimbări revoluționare pentru tratarea acestor boli.

Actualmente, în rândul populației urbane se atestă tendință de alimentație dezechilibrată, care include nu numai consumul nerațional de substanțe nutritive și de produse procesate, ce conțin diverși aditivi, dar și inanița. Anorexia, considerată o boală psihică cauzată de inaniție sau subnutriție, este pe larg întâlnită în rândul persoanelor tinere, în special, a adolescenților. S-a

relatat că orice schimbare a pattern-ului de alimentare determină schimbări majore ale profilului microbiomului intestinal (Terry S.M. et al., 2022). Se consideră că reducerea aportului de alimente, stresul psihosocial și scăderea semnificativă în greutate contribuie la stabilirea unui mediu intestinal selectiv pentru supraviețuirea bacteriilor care favorizează dezvoltarea disbiozei (Garcia N., Gutierrez E., 2023).

Pe de altă parte, subnutriția rămâne astăzi una dintre cele mai presante provocări ale sănătății globale, în special în țările sărace, afectând în principal sugarii și copiii (Fontaine F. et al., 2023). În unele studii au fost elucidate diferențe dintre microbiota copiilor sănătoși și a celor ce suferă de subnutriție (malnutriție), în special, s-a constatat creșterea incidenței bacteriilor patogene și a fost abordată perspectiva utilizării microbiomului în ameliorarea stării de sănătate la acești copii (Iddrisu I. et al., 2021).

Modificări în microbiomul intestinal au fost relatate și la animalele sălbatice, lipsite de hrană (Jawahar J. et al., 2022), în special la animalele care hibernează (Mack I. et al., 2018).

Este evident că aportul redus de alimente, care reprezintă substrat energetic și plastic pentru microbiota intestinală, poate afecta dramatic comunitatea bacteriană intestinală, inclusiv și enterococii. Astfel, un aspect al rolului fiziologic al enterococilor intestinali reprezintă și modul în care subnutriția afectează efectivul acestora.

Modificarea efectivului enterococilor intestinali în condiții de inaniție, a fost testată pe animale de laborator – șobolani albi linia Wistar, care au fost divizați câte un animal în cuști separate și care nu au primit hrană timp de 72 de ore. Monitorizarea greutății și investigarea conținutului enterococilor intestinali a fost efectuată individual pentru fiecare animal din experiment.

Subsecvent, restricția aportului alimentar, duce la pierderea în greutate a animalelor experimentale. Inițial masa corporală a șobolanilor a constituit: 216 g pentru animalul care a servit drept martor; 160 g pentru șobolanul-experimental 1 și 202 g pentru șobolanul-experimental 2 (Figura 3.11.).

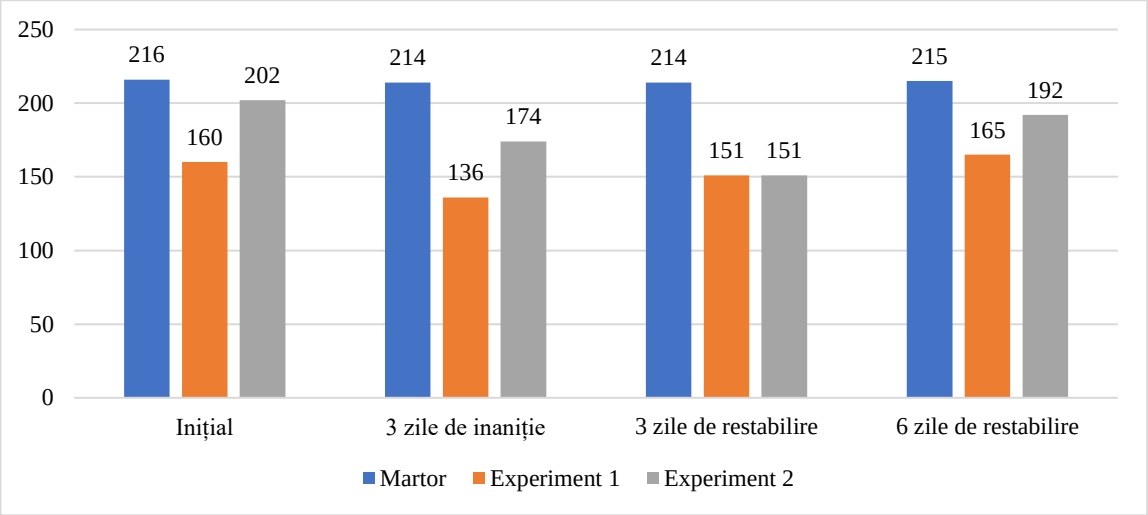


Figura 3.11. Modificarea greutății corporale (g) a șobolanilor, după 3 zile de inaniție și respectiv după 3 și 6 zile de restabilire la alimentația normală

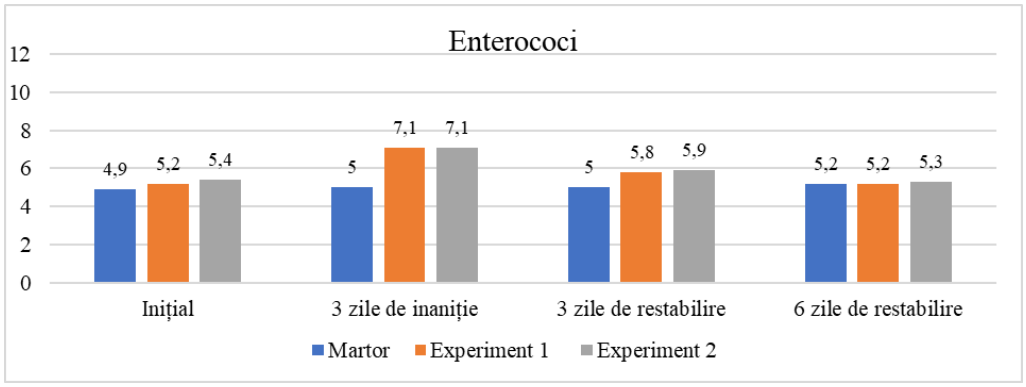
Legenda: Martor – șobolani albi de laborator hrăniți cu rația standard; Experiment (1, 2) – șobolani albi de laborator care au fost lipsiți de hrană 72 h.

După 3 zile de inaniție (restricție deplină de hrană), greutatea corporală a șobolanului-experimental 1 a scăzut cu 24 g, iar a șobolanului-experimental 2 cu 28 g. Deși, inițial greutatea a fost diferită, pierderea în greutate la ambele animale experimentare a fost aproximativ identică. Trecerea animalelor la alimentația normală, după inaniție, a condiționat adăugarea în greutate a animalelor experimentale, respectiv cu 15 g și 9 g, însă, nu s-a revenit la greutatea inițială. După 6 zile de alimentație conform rației standard, șobolanii înfometați au adăugat încă 14 g și respectiv 9 g. În total, după inaniție, șobolanii experimentali au adăugat în greutate corespunzător – 29 g și 18 g. De menționat, că șobolanii, care inițial aveau o greutate mai mică, după înfometare, în procesul de restabilire, au acumulat cele mai multe grame (cu 5 grame mai mult comparativ cu greutatea inițială), iar șobolanii care au avut masa corporală mai mare, au adăugat mai puțin și nu au revenit la greutatea inițială (Figura 3.11.). Acest lucru relevă că fiecare organism reacționează individual la modificarea pattern-ului de alimentare.

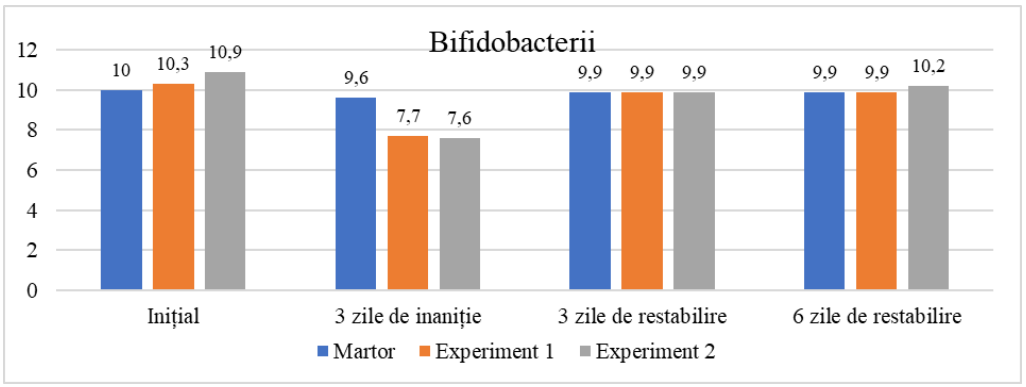
După cum a fost relatat anterior, microbiota intestinală este destul de sensibilă la modificarea valorii nutritive a rației alimentare. Cu atât mai mult, bacteriile intestinale reacționează la aportul redus de alimente.

Lipsa totală a hranei timp de 72 h a condiționat modificări ale conținutului de celule bacteriene la animalele de laborator (Figura 3.12.).

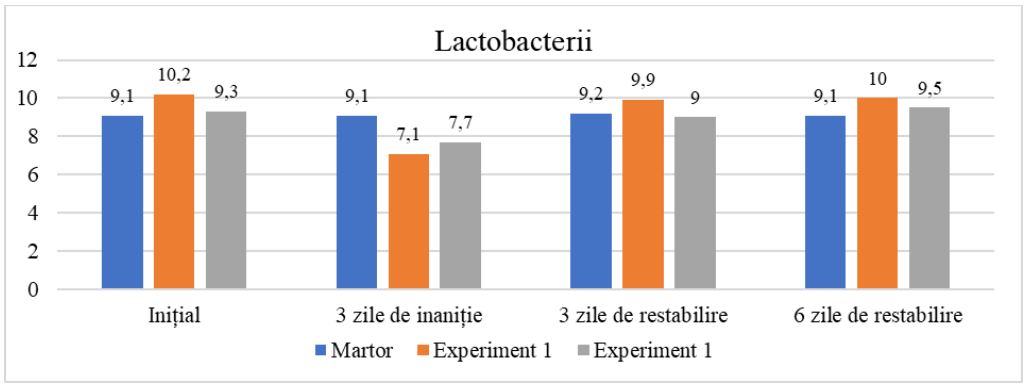
A



B



C



D

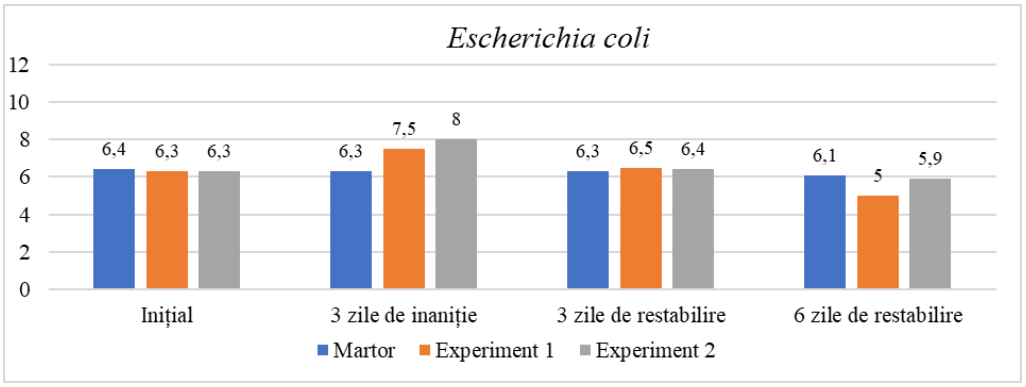


Figura 3.12. Modificarea cantității de celule bacteriene ale enterococilor (A), bifidobacteriilor (B), lactobacililor (C) și *E. coli* (D) (lg la 1 g de conținut intestinal) la șobolanii supuși inaniției

Legenda: Martor – șobolani albi de laborator hrăniți cu rația standard; Experiment (1, 2) – șobolani albi de laborator care au fost lipsiți de hrană 72 h.

Valorile inițiale ale enterococilor la animalele experimentale au constituit respectiv: 4,9; 5,2 și 5,4 de celule bacteriene la 1g de conținut intestinal (lg). Modificarea valorii numerice ale enterococilor în condiții de inaniție se caracterizează prin majorarea conținutului de 1,4 ori la șobolanul-experimental 1 și de 1,3 ori la șobolanul-experimental 2.

După încetarea înfometării și trecerea la alimentația normală pentru animalele de laborator, și anume după 3 zile, nivelul enterococilor nu revine la datele inițiale și rămâne a fi mai mare, respectiv de 1,12 și 1,1 ori față de aceste date. După 6 zile de alimentație standard, efectivul enterococilor la animalele experimentale a revenit la nivelul inițial (Figura 3.12. A).

Datele obținute relevă majorarea indicilor numerici ai enterococilor intestinali în condiții când animalele experimentale (organismul-gazdă) nu a primit hrană timp de 3 zile. Trecerea animalelor la alimentația normală (standard) timp de 6 zile a determinat restabilirea efectivului enterococilor la valorile înregistrate înainte de începerea experimentului. De menționat, că restabilirea deplină a valorii enterococilor a fost înregistrată la șobolanul-experimental 1, care a revenit cu grame în plus în această perioadă post-inaniție.

De asemenea s-a remarcat, că la lipsa hranei, ambele animale experimentale reacționează identic, prin majorarea valorii numerice a enterococilor. În procesul de restabilire, însă, la animalele experimentale au fost înregistrate diferențe între nivelul acestor bacterii, la diferite etape de monitorizare – 3 și 6 zile. Putem presupune că există o corelație între capacitatea de recuperare a nivelului enterococilor, ca parte a microbiocenozei intestinale, cu adăugarea în greutate/restabilirea masei corporale.

Pentru a elucida pe deplin rolul fiziologic al enterococilor în condiții de inaniție, au fost analizate valorile altor bacterii intestinale cu funcții diferite: benefice sănătății tubului digestiv – bifidobacteriile și lactobacilii și cu acțiune nefavorabilă – *E. coli*.

Inițial nivelul numeric al bifidobacteriilor a fost mai mare comparativ cu cel al enterococilor, ceea ce corespunde și cu datele analizate și discutate anterior, și anume: 10,0; 10,3 și 10,9 celulele bacteriene la 1g de conținut intestinal (lg). Inducerea experimentală a foametei a condiționat reducerea efectivului bifidobacteriilor de 1,34 ori la șobolanul-experimental 1 și de 1,44 ori la șobolanul-experimental 2. În cazul bifidobacteriilor, a fost relevat un tablou invers stabilit la profilul modificărilor enterococilor – a fost observată corelația dintre valorile pierderii greutății cu valorile diminuării numericului acestor bacterii. Restabilirea regimului alimentar standard a indus majorarea indicilor numerici ai bifidobacteriilor comparativ cu etapa de inaniție, însă, efectivul acestora a rămas mai mic comparativ cu datele inițiale (de 1,04 și 1,1 ori). Revenirea la nivelul datelor inițiale notate pentru bifidobacterii nu a fost observată nici după 6 zile de regim alimentar post-inaniție, fiind înregistrate aproximativ aceleași valori ca și după 3

zile de alimentație normală. Aceasta ne permite să deducem că bifidobacteriile, ca parte a microbiocenozei intestinale, sunt mai sensibile la insuficiența sau lipsa totală a hranei, iar efectivul acestora suferă modificări, ce nu se ameliorează nici după încetarea acțiunii nefavorabile (Figura 3.12. B).

Un alt grup de bacterii benefice ale microbiotei intestinale sunt lactobacilii (lactobacteriile), valorile inițiale ale cărora au constituit: 9,1; 10,2 și 9,3 celulele bacteriene la 1g de conținut intestinal (lg). Inanița timp de 3 a zile a șobolanilor experimentali a determinat reducerea nivelului cantitativ al lactobacililor aproximativ de 1,5 ori la șobolanul-experimental 1 și de 1,2 ori la șobolanul-experimental 2. În cazul lactobacililor se observă același tablou de modificare în raport cu masa corporală ca și la enterococi: o diminuare mai mare de celule bacteriene se constată la animalul-experimental care a pierdut mai puțin în greutate și care inițial a avut o masă corporală mai mică. După 3 zile de restabilire a regimului de alimentare tipic animalelor de laborator investigate, nivelul lactobacililor crește comparativ cu datele înregistrate la etapa de inaniție, dar este mai mic față de datele inițiale (de 1,03 ori la ambele animale). După 6 zile de regim normal de alimentație, la șobolanul-experimental 1 conținutul lactobacililor rămâne a fi mai mic comparativ cu datele inițiale și aproximativ la același nivel cu datele descrise la etapa precedentă (după 3 zile de restabilire a alimentației normale). La șobolanul-experimental 2, însă, se atestă majorarea de 1,02 ori a valorii numerice, nu numai față de etapa precedentă de monitorizare, dar și față de datele inițiale. Acest lucru denotă despre reactivitatea individuală a organismului a modificărilor microbiotei intestinale (Figura 3.12. C).

Starea microbiocenozei intestinale depinde și de modificările bacteriilor nocive, întrucât nivelul acestora reprezintă deseori indicatori ai eubiozei sau disbiozei. În stare de disbioză bacteriile patogene formează „coaliții” cu unele bacterii cum ar fi enterococii, care în condiții normale nu manifestă patogenitate. Din aceste considerente ne-am propus de a analiza modificările conținutului de *E. coli*, în comparație cu cele ale enterococilor pentru a stabili transformările microbiocenozei intestinale a organismului animal în condiții de inaniție.

Nivelul inițial al *E. coli* a constituit: 6,4; 6,34 și 6,27 de celule bacteriene la 1 gram de conținut intestinal (lg). După 3 zile de înfometare a animalelor experimentale valoarea numerică a enterococilor s-a majorat de 1,2 ori la șobolanul-experimental 1 și de 1,3 ori la șobolanul-experimental 2, comparativ cu datele inițiale. Astfel, inanița induce majorarea efectivului atât a enterococilor, cât și a escherichiei, ceea ce indică că lipsa totală a hranei provoacă modificări ale microbiotei intestinale asociate cu disbioza. Încetarea inaniției și trecerea la regimul alimentar normal al animalelor de laborator, a determinat, după 3 zile, restabilirea valorilor numerice ale *E. coli* la animalele experimentale, aproximativ la nivelul datelor inițiale. La această etapă de

monitorizare, indicii numerici ai *E. coli* sunt mai mici comparativ cu etapa de inaniție și mai mari de 1,02 ori comparativ cu valoarea lor inițială. După 6 zile de alimentație conform standardului, nivelul bacteriilor scade atât comparativ cu etapele experimentale monitorizate, cât și comparativ cu datele înregistrate înainte de înfometare. Astfel, revenirea la un regim alimentar normal induce din nou modificări ale microbiocenozei intestinale, ce indică la restabilirea efectivului bacteriilor de *E. coli*, precum și a enterococilor la un nivel ce nu prezintă pericol sănătății tubului digestiv (Figura 3.12. D).

Rezultatele descrise, și anume, majorarea efectivului enterococilor și *E. coli* și reducerea nivelului bifidobacteriilor și lactobacililor (lactobacteriilor), relevă că înfometarea/inaniția creează, la nivelul microbiotei intestinale, condiții care determină dezvoltarea disbiozei într-un timp destul de mic.

În alte studii ce au vizat studierea corelației subnutriției cu starea microbiocenozei intestinale au fost obținute date ce relevă aceiași tendință de dominanță a agenților patogeni intestinali și patobionților (Huus K.E. et al., 2021), însă, cauza creșterii lor excesive nu poate fi explicată pe deplin. Autorii presupun că bacteriile sunt capabile de hrănire simbiotică încrucișată, ceea ce determină creșterea sinergică a unor comunități de microorganisme în funcție de condițiile de alimentație. Astfel, subnutriția condiționează multiplicarea excesivă a patobionților.

Totodată, subnutriția corelează cu o diversitate microbiană redusă și cu imaturitatea micriobiomului intestinal. S-a stabilit că drept urmare a modificării statutului microbiomului intestinal în condiții de subnutriție este afectată funcția barierei intestinale, ceea ce duce la dezvoltarea disbiozei (Andres S.F. et al., 2023). Dereglarea funcției de apărare a mucoasei intestinale în timpul malnutriției poate promova un mediu permisiv pentru agenții patogeni diareici. În aceste condiții, a fost observată reducerea efectivului unor specii bacteriene anaerobe specifice, cum ar fi cele din familiile Bacteroidetes sau Eubacteriaceae și creșterea bacteriilor aerotolerante precum *E. coli*, *E. faecalis* și *St. aureus*, care sunt considerate agenți patogeni comuni (Kudsk K.A. et al., 1983). A fost relatat că microbiota copiilor ce suferă de malnutriție, este mai puțin eficientă la extracția energiei din nutrienții dietetici, ceea ce duce la modificări în producția de metaboliți microbieni. Întrucât, metaboliții microbieni sunt regulatori critici ai funcției barierei intestinale, disbioza poate exacerba permeabilitatea barierei și inflamația. În plus, metaboliții microbieni modifică epigenomul gazdei, care poate avea un impact pe termen lung asupra sănătății și fiziologiei gazdei, sugerând la efectele adverse urmare a subnutriției, chiar și după ce sunt furnizați nutrienții corespunzători (Preidis G.A. et al., 2015).

În baza datelor obținute și reieșind din considerentele că comunitățile microbiene sunt construite din interacțiuni complexe, putem presupune că în condiții de inaniție/malnutriție, multe dintre aceste interacțiuni sunt negative: bacteriile concurează între ele și profită în lupta pentru resursele de hrană limitate. Ca rezultat, microbiocenoza intestinală devine instabilă cu o diversitate redusă, ce reprezintă un semn distinctiv al disbiozei. De asemenea, disbioza poate fi provocată și de modificările suferite de bariera intestinală, în mare parte, din cauza că componentele acesteia servesc drept substrat de nutriție pentru bacteriile intestinale, când este lipsă de hrană. Probabil, în condiție de inaniție, între enterococi și *E. coli* este stabilită o strategie de hrănire simbiotică încrucișată, ce a determinat creșterea valorii numerice a lor în conținutul intestinal.

De menționat, că datele obținute pe modele de șobolani, nu imită întotdeauna modificările fiziologice sau morfologice ale tubului digestiv uman și nu pot fi cu siguranță extrapolate pe subiecții umani, deși, aceste modele prezintă unele asemănări cu cazurile de subnutriție la oameni.

Astfel, a fost stabilit că există o relație reciprocă între flora intestinală și dietă, prin care factorii dietetici reglează structura și funcțiile microbiotei. În schimb, un echilibru sănătos al microbiotei intestinale poate juca un rol în prevenirea sau atenuarea multor boli legate de supra- și subnutriție, precum și a altor boli metabolice (John G.K., Mullin G.E., 2016).

În contextul datelor descrise mai sus, un alt obiectiv al cercetărilor privind rolul fiziologic al enterococilor intestinali a fost relevarea corelației dintre valoarea numerică a lor cu indicii masei corporale a animalelor experimentale și cu modul de nutriție.

În acest scop a fost realizată o serie de experimente, în care a fost studiată incidența enterococilor la animalele de laborator (șobolani albi linia Wistar) cu diferiți indici ai masei corporale și elucidată corelația dintre valoarea numerică a enterococilor, masa corporală și dietă.

Pentru acest scop animalele de laborator au fost divizate în două grupe/loturi (Figura 3.13.):

- Lotul I cu masa corporală mică (care probabil fenotopic se atribuie tipului activ);
- Lotul II cu masa corporală mare, care probabil fenotopic se atribuie tipului hipoactiv).

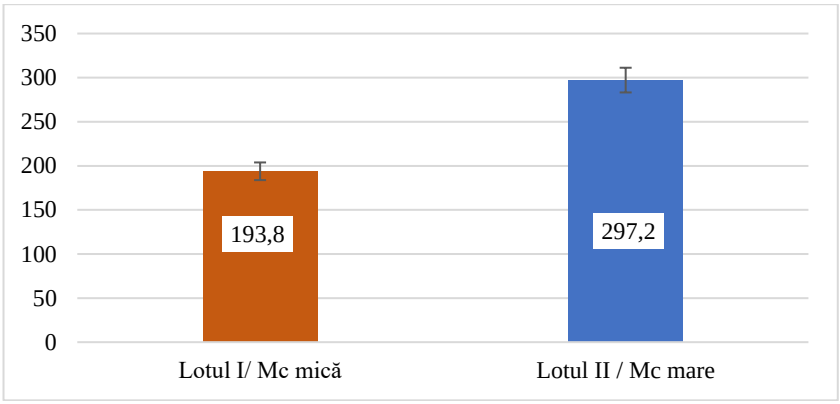


Figura 3.13. Valorile masei corporale (g) a șobolanilor utilizați în studierea incidenței enterococilor intestinali

În continuare în conținutul intestinal de la animalele din ambele loturi experimentale a fost stabilită valoarea numerică a enterococilor (Figura 3.14).

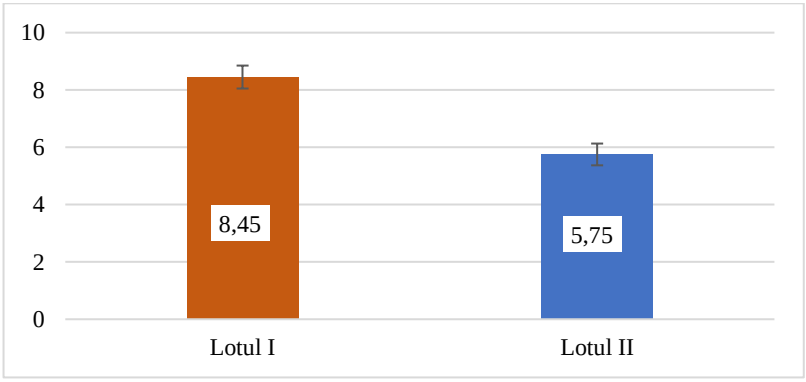


Figura 3.14. Cantitatea de celule microbiene de enterococi (lg în 1 g de conținut intestinal) la șobolanii cu masă corporală mică (lotul I) și masa corporală mare (lotul II)

Datele obținute relevă diferențe semnificative ale nivelului numeric al enterococilor la animalele cu diferită greutate corporală. În lotul I, la animalele cu greutatea mai mică (în medie de 193,8 g) se atestă o valoarea mai mare a enterococilor, comparativ cu animalele din lotul II, cu masă corporală mai mare (în medie 297,2 g). Astfel, în lotul I indicii enterococilor arată în mediu 8,45 de celule microbiene (lg) la 1g de conținut intestinal, iar în lotul II – 5,75 de celule microbiene (lg) la 1g de conținut intestinal, ceea ce constituie o diferență de circa 1,5 ori (mai mare sau mai mică) dintre animalele de diferită greutate. De menționat, că ambelor grupe de animale le-a fost administrată rația standard pentru șobolani de laborator.

Referitor la semnificația valorilor enterococilor la animalele cu masa corporală mai mică și mai mare se poate de dedus la compararea indicilor numerici ai enterococilor cu cei ai altor grupe de bacterii intestinale – bifidobacterii, lactobacterii și *E. coli* (Figura 3.15.).

Datele atestă o corelație dintre enterococi cu bifidobacteriile și lactobacteriile la grupul de animale cu greutate corporală mică. La animalele din acest lot (lotul I)valoarea numerică a enterococilor este aproximativ la același nivel cu cea a bifidobacteriilor (8,45 *vs* 8,3) și mai mare față de cea a lactobacteriilor (8,45 *vs* 8,3) și *E. coli* (8,45 *vs* 7,3), respectiv de 1 și 1,1 ori. Deși, nivelul enterococilor este mai mare, nu putem considera că aceasta reflectă neapărat o stare de patogenitate, întrucât conținutul de *E. coli* este mai mic comparativ cu cel al bacteriilor benefice.

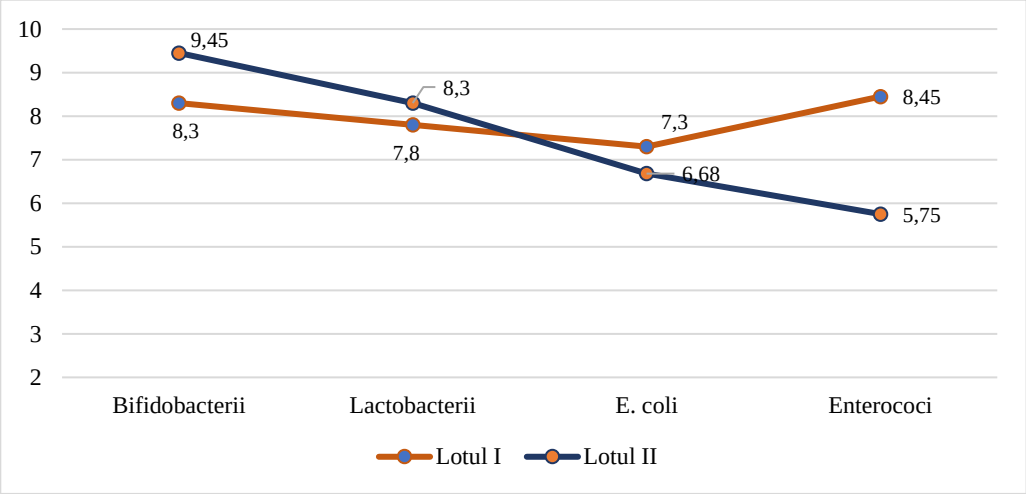


Figura 3.15. Corelarea valorii numerice a enterococilor cu bifidobacteriile, lactobacteriile și *E. coli* (lg/g de conținut intestinal) la șobolanii de laborator cu greutate corporală diferită

Legenda: Lotul I – animale cu masa corporală mică; Lotul II – animale cu masa corporală mare

În lotul II, în cazul animalelor cu greutate corporală mai mare, s-a observat un tablou invers, și anume, valoarea numerică a enterococilor este mai mică comparativ cu celelalte grupe de bacterii intestinale. Indicii numerici ai enterococilor sunt aproximativ de 1,6 ori mai mici față de bifidobacterii, de 1,4 ori față de lactobacterii și de 1,2 față de *E. coli*. La animalele din acest lot nu s-a observat o corelație dintre enterococi cu bifidobacteriile și lactobacteriile, în special, în menținerea unui nivel mai mic de *E. coli*.

Astfel, putem presupune că nivelul mai mare de enterococi la animalele din lotul I, cu greutate corporală mai mică indică la un statut microbian intestinal favorabil. Nivelul mai mic al acestor bacterii la animalele cu greutate corporală mai mare poate servi ca un indice negativ ce relevă un dezechilibru/ o discorelație dintre bacteriile benefice.

De menționat, că datele privind masa corporală mare nu indică obezitatea, iar indicii numerici ai bacteriilor intestinale analizați nu reflectă starea microbiocenzei intestinale indusă de obezitate. Mai degrabă datele descrise se referă la statutul tubului digestiv în funcție de starea fizică individuală al animalelor experimentale.

Valori reduse ale enterococilor în funcție de masa corporală au fost constatate și în alte studii. S-a stabilit că sugarii care au suferit o creștere excesivă în greutate în timpul alăptării au avut o abundență redusă de enterococi intestinali în comparație cu cea observată la martor. În cadrul cohortei complete, abundența de *Enterococcus* a corelat invers cu greutatea corporală ajustată în funcție de vârstă/sex, indicele de masă corporală și circumferința taliei, grăsimea corporală și nivelurile de leptine plasmatice (Laursen M.F. et al., 2020).

De asemenea, s-a stabilit, că unele tulpini de enterococi, de exemplu tulpina *Enterococcus faecalis* (EF-2001) reduce nivelul de trigliceride la șoarecii obezi experimentali și ameliorează metabolismul lipidic (Fan M. et al., 2022).

În general, compoziția microbiană diferă între subiecții (umani/animali) cu diferiți indici ai masei corporale. De exemplu, majoritatea studiilor au observat că raportul dintre *Firmicutes* și *Bacteroidetes* este semnificativ mai mare la subiecții obezi (John G.K., Mullin G.E., 2016). Mai mult, unele studiile au constatat corelația dintre un nivel crescut de *Bacteroidetes* în cazurile de pierdere a greutății și dintre nivelul de *Firmicutes* în cazurile de obezitate (Ley R.E., 2010; John G.K., Mullin G.E., 2016). *Firmicutes* s-a dovedit a fi proporțional negativ cu consumul de energie în repaus, în timp ce *Bacteroides* s-a dovedit a fi corelat pozitiv cu procentul de grăsime corporală (Gomes et al., 2018).

O informație mai amplă referitor la rolul enterococilor poate fi obținută la investigarea efectivului acestora la animalele din loturile experimentale la administrarea rațiilor cu un anumit raport procentual al nutrienților de bază.

În scopul evidențierii corelației dintre indicii enterococilor cu cei ai masei corporale și dietă, animalelor (șobolanilor albi linia Wistar) le-au fost administrate rații alimentare special elaborate în corespundere cu principiile de corecție a greutății corporale.

Pentru a testa rațiile alimentare cu diferită structura procentuală a componentelor nutritive de bază – proteine, lipide și carbohidrați, animalele de laborator din ambele loturi au fost divizate în 4 subgrupe în corespundere cu rațiile administrate. Schema detaliată a experimentului este prezentată în capitolul 2. Structura rațiilor administrare este prezentată și în tabelul de mai jos (Tabelul 3.13.).

Pentru animalele de laborator din lotul I, cu greutatea corporală mai mică au fost elaborate rații, în care cota parte a proteinelor a crescut de la 14 până la 20%, iar cea a lipidelor s-a redus de la 28% la 23%.

Tabelul 3.13. Caracteristica cantitativă a componentelor de bază ale raţiilor alimentare administrate şobolanilor cu masă corporală diferită

Componentele nutritive din raţiile alimentare, %	**Subgrupe experimentale**			
	Lotul I (masa corporală mică)			
	Subgrupa 1	**Subgrupa 2**	**Subgrupa 3**	**Subgrupa 4**
Proteine	14	16	18	20
Lipide	28	26	25	23
Carbohidraţi	58	58	57	57
	Lotul II (masa corporală mare)			
Proteine	20	22	25	30
Lipide	25	23	22	21
Carbohidraţi	55	55	53	49

Pentru animalele din lotul II, cu greutatea corporală mai mare, raţiile elaborate au aceeaşi tendinţă de creştere a raportului procentual al proteinelor, de la 20% până la 30% şi de micşorare a raportului procentual al lipidelor, de la 25% până la 21%. În raţiile destinate ambelor loturi de animale cota parte a carbohidraţilor nu s-a modificat esenţial şi a constituit: 58% la subgrupele 1 şi 2 şi 57% la subgrupele 3 şi 4 din Lotul I, şi respectiv – 55 % la subgrupele 1 şi 2, 53% la subgrupa 3 şi 49% la subgrupa 4 (Tabelul 3.13.). Animalele din lotul martor au primit raţii alimentare standard destinate pentru întreţinerea animalelor de laborator.

Datele obţinute relevă variaţia cantităţii de enterococi (celule microbiene (lg) la 1 g de conţinut intestinal) în funcţie de raţia alimentară administrată (Figura 3.16.).

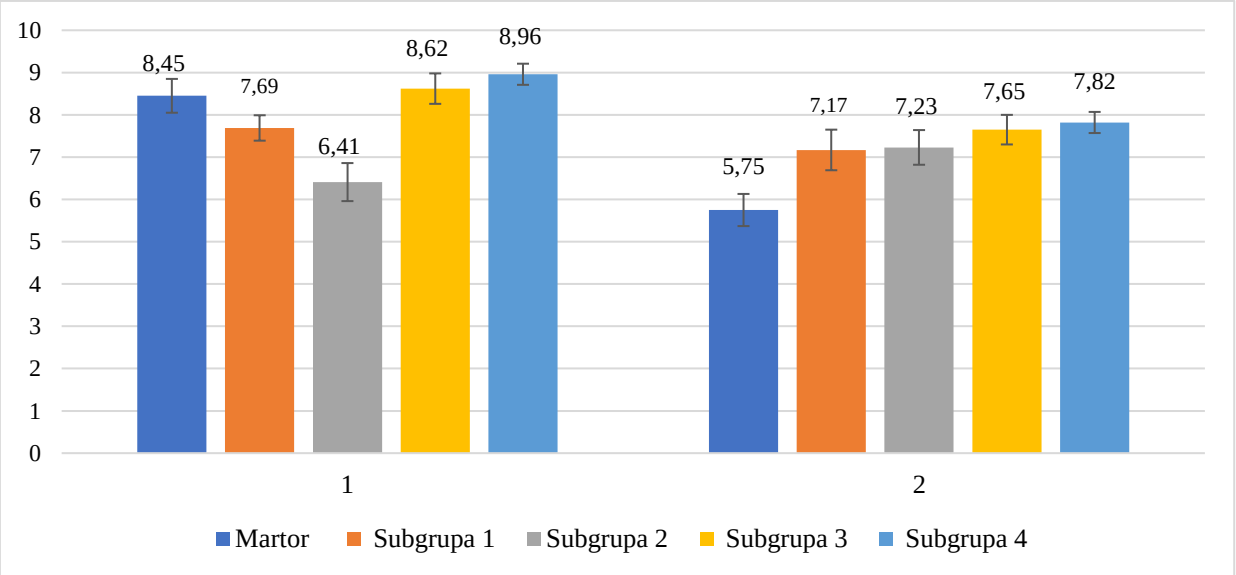


Figura 3.16. Cantitatea de celule microbiene de enterococi (lg la 1 g de conţinut intestinal) la şobolanii cu masa corporală mai mică (1) şi mai mare (2) la administrarea raţiilor cu diferit raport procentual al componentelor nutritive (subgrupele 1-4)

În lotul I, la animalele cu masa corporală mică, în subgrupa 1 (ce conținea 14% – proteine, 28% – lipide și 58% – carbohidrați) se atestă o micșorare cu 9% a cantității de enterococi față de lotul martor. O scădere mai mare a indicilor numerici ai enterococilor cu 25% se observă în subgrupa 2 experimentală, care au fost hrăniți cu rație ce conținea 16% – proteine, 26% – lipide și 58% – carbohidrați. Ulterior în subgrupele 3 și 4 de animale, care au primit rații alimentare cu un procent mai mare de proteine și mai mic de lipide s-a constatat o majorare cu 2% și respectiv 6% a nivelului de enterococi (Figura 3.16.).

În lotul II, la animalele cu greutate mai mare a fost stabilită o majorare continuă a nivelului de enterococi în toate subgrupele experimentale comparativ cu martorul. În subgrupa 1 această majorare a constituit 24%, în subgrupa 2-25%, în subgrupa 3-33%, iar în subgrupa 4-36%.

Astfel, s-a constatat că animalele de laborator cu diferită greutate corporală au, la nivel de microfloră intestinală, o sensibilitate diferită la structura calorică a nutrienților din rațiile alimentare.

De menționat, că cantitatea de enterococi la șobolanii din lotul II, cu greutatea corporală mare, este mai mică comparativ cu șobolanii din lotul I, cu masa corporală mai mică. Manipularea cu structura nutrienților din rațiile alimentare special concepute pentru corecția greutății corporale, și anume majorarea procentului de proteine și scăderea celui de lipide și carbohidrați (subgrupele 3 și 4 din lotul II) a contribuit la majorarea indicilor numerici ai enterococilor la animalele cu greutate corporală mare (Figura 3.16.).

Este dificil de a explica scăderea nivelului de enterococi la șobolanii cu o greutate corporală mai mică în subgrupele 1 și 2 experimentale, care au primit rații la care cota parte a proteinelor a constituit respectiv 14% și 16%, a lipidelor 28% și 26%, iar a carbohidraților 58%. Putem presupune că nivelul enterococilor este influențat mai mult de procentul mai mare al lipidelor. Anterior s-a discutat că conținutul ridicat de lipide în rația alimentară are o acțiune de inhibare asupra anumitor reprezentanți ai microflorei intestinale.

Este evident că nutrienții pot influența statutul fiziologic al organismului-gazdă prin modularea microbiotei intestinale (Beam A., et al., 2021).

Datele obținute coincid cu alte studii, reflectate în literatura de specialitate, care au stabilit că dietele bogate în grăsimi și dietele bogate în zaharoză pot avea efecte diferite asupra microbiotei intestinale. Kong și colab. (2019) au studiat șoarecii obezi care au fost hrăniți cu o dietă bogată în grăsimi și carbohidrați și cu o dietă normală timp de 13 săptămâni. Dieta cu exces de grăsimi a avut tendința de a scădea diversitatea microbiotei intestinale, în timp ce dieta bogată în carbohidrați a schimbat complet profilul bacteriilor legate de obezitate. Unele bacterii

favorabile (*Allobaculum, Bifidobacterium, Olsenella, Faecalibacterium* și *Ruminococcus*) au fost reduse în microbiota șoarecilor care au primit surplus de grăsimi, iar în grupul animalelor hrănite preponderent cu carbohidrați a fost înregistrată o creștere intensă a mai multor bacterii legate de obezitate – *Acinetobacter, Blautia* și *Dorea* (Kong C. et al., 2019).

Microbiota este considerată un factor central ce covariază cu statutul fiziologic al organismului, inclusiv cu bolile cronice, cum ar fi diabetul zaharat de tip 2, sindromul metabolic și bolile cardiovasculare. Mai mult, pentru aceste stări patologice, au fost identificați biomarkeri specifici legați de microbiotă (Zhong X. et al., 2020).

Pe de altă parte, într-un studiu realizat pe șobolani tineri, care au experimentat activitate fizică în fiecare zi, s-a observat că datorită exercițiului fizic șobolanii au dezvoltat un profil microbian mai avantajos, în care prevalează speciile de bacterii intestinale cu acțiune probiotică (Mika A. et al., 2015).

Datele obținute și cele reflectate în literatura de specialitate atestă că alimentația, prin diferite diete, grupuri de alimente, macronutrienți și micronutrienți, este principalul factor de modificare și remodelare al microbiotei intestinale, atât în aspect sanogen, cât și patogen.

Compoziția microbiotei, inclusiv nivelul enterococilor intestinali suferă modificări în funcție de statutul fiziologic al organismului gazdei, determinat fie de malnutriție, fie de greutatea corporală.

3.5. Concluzii la capitolul 3

1. Datele obținute pe obiectele biologice investigate (subiecții umani și animale) în diferite condiții și în funcție de statutul fiziologic al tubului digestiv și al organismului, atestă o corelație între indicii numerici ai enterococilor cu cei ai bifidobacteriilor și lactobacteriilor și indică la o posibilă „cooperare” dintre aceste bacterii, ce menține numericul de *E. coli* la un nivel ce nu permite dezvoltarea diferitor patologii intestinale.

2. Analiza incidenței enterococilor la animalele de diferite specii a relevat dominanța numerică (pe baza valorilor medii) a acestor bacterii la animalele domestice de companie – câine și pisică, comparativ cu animalele agricole, sălbatice și de laborator. Corelarea joasa a indicilor enterococilor cu cei ai bacteriilor benefice (bifido- și lactobacterii) și înaltă cu a bacteriilor patogene (*E. coli*) la animalele de companie, confirmă datele din literatura de specialitate, referitor la răspândirea largă a enterococilor la acest grup de animalele, ca rezultat al contactului restrâns al acestora cu oamenii și partajării unor medii comune de trai.

3. În funcție de mediul de trai a fost stabilit un nivel mai mare al enterococilor la păsările investigate din mediul rural față de mediul urban. La păsările din mediul urban se atestă o

corelație mai pozitivă dintre enterococi, bifidobacterii și lactobacterii în menținerea efectivului numeric al eschericiilor la un nivel mic, comparativ cu păsările din mediul rural. Acest fapt relevă că starea bacteriocenozei intestinale la păsările din mediul rural este mai puțin favorabilă față de cea a păsărilor din mediul urban și grădina zoologică, fapt ce denotă că în mediul rural, contactul cu alte animale domestice, precum și cu omul determină modificarea microflorei intestinale cu dominanța bacteriilor patogene.

4. A fost constatată tendința de majorare a efectivului enterococilor odată cu înaintarea în vârstă la subiecții umani. În perioada 1-16 ani cele mai mari valori ale enterococilor se atestă la vârsta de 3 ani, 10 ani și 14 ani. În perioada vârstei adulte – 20-50 de ani, indicele numeric al enterococilor este mai mare la subiecții cu vârsta de 50 ani, iar la vârstnici (60-70 de ani) la vârsta de 80 de ani.

5. Efectivul enterococilor este semnificativ influențat de starea de sănătate a tubului digestiv, fiind documentată majorarea cantității acestora la subiecții umani și la animalele agricole cu dismicrobism intestinal și disfuncții intestinale diareice. La subiecții umani cele mai mari diferențe între indivizii sănătoși și cu dereglări ale homeostaziei intestinale s-a observat la grupa de copii cu vârsta de 31-60 de zile și de 1-4 ani, iar la animalele agricole în primele 30 de zile de viață. Aceasta permite de a presupune că în primele, zile, luni și ani de viață formele sau tulpinile comensale ale enterococilor pot căpăta caractere patogene/virulente în cazurile, când se creează condițiile respective de infectare (de dismicrobism intestinal și disfuncții intestinale diareice).

6. Testarea rațiilor de diferită valoare nutritivă (cu exces de proteine, lipide, glicide) a evidențiat majorarea efectivului enterococilor la administrarea mai mult de 5 zile a rației cu exces de proteine și micșorarea la administrarea rației bogate în grăsimi și carbohidrați. De menționat, că în primele 5 zile de administrare a rației cu exces de proteine, conținutul enterococilor scade (ceea ce coincide cu creșterea valorilor *E. coli*), însă, la administrarea timp de 10-15 zile a rației predominant proteice, valorile numerice ale acestor bacterii cresc de circa 1,3 ori. Restabilirea regimului normal (standard) de alimentare determină revenirea efectivului bacteriilor la un nivel identic cu cel inițial experimentării rațiilor alimentare sau la nivelul lotului martor.

7. Modificările cantitative ale enterococilor în conținutul intestinal pe fondalul administrării rațiilor fie cu exces de proteine, lipide și glucide relevă caracterul de comensali al acestora, întrucât valorile numerice corelează pozitiv cu cele ale bacteriilor sanogene mediului intestinal și negativ cu microbii patogeni.

8. S-a constatat că rațiile cu diferită structură calorică testate prezintă o acțiune diferită asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali, ceea ce presupune că valoarea numerică a enterococilor poate fi reglată și menținută la nivel sanogen nu numai prin preparate microbiene cu acțiune probiotică, ci și prin utilizarea rațiilor alimentare, care manifestă acțiune prebiotică.

9. Majorarea efectivului enterococilor în comun cu bacteriile de *E. coli* și reducerea nivelului bifidobacteriilor și lactobacililor (lactobacteriilor) relevă că înfometarea/inanița creează, la nivelul microbiotei intestinale, condiții de dezvoltare a disbiozei într-un timp destul de mic, ceea ce presupune că bacteriile patogene pot forma „coaliții" cu enterococii, care în condiții normale nu manifestă patogenitate, cel mai probabil bazate pe o strategie de hrănire simbiotică încrucișată, ce a determinat creșterea valorii numerice a lor în conținutul intestinal.

10. A fost constatat că animalele de laborator cu greutate corporală diferită au valori distincte ale enterococilor intestinali, și anume indici mai mari la animalele cu greutate corporală mai mică și nivel redus la animalele cu masă corporală mai mare. Modelarea structurii nutrienților din rațiile alimentare determină modificarea efectivului enterococilor în direcția stabilizării nivelului la animale cu greutate mică și majorarea la animalele cu greutate mare, ceea ce relevă sensibilitatea enterococilor la valoarea calorică a macronutrienților și posibilitatea influențării microbiotei cu repercusiune asupra statutului fiziologic al organismului.

4. PROSPECȚIUNEA UNOR TULPINI DE ENTEROCOCI ÎN CALITATE DE PROBIOTICE

Enterococii reprezintă o parte componentă a microbiocenozei intestinale umane și animale, având un rol important în activitatea vitală a organismului gazdei (Sivieri K. et al. 2008; Hammerum AM., 2012). Unele tulpini de enterococi au fost utilizate în calitate de declanșatori în fermentarea alimentară și de bioprezervatori ai produselor alimentare. Totodată, tulpinile de enterococii au fost testate în ceea ce privește calitatea de probiotice. Însă, elaborarea de noi compoziții probiotice pe bază de enterococi necesită un studiu mai riguros, în vederea selectării tulpinilor sigure, inofensive pentru sănătatea organismului (Ben Braïek O., Smaoui S., 2019).

Identificarea tulpinilor utile de microorganisme cu calități de probiotice se bazează pe mai multe caracteristici, dintre care un criteriu important reprezintă capacitatea de a coloniza tubul digestiv. Acest proces este destul de complex și depinde de mai mulți factori. Printre acești factori se numără proprietatea de adeziune a microorganismelor din componența probioticelor, care este importantă și responsabilă pentru interacțiunea dintre tulpinile probiotice și organismul-gazdă și stă la baza antagonismului față de patogeni (Nishiyama K. et al., 2016).

Mecanismul de adeziune este determinat de interacțiunea dintre complexele moleculare (proteine, oligozaharide) de pe suprafața bacteriilor și componentele glicoconjugate ale celulelor intestinale epiteliale, mai precis ale mucusului acestora. Particularitățile formării asociațiilor dintre proteinele bacteriene și componentele mucusului intestinal stabilește o aderență diferită, care poate fi considerată ca o strategie a organismului-gazdă în selectarea anumitor specii sau tulpini benefice de microorganisme (Monteagudo-Mera A. et al., 2019).

După cum a fost relatat anterior (subcapitolul 1.4), unele tulpini de *E. faecalis* și *E. faecium* au demonstrat capacitatea de a exclude/inhiba, pe baza proprietăților de aderare la mucoasa intestinală, unele bacterii patogene, cum ar fi: *E. coli, Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* și *Shigella sonnei* (He Y., et al., 2019). A fost stabilită proprietatea unor tulpini de enterococi, selectate pentru aplicare ca probiotice (tulpina de *Enterococcus faecium* OV3-6), de a supraviețui în condiții de simulare proprii stomacului și intestinului subțire. Se cunoaște că una din caracteristicile de bază în selectarea probioticelor este rezistența la sucul gastric și la bilă (Rossi et al., 2018), de a reduce adeziunea bacteriilor *E. coli* și a *S. typhi* la celulele Caco-2 intestinale și de a preveni multpilicarea tulpinilor Gram-pozitive ce aparțin genurilor *Bacillus, Carnobacterium, Listeria* și *Staphylococcus* (Choeisoongnern T. et al., 2021).

Astfel, deși reprezentanții enterococilor sunt implicați în mai multe infecții nosocomiale, datorită factorilor de virulență și rezistenței la antibiotice, totuși unele tulpini, în special a

speciilor de *E. faecalis* și *E. faecium,* demonstrează proprietăți bune de probiotice, bazate pe capacitate de adeziune și, respectiv, activitatea antagonistă față de microorganismele patogene. În acest context, identificarea noilor tulpini de enterococi ce se remarcă prin propretăți benefice (sanogene), reprezintă un studiu de perspectivă în elaborarea de noi compoziții probiotice, ce conțin specii de enterococi și/sau tulpini ale acestora.

4.1. Izolarea tulpinilor de enterococi și studierea proprietăților de adeziune și activității antagoniste față de patogeni ale acestora în vederea utilizării lor ca probiotice

În scopul identificării unor tulpini benefice de enterococi și caracterizării proprietăților ce stau la baza utilizării lor în calitate de probiotice, au fost izolate tulpini de enterococi și alte bacterii coliforme (streptococi și lactococi) de la animale și subiecți umani (copii) cu statut fiziologic sănătos al tubului digestiv.

Este necesar de a menționa, că tulpinile de bacterii ce aparțin genului *Enterococcus* au fost studiate în comparație cu bacteriile genului *Lactococcus* și *Streptococcus*, întrucât toate aceste genuri cuprind bacteriile acidolactice, care produc acid lactic ca produs metabolic final (major) al fermentației carbohidraților și care se referă taxonomic la ordinul *Lactobacillales*. Mai mult, până în anul 1984, enterococii, apoi până anul 1985, lactococii, au fost considerați ca streptococi și atribuiți genului *Streptococcus*: enterococii fiind denumiți streptococi ai grupului D, iar lactococii – streptococi ai grupului N (N1). Astfel, după anul 1985, pe baza caracteristicilor biochimice și moleculare, reprezentanții genului *Streptococcus,* destul de divers, au fost reclasificați în *Lactococcus, Enterococcus, Vagococcus* și *Streptococcus* (Schleifer K.H. et al., 1985). Lactococii sunt frecvent utilizați ca inițiatori ai fermentației produselor lactate și în producerea de brânzeturi (Teuber M., 1995). Aceste bacterii pot fi utilizate ca monoculturi sau în asociații cu alte tulpini de bacterii lactice, cum ar fi *Lactobacillus* și *Streptococcus*. De asemenea, lactococii, spre deosebire de enterococi, nu au nicio problemă în ceea ce privește siguranța lor, deoarece, la fel ca și lactobacilii, aceștia au statutul GRAS, FOSHU și QPS (Bandyopadhyay B. et al., 2022).

De la subiecți umani sănătoși – copii, cu vârsta cuprinsă între 1-16 ani, au fost izolate 834 de tulpini de bacterii coliforme, dintre care 301 de enterococi. De la animale – viței și purcei, fără simptome de disfuncții intestinale, au fost izolate 120 și respectiv 407 de tulpini de bacterii coliforme, dintre care 54 și 209 de tulpini au constituit enterococii (Tabelul 4.1.).

Tabelul 4.1. Apartenența de gen a bacteriilor acidolactice din conținutul intestinal de la subiecții umani și animale

Vârsta,	Cantitatea totală de tulpini supusă cercetărilor	Apartenența de gen	Cantitatea tulpinilor izolate	Cota, %
Subiecți umani				
1 an	75	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	35 26 **14**	46,66 34,66 18,66
2 ani	83	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	39 28 **16**	46,98 37,73 19,27
3 ani	95	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	44 30 **21**	46,31 31,57 22,10
5 ani	110	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	31 37 **42**	28,18 36,63 38,18
7 ani	112	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	27 38 **47**	24,10 33,92 41,96
10 ani	114	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	23 42 **49**	20,17 36,84 42,98
12 ani	121	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	20 47 **54**	16,52 38,84 44,62
16 ani	124	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	17 49 **58**	13,70 39,51 46,77
Animale agricole – viței				
1-20 de zile	57	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	25 17 **15**	43,85 29,82 26,31
25-35 de zile	63	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	4 20 **39**	6,35 31,74 61,90
Animale agricole – purcei				
1-27 de zile	76	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	45 19 **12**	59,21 25,00 15,78
30-47 de zile	78	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	11 21 46	14,10 26,92 58,97
50-135 de zile	253	*Lactococcus* *Streptococcus* ***Enterococcus***	15 87 151	5,93 34,38 59,68

Tulpinile izolate de *Enterococcus, Lactococcus* și *Streptococcus* au fost testate după proprietatea de adeziune și activitatea antagonistă manifestată față de bacteriile patogene în condiții *in vitro*.

Capacitatea de adeziune a enterococilor a fost studiată în conformitate cu metoda lui Brilis (1986), folosind eritrocitele ca model pentru celulele macroorganismului (celulele epiteliului intestinal). Studierea adeziunii s-a efectuat cu ajutorul microscopului fotonic. Calculul, s-a realizat în baza a 25 de eritrocite, analizând 5 eritrocite în câmpul vizual. La evaluarea proprietăților adezive a fost utilizat indicele adeziunii microorganismelor (IAM), după care a fost determinat nivel de adeziune al acestora. Detaliat această metodă este descrisă în capitolul 2. Rezultatele obținute privind capacitatea adezivă a tulpinilor izolate de bacterii sunt reflectate în tabelul de mai jos.

Tabelul 4.2. Capacitatea adezivă a unor tulpini de enterococi, streptococi și lactococi, izolate din tractul gastrointestinal al copiilor, vițeilor și purceilor cu statut fiziologic sănătos al tubului digestiv

Numărul de monotulpini testate		Genul microorganismelor	Cantitatea celulelor microbiene aderate la 25 de eritrocite sanguine native	Indicele adeziunii
Subiecți umani				
834	301	*Enterococcus*	114,50-119,30	4,58-4,77
	297	*Streptococcus*	91,70-109,40	3,66-4,37
	236	*Lactococcus*	79,00-92,50	3,16-3,70
Viței				
120	54	*Enterococcus*	107,20-116,70	4,28-4,66
	37	*Streptococcus*	78,40-86,60	3,13-3,46
	29	*Lactococcus*	65,70-76.20	2,62-3,04
Purcei				
407	209	*Enterococcus*	109,60-112,50	4,38-4,50
	127	*Streptococcus*	81,40-90,70	3,25-3,62
	71	*Lactococcus*	72,70-82,50	2,90-3,30

Datele privind capacitatea adezivă a genurilor de bacterii studiate relevă valori mai mari ale indicelui adeziunii la tulpinile izolate din tubul digestiv uman, comparativ cu cele specifice tractului gastrointestinal bovin și porcin (Tabelul 4.2.).

Astfel, la subiecții umani, valoarea indicelui de adeziune a tulpinilor izolate de enterococi variază de la 4,58 până la 4,77, a celor de streptococi – de la 3,66 până la 4,37 și a celor de lactococi – de la 3,16 până la 3,70.

Indicele de adeziune a tulpinilor izolate din conținutul intestinal de la bovine a constituit respectiv: pentru enterococi – 4,28-4,66; pentru streprococi – 3,13-3,46 și pentru lactococi – 2,62-3,04.

Tulpinile de bacterii izolate din conținutul intestinal de la porcine au avut aproximativ același nivel a capacității adezive ca și tulpinile izolate din conținutul intestinal de la bovine, și anume: indicele adeziunii enterococilor a constituit – 4,38-4,50; a streprococilor – 3,25-3,62, iar a lactococilor – 2,90-3,30.

S-a remarcat, că proprietățile adezive ale monotulpinilor de enterococi au fost mai evidente/pronunțate, comparativ cu indicii obținuți pentru strepto- și lactococi (Tabelul 4.2.). La subiecții umani indicele adeziunii enterococilor este aproximativ de 1,3 ori mai mare decât cel al streptococilor și de 1,3-1,5 ori mai mare decât cel al lactococilor.

La animale (bovine și porcine) nivelul acestui indice la tulpinile de enterococi este de circa 1,2-1,4 ori mai mare comparativ cu streptococii și de circa 1,4-1,5 ori mai mare comparativ cu lactococii. Aceasta denotă despre faptul că enterococii au o capacitate înaltă de a coloniza cavitățile interne, inclusiv tubul digestiv, de a concura cu alte bacterii pentru anumite „nișe" din aceste cavități și de a „exclude" alte bacterii, în special cele patogene. De asemenea, criteriul ce relevă capacitatea de adeziune sau indicele adeziv al microorganismelor este contorizat în selectarea tulpinilor pentru preparate probiotice (Krawczyk B. et al., 2021).

Un alt criteriu important în identificarea tulpinilor de bacterii în calitate de probiotice, reprezintă activitatea antibacteriană (antagonistă) a monoculturilor de bacterii, testată față de bacteriile patogene (Tabelul 4. 3.). Metoda de determinare a activității antibacteriene/antagoniste este descrisă în capitolul 2. De remarcat, că activitatea antagonistă se evaluează în baza indicelui de combatere a provocatorilor maladiilor diareice la subiecții umani și la animale (%).

Tabelul 4.3. Activitatea antagonistă a tulpinilor de enterococi, streptococi și lactococi, izolate din tractul gastrointestinal al copiilor și animalelor agricole tinere, %

Cantitatea monotulpinilor cercetate		**Genul**	**Indicele de combatare a patogenilor, %**		
			Escherichia coli	***Proteus vulgaris***	***Staphylococcus aureus***
Subiecții umani (copii)					
834	301	*Enterococcus*	85,45-89,35	71,25-77,57	78,40-85,70
	297	*Streptococcus*	72,35-79,69	69,64-75,40	74,55-82,60
	236	*Lactococcus*	68,75-70,37	59,45-65,60	71,25-76,75
Animale - bovine					
120	54	*Enterococcus*	81,39-85,62	64,40-68,59	69,27-75,37
	37	*Streptococcus*	65,71-68,44	57,32-61,18	64,65-70,20
	29	*Lactococcus*	58,39-63,25	63,46-66,31	56,78-61,58
Animale - porcine					
407	209	*Enterococcus*	82,35-86,48	66,75-70,20	70,60-77,45
	127	*Streptococcus*	67,46-69,37	62,57-68,32	66,51-71,25
	71	*Lactococcus*	62,50-66,35	58,64-63,47	60,72-65,54

Rezultatele obținute în urma testării supernatantelor tulpinilor de *Enterococcus*, *Lactococcus* și *Streptococcus* au relevat o activitate antimicrobiană înaltă împotriva *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* și *Staphylococcus aureus* (Tabelul 4.3).

De menționat, că datele au fost obținute în proiectul 09.816.09.07A „*Elaborarea și testarea noilor remedii medicamentoase pentru menținerea coordonată a bacteriocenozei*

intestinale la nivel sanogen”, sub conducerea dnei Maria Timoșco și a prevăzut efectuarea testărilor utilizând bacterii patogene.

Rezultatele privind activitatea antagonistă a tulpinilor izolate de enterococi, streptococi și lactococi, manifestată față de bacteriile patogene, relevă același tablou al modificărilor descris pentru capacitatea adezivă a acestora. Activitatea antagonistă a tulpinilor de microorganisme din genurile *Enterococcus, Streptococcus* și *Lactococcus,* exprimată prin indicele de combatere a escherichiilor, proteilor și stafilococilor în condiții *in vitro,* este diversă în funcție de obiectul de studiu (subiecți umani și animale) și în funcție de tulpinile izolate.

Astfel, la subiecții umani (copii) se atestă o activitatea antagonistă (antibacteriană) mai mare a tuturor tulpinilor investigate (*Enterococcus, Streptococcus* și *Lactococcus*), comparativ cu animalele (viței și purcei). De exemplu, la tulpinile de enterococi de la subiecții umani, valoarea indicelui de combatere a *E. coli* este în limita 85,45%-89,35%, a *Proteus vulgaris* – în limita 71,25%-77,57% și a *Staphylococcus aureus* – în limita 78,40%-85,70%.

Activitatea antagonistă a tulpinilor izolate de enterococi din conținutul intestinal de la bovine (viței tineri) și porcine (purcei tineri) este mai mică și constituie: față de *E. coli* – 81,39%-85,62% și 82,35%-86,48% respectiv; față de *Proteus vulgaris* – 64,40%-68,59% și 66,75%-70,20% respectiv, și față de *Staphylococcus aureus* – 69,27%-75,37% și 70,60%-77,45% respectiv.

Aceeași tendință (valori mai mari la tulpinile de microorganisme izolate de la subiecții umani și mai mici la tulpinile din conținutul intestinal al animalelor agricole) privind activitatea antibacteriană a fost constatată și pentru tulpinile izolate de streptococi și lactococi (Tabelul 4.3.).

După cum a fost menționat anterior, o activitate antagonistă mai mare a fost stabilită pentru tulpinile de enterococi, comparativ cu tulpinile de streptococi și lactococi (Tabelul 4.3.).

La subiecții umani, indicele de combatere a *E. coli* a tulpinilor de enterococi este de 1,1-1,3 ori mai mare comparativ cu cel al tulpinilor de streptococi și lactococi. Corespunzător, activitatea antagonistă a enterococilor față de *Proteus vulgaris* a fost de 1,0-1,2 ori mai mare, iar față de *Staphylococcus aureus* – de 1,0-1,1 ori mai mare.

O diferență mai mare, de 1,2-1,4 ori, a valorii indicelui de combatere a *E. coli* a fost atestată între tulpinile de enterococi și cele de streptococi și lactococi, izolate din conținutul intestinal al bovinelor și porcinelor.

La animale ca și la subiecții umani, indicele de combatere a *Proteus vulgaris* și *Staphylococcus aureus* caracteristic tulpinilor de enterococi a fost de circa 1,0-1,2 ori mai mare comparativ cu tulpinile de streptococi și lactococi (Tabelul 4.3.).

Este cunoscut faptul că activitatea antagonistă față de patogeni sau activitatea antibacteriană a unor microorganisme este determinată de anumite substanțe – bacteriocine, care sunt produse de acestea. Bacteriocinele produse de enterococi, numite enterocine, au o activitate antibacteriană pronunțată, ceea ce „permite" întrebuințarea enterococilor (tulpinilor nepatogene) în calitate de remedii alternative antibioticelor și/sau în calitate de preparate probiotice.

Datele obținute referitor la activitatea antagonistă a tulpinilor de enterococi izolate fie de la subiecții umani, fie de la animalele de fermă confirmă oportunitatea utilizării lor ca remedii de combatere a patogenilor ce provoacă disfuncții ale microflorei intestinale.

În acest context, trebuie de menționat că activitatea antagonistă și capacitatea de adeziune a tulpinilor de bacterii a fost studiată la general. Însă, fiecare tulpină de microorganisme poate avea proprietăți distincte. Mai mult, în componența remediilor de origine bacteriană, inclusiv probiotice, se includ anumite tulpini de microorganisme, ce întrunesc anumite caracteristici înaintate față de astfel de preparate, precum și cerințele legate de siguranță (să fie nepatogene).

Reieșind din aceste considerente, din tulpinile izolate de *Enterococcus, Lactococcus* și *Streptococcus* au fost selectate/evidențiate tulpini, care ulterior au fost din nou testate privind capacitatea adezivă și activitatea antagonistă.

Selectarea tulpinilor a fost efectuată după principiul de fermentare sau scindare a substraturilor specifice pentru fiecare tip de bacterie. De exemplu, tulpinile de enterococi se determină după proprietatea lor de a fermenta sau de a scinda astfel de substraturi din mediul nutritiv, precum gelatina, amidonul, hipuratul, esculina și arginina (Квасников Е.И., Нестеренко О.А., 1975). Reacția individuală a tulpinilor izolate este prezentată în anexa 4, tabelele 1, 2 și 3.

Tulpinile selectate au fost divizate în conformitate cu sursa: subiecții umani și animale (Tabelul 4.4.). Fiecare tulpină are un număr care coincide cu numărul de ordine pentru fiecare obiect biologic din conținutul intestinal al căruia au fost selectate tulpinile. Numerele de ordine au fost notate separat pentru subiecții umani și pentru fiecare grupă de animale.

De remarcat, că de la subiecții umani au fost selectate mai multe tulpini comparativ cu animalele (Tabelul 4.4.).

Tabelul 4.4. Distribuția tulpinilor de enterococi și lactococi după sursă

Sursa	Tulpinile selectate (numărul)
Conținutul intestinal de la subiecții umani	18; 25; 32; 46; 49; 58; 67; 70; 82; 85; 89; 93; 108; 112; 116
Conținutul intestinal de la animale	13; 21; 37; 43; 55; 64; 74; 77; 97; 101; 129

Principiul de selectare a tulpinilor prezentate în tabel a fost siguranța apartenenței tulpinii la un anumit grup de bacterii acidolactice. De menționat, că în totalul tulpinilor selectate au fost incluse monotulpini de enterococi și lactococi, din considerentele testării comparative a enterococilor cu lactococii, care au potențial sanogen dovedit și sunt cu succes incluse în preparate probiotice.

Tulpinile de enterococi și lactococi izolate din conținutul intestinal uman și animal au fost testate din nou privind capacitatea lor individuală de adeziune și activitatea antagonistă/antibacteriană față de patogeni (Tabelul 4.5.).

Reiterăm, că capacitatea de adeziune și activitatea antagonistă a bacteriilor, reprezintă proprietăți importante (cruciale) în colonizarea tubului digestiv, ce determină interacțiunea cu epiteliul intestinal al organismului-gazdă și influențează sistemul imunitar al acestuia și care reprezintă proprietăți importante în definirea preparatelor probiotice.

Rezultatele cercetării privind capacitatea adezivă a tulpinilor de enterococi și altor bacterii acidolactice (lactococii) selectate au arătat un indice de adeziune cuprins în intervalul 2,81-4,67 (Tabelul 4.5.).

O capacitate de adeziune mai mare a fost identificată la tulpinile de enterococi din conținutul intestinal uman, care variază de la 3,18 până la 4,67. La compararea acestui indice dintre monotulpinile de enterococi și lactococi, au fost evidențiate valori identice pentru ambele tipuri de bacterii. Astfel, indicele de adeziune a monotulpinilor de enterococi constituie 3,18-4,67, iar a monotulpinilor de lactococi – 4,08-4,27. Cea mai mare valoare a indicelui de aderență a fost notată la tulpina de enterococi nr. 116, respectiv cu un indice de 4,67. Dintre tulpinile de lactococi cea mai valoare a fost înregistrată pentru monotulpina cu nr. 25.

Indicele adeziunii tulpinilor de bacterii selectate din conținutul intestinal animal variază de la 2,81 până la 3,85, și a fost cercetat în comparație la monotulpinile de enterococi și lactococi. Cea mai mare valoare (3,85) a fost detectată la tulpina de enterococi nr. 77. Dintre tulpinile de enterococi selectate, capacitate adezivă mare a fost marcată și la monotulpina cu nr. 129 (3,65) și nr. 74 (3,72). Dintre tulpinile de lactococi, au fost evidențiată monotulpina cu nr. 37, la care indicele de adeziune a constituit 3,45 (Tabelul 4.5.).

Din perspectiva identificării proprietăților de probiotice, constatăm că tulpinile de enterococi din conținutul intestinal de la subiecții umani și animale au o capacitate de aderență nu mai mică, iar în unele cazuri chiar mai mare, comparativ cu lactococii.

Tabelul 4.5. Capacitatea de adeziune a tulpinilor de bacterii acidolactice (enterococi și lactococi) specifice tractului digestiv uman și animal

Numărul tulpinii izolate și testate	Cantitatea de celule microbiene aderente pe suprafața a 25 de eritrocite native	Indicele de adeziune
Din conținutul intestinal de la subiecții umani		
Monotulpini de enterococi		
18	102,50±3,50	3,18
49	103,50±3,50	4,14
58	103,00±2,00	4,12
70	104,00±3,00	4,16
89	99,50±3,50	3,98
108	102,50±3,50	4,10
112	104,00±3,00	4,16
116	116,75±2,25	4,67
Monotulpini de lactococi		
25	106,75±3,25	4,27
32	103,75±1,25	4,15
46	102,50±2,50	4,10
67	102,00±3,00	4,08
82	102,75±2,25	4,11
85	103,50±2,50	4,14
93	103,00±4,00	4,12
Din conținutul intestinal de la animale		
Monotulpini de enterococi		
13	79,50±2,50	3,18
21	89,75±2,25	3,59
43	81,00±3,00	3,24
55	70,25±1,75	2,81
74	93,00±2,00	3,72
77	96,25±1,75	3,85
97	89,25±3,75	3,57
129	91,25±3,75	3,65
Monotulpini de lactococi		
37	86,25±2,75	3,45
64	86,00±4,00	3,44
101	78,00±3,00	3,12

Tulpinile selectate, de asemenea, au fost studiate în aspectul activității antagoniste față de agenți patogeni. Activitatea antibacteriană a supernatantului culturii acestor tulpini a fost testată față de bacteriile *Escherichia* și *Salmonella* (Tabelul 4.6.).

Tabelul 4.6. Activitatea antagonistă a tulpinilor izolate de enterococi și lactococi, specifice tractului digestiv uman și animal

Numărul tulpinii de enterococi izolate și testate	Număr absolut de celule microbiene per 1 ml de suspensie microbiană în logaritmi zecimali (lg), inoculate împreună cu bacterii din genul				Indicele de combatere al patogenilor, %	
	Escherichia		*Salmonella*		*Escherichia*	*Salmonella*
	la început	*la final*	*la început*	*la final*		
Din conținutul intestinal de la subiecții umani						
Monotulpini de enterococi						
18	3,90±0,09	2,74±0,07	3,46±0,10	2,77±0,07	29,74	19,94
49	3,70±0,08	2,84±0,16	3,76±0,17	3,04±0,12	23,24	19,14
58	3,95±0,12	3,07±0,13	3,70±0,12	2,98±0,15	22,27	19,45
70	3,69±0,11	2,72±0,09	3,54±0,14	2,64±0,17	26,28	25,42
89	4,20±0,10	3,32±0,1	3,68±0,11	2,92±0,07	20,95	25,85
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**
Monotulpini de lactococi						
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±0,06	3,77±0,05	3,04±0,13	24,47	19,36
46	3,46±0,05	2,70±0,00	3,82±0,04	3,00±0,19	21,96	21,45
67	4,11±0,11	3,23±0,12	3,62±0,26	2,88±0,13	21,41	20,44
82	3,77±0,13	2,87±0,13	3,46±0,08	2,88±0,13	23,87	19,76
85	4,07±0,12	3,04±0,05	3,84±0,09	2,94±0,04	25,30	23,43
93	3,79±0,11	2,88±0,04	3,62±0,13	2,81±0,12	24,01	22,37
Din conținutul intestinal de la animale						
Monotulpini de enterococi						
13	4,25±0,09	3,46±0,06	3,84±0,09	3,13±0,14	**18,58**	**18,48**
21	3,60±0,07	2,90±0,08	3,41±0,13	2,92±0,08	**19,44**	**14,36**
43	3,50±0,1	2,90±0,13	3,60±0,07	3,07±0,04	17,14	14,72
55	3,70±0,04	3,00±0,12	3,65±0,06	3,11±0,13	18,91	14,79
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**
97	4,17±0,09	3,43±0,07	3,54±0,14	2,98±0,14	17,74	15,81
129	4,13±0,08	3,41±0,11	3,80±0,10	3,23±0,12	17,43	15,00
Monotulpini de lactococi						
37	3,64±0,11	2,98±0,1	4,17±0,13	3,46±0,09	**18,13**	**17,02**
64	3,78±0,13	3,11±0,11	3,77±0,07	3,17±0,13	17,72	15,91
101	4,04±0,07	3,46±0,12	3,76±0,08	3,25±0,10	14,35	13,56

Datele privind capacitatea antagonistă (Tabelul 4.6.) au indicat o activitate antibacteriană înaltă față de agenți patogeni (*Escherichia* și *Salmonella*) manifestată de tulpinile de bacterii (enterococi și lactococi) selectate din conținutul intestinal uman, comparativ cu cele din tractul digestiv animal.

Activitatea antagonistă a tulpinilor de enterococi specifică tractului digestiv uman variază de la 20,95% până la 32,16% față de *Escherichia* și de la 19,14% până la 25,85% față de *Salmonella* (Tabelul 4.6). Cele mai eficiente tulpini în combaterea escherichiilor au fost cele cu nr. 116 (31,16%), 18 (29,74%) și 70 (26,28%), iar în inhibarea salmonelei – tulpinile cu nr. 89

(25,85%), 116 (25,53%) și 70 (25,42%). De remarcat, că tulpina cu nr. 89 a avut cea mai mică activitate de combatere a *Escherichia* și cea mai mare de control al *Salmonelei*, ceea ce oricum nu ne permite de a recomanda această tulpină în calitate de potențial probiotic. Astfel, dintre tulpinile selectate din conținutul intestinal uman, cele mai înalte valori de control al patogenilor au avut tulpinile cu nr. 116, pentru care coeficientul de control al *Escherichia* și *Salmonella* a constituit 32,16% și respectiv 25,53% și tulpina cu nr. 70, pentru care coeficientul de control al *Escherichia* a constituit 26,68% și al salmonelei – 25,42%.

Activitatea antagonistă a tulpinilor de lactococi a fost la nivel de 21,41-25,30% față de escherichii și de 19,36-23,43% față de salmonela și este mai mică comparativ cu activitatea antibacteriană a tulpinilor de enterococi.

La tulpinile de enterococi specifice tractului digestiv animal, coeficientul de combatere/control al escherichiilor a variat de la 16,26% până la 19,44%, iar cel al salmonelei de la 15,18% până la 18,48%. Cea mai mare activitate de combatere a escherichiei a fost stabilită pentru tulpinile cu nr. 21 (19,44%), nr. 77 (19,34%) și nr. 13 (18,58%). Activitate antibacteriană înaltă față de salmonela a fost depistată la tulpina cu nr. 13 (18,48%) și la tulpina cu nr. 77 (18,28%). Deci, cele mai eficiente tulpini, în aspectul inhibării bacteriilor patogene s-au dovedit a fi tulpinile cu nr. 77, la care coeficientul de inhibare al escherichiei a fost de 19,34%, și a salmonelei respectiv de 18,28% și la tulpina cu nr. 13, la care coeficientul de inhibare al escherichiei a fost de 18,58%, iar a salmonelei respectiv de 18,48%. Tulpina cu nr. 21 este mai eficientă în combaterea escherichiei, dar nu și a salmonelei. Dintre tulpinile de lactococi investigate cea mai mare activitate antibacteriană a fost notată pentru tulpina cu nr. 37, la care coeficientul de inhibare al escherichiei a fost de 18,13%, și a salmonelei respectiv de 17,02%.

Pe baza datelor obținute se poate afirma că toate tulpinile de enterococi izolate pentru prima dată au evidențiat un anumit potențial ce ar permite utilizarea lor ca probiotice, exprimat prin capacitatea înaltă de adeziune și nivel ridicat de combatere a patogenilor (activitate antagonistă).

În baza analizei datelor privind atât capacitate de adeziune, cât și activitatea antagonistă (antibacteriană) s-a constatat că cei mai înalți indici au manifestat tulpina cu nr. 116 din conținutul intestinal uman și tulpina cu nr. 77 din conținutul intestinal animal, care pot fi recomandate pentru aplicarea ulterioară a lor în compoziții cu efect probiotic.

În continuare, au fost efectuate investigații în condiții *in vivo* pe animale de laborator (șoareci albi), care au avut ca scop elucidarea acțiunii asociațiilor noi de microorganisme (compoziții), elaborate în baza tulpinilor de enterococi și a bacteriilor din genurile *Bifidobacterium* și *Lactobacillus* în comparație cu alte preparate microbiene. Testarea a fost

efectuată în baza modificării indicilor cantitativi ai unor reprezentanți microbieni intestinali cu acțiune sanogenă și patogenă (*Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterococcus, Escherichia, Proteus*) (Tabelul 4.7.).

Investigațiile au fost efectuate pe animale de laborator, șoareci albi, care au fost divizați în cinci grupe/ loturi a câte 10 animale în fiecare grupă. Lotul I a servit drept control; lotul II a primit preparatul Bifidobacterin (pe baza de bifidobacterii); lotul III – a primit preparatul Lacidofil WM (conținând lactobacili); lotul IV – preparatul Bifiform (cuprinde bifidobacterii si enterococi); grupa V – asociația bacteriilor (compoziție bacterinaă), elaborată în premieră pe baza tulpinilor de microorganisme din genul *Enterococcus* (*E. faecium*) și din genurile *Bifidobacterium* și *Lactobacillus*.

Toate preparatele au fost administrate oral, pe fondul dismicrobiosmului intestinal, timp de 6 zile, câte 1 ml suspensie microbiana (1 miliard de celule microbiene) la 1 animal pe zi (înainte de hrănirea de dimineață). Probele de conținut intestinal diluat au fost studiate la începutul și sfârșitul experimentului (înainte și după 6 zile de administrare a preparatelor microbiene studiate). Eficiența preparatelor microbiene administrate a fost evaluată în baza modificării indicilor cantitativi ai microorganismelor din genurile: *Bifidobacterium, Lactobacillus, Escherichia, Proteus, Enterococcus,* ca reprezentanți ai microbiocenozei intestinale.

În lotul martor, pe durata experimentului, s-a observat o majorare a numărului de celulele bacteriene, însă, această majorare este determinată de factorii interni, întrucât animalele din lotul martor nu au primit niciun remediu microbian. Mai mult, la animalele din grupa de control au păstrat simptomele de dismicrobism, determinat de valori înalte ale bacteriilor *Escherichia* și *Proteus* pe durata experimentului. De asemenea, pe fondalul dismicrobismului au fost atestate și valori înalte ale enterococilor. Aceasta confirmă constatarea anterioară că în cazul disfuncțiilor intestinale, aceste bacterii au o corelație pozitivă cu bacteriile patogene, își măresc efectivul și la rândul său pot manifesta acțiune patogenă.

La administrarea preparatelor microbiene cu acțiune probiotică se observă o majorare a efectivului bacteriilor genurile obligative (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*) și diminuarea celui a bacteriilor facultative (*Escherichia* și *Proteus*). Specificul modificărilor enterococilor depinde mai mult de cel al bacteriilor obligative, stabilindu-se un anumit coraport dintre acestea în funcție de preparatul administrat (Tabelul 4.7.).

Tabelul 4.7. Indici cantitativi ai unor bacterii ale microbiocenozei intestinale (la șoarecii albi) la administrarea diferitor preparate microbiene

Loturile experimentale, preparatul administrat	Grupele de microorganisme evaluate	Numărul de celule microbiene la 1 g de conținut intestinal, logaritm zecimal (lg)		Deosebirea, comparativ cu: %	
		la început	*la sfârșit*	**datele inițiale**	**martor**
I Martor	*Bifidobacterium*	7,20±0,12	7,82±0,10*	+8,61	
	Lactobacillus	6,11±0,11	6,77±0,11**	+10,80	
	Escherichia	8,53±0,11	9,49±0,12***	+11,25	
	Proteus	3,04±0,10	4,14±0,08***	+26,18	
	Enterococcus	**6,49±0,12**	**7,23±0,13****	**+11,40**	
II Bifidobacterin	*Bifidobacterium*	7,17±0,08	9,41±0,07***	+31,24	+20,64
	Lactobacillus	6,88±0,12	7,72+0,09***	+12,20	+14,30
	Escherichia	8,84±0,13	7,46±0,12***	-15,61	-21,39
	Proteus	3,11±0,09	2,07±0,10***	-33,44	-50,00
	Enterococcus	**6,77±0,11**	**7,90±0,14*****	**+19,99**	**+9,26**
III Lacidofil	*Bifidobacterium*	7,53±0,11	8,04±0,13*	+8,05	+2,81
	Lactobacillus	6,32±0,12	8,32±0,10***	+31,64	+22,89
	Escherichia	8,96±0,10	7,54±0,14***	-15,84	-20,54
	Proteus	3,00±0,13	1,23±0,12***	-59,00	-70,28
	Enterococcus	**6,84±0,15**	**7,04±0,13**	**+2,92**	**+2,62**
IV Bifiform	*Bifidobacterium*	7,23±0,13	9,20±0,12***	+18,03	+17,64
	Lactobacillus	6,63±0,11	7,70±0,13***	+16,13	+13,73
	Escherichia	8,68±0,12	6,82±0,10***	-21,42	-28,13
	Proteus	3,07±0,11	1,17±0,10***	-61,88	-71,73
	Enterococcus	**6,54±0,14**	**8,62±0,10*****	**+31,80**	**+19,22**
V Compoziție experimentală, ce conține tulpini de enterococi	*Bifidobacterium*	7,60±0,10	9,47±0,13***	+24,60	+21,09
	Lactobacillus	6,50±0,11	8,65±0,09***	+33,07	+27,76
	Escherichia	8,46±0,12	5,79±0,11***	-28,25	-38,98
	Proteus	3,17±0,08	0***	-100,0	-100,0
	Enterococcus	**6,32±0,13**	**8,88±0,12*****	**+40,50**	**+22,82**

Notă: *– p≤0,05(statistic semnificativ); **– p≤0,01(statistic distinct semnificativ); ***– p≤0,001 (statistic foarte semnificativ).

În lotul II, după administrarea preparatului Bifidobacterin, în conținutul intestinal al animalelor experimentale s-a constatat sporirea cantității de bifidobacterii cu circa 31% față de datele inițiale și cu aproape 21% față de valorile martorului, iar de lactobacili respectiv cu peste 12% și 14%. Nivelul cantitativ al escherichiilor și proteiilor a scăzut cu circa 16% și 21% și respectiv cu 33% și 50%. De menționat, că preparatul Bifidobacterin este elaborat pe baza tulpinilor de bifidobacterii, ceea ce explică majorarea semnificativă a bifidobacteriilor. Indicii numerici ai enterococilor s-au majorat cu circa 20 % față de datele inițiale și 9 % față de martor,

ceea ce permite de a presupune că preparatele pe bază de bifidobacterii au acțiune benefică asupra menținerii nivelului sanogen al enterococilor.

În lotul III, la evaluarea acțiunii preparatului Lacidofil WM (pe bază de lactobacterii), s-a stabilit sporirea nesemnificativă a nivelului bifidobacteriilor (cu circa 8% față de datele inițiale și cu 2% față de martor) și sporirea esențială a numărului de lactobacili (respectiv cu circa 32% și 23%). La fel, a scăzut și nivelul cantitativ al bacteriilor patogene: a escherichiilor respectiv cu aproximativ 16% și 21%, iar a proteiilor cu 59% și 70%. În acest caz, se menționează că lactobacilii spre deosebire de bifidobacterii au o acțiune de inhibare mai mare a patogenilor. De asemenea, lactobacteriile practic nu influențează asupra enterococilor, efectivul acestora s-a modificat neesențial, fiind documentată majorarea cu circa 3% a cantității lor.

În lotul IV, în care a fost testat preparatul microbian Bifiform (pe baza bifidobactriilor și enterococilor) a fost stabilită majorarea bifidobacteriilor cu circa 18% și a lactobacteriilor de până la 16% și reducerea nivelului bacteriilor *Escherichia*, față de datele inițiale și martor, respectiv cu circa 21% și 28%, iar a bacteriilor Proteus cu circa 62% și 72%. La acest grup experimental a fost înregistrată sporirea cu circa 32%, față de datele inițiale și 19%, față de martor, a cantității enterococilor, care este mai mare comparativ cu aceleași valori înregistrare în lotul II și III.

Testarea compoziției microbiene în lotul V, elaborate în premieră pe baza tulpinilor noi identificate de enterococi, a înregistrat cel mai benefic efect, stabilit în baza valorilor bacteriilor obligative și facultative. Astfel, numărul celulelor de bifidobacterii, comparativ cu datele inițiale și cu grupa de control s-a majorat cu circa 25% și 21%; a lactobacililor cu 33% și 28%. Nivelul bacteriilor patogene la acest lot experimental a scăzut cel mai mult, fiind înregistrată diminuarea cu circa 28-38% a cantității escherichiilor și cu 100% a cantității proteilor. De asemenea, la administrarea compoziției microbiene elaborate a fost atestată majorarea cea mai mare a efectivului enterococilor: cu circa 40% față de datele inițiale și cu 23% față de martor.

Așadar, asociația elaborată pentru prima dată pe baza tulpinilor de microorganisme din genul *Enterococcus* (ce au manifestat cele mai bune rezultate prividn capacitatea adezivă și activitatea antagonistă) și cele din genurile *Bifidobacterium* și *Lactobacillus*, a avut cel mai benefic efect asupra microbiocenozei intestinale, dovedit prin majorarea indicilor numerici ai bacteriilor obligative ce aparțin genului *Bifidobacterium* și *Lactobacillus*. Compoziția microbiană nouă are o acțiune mai mare de inhibare a bacteriilor patogene (*Escherichia* și *Proteus*). Sporirea efectivului de enterococi, în acest caz, nu poate fi asociat cu anumite disfuncții intestinale, deoarece corelează cu valorile ridicate ale bifidobacteriilor și lactobacililor și cele diminuate ale escherichiilor și proteilor.

Pe baza datelor obținute, se poate susține că tulpinile de enterococi selectate pot fi recomandate în compoziții microbiene cu acțiune probiotică.

În același timp, toate preparatele testate au avut un efect benefic asupra organismului animal, prevenind apariția și dezvoltarea disfuncției diareice (la 100% dintre animalele testate), în timp ce în lotul martor astfel de tulburări au fost înregistrate la 80% dintre animale și restul 20% – dismicrobism intestinal (datele nu sunt prezentate).

4.2. Compatibilitatea enterococilor cu alte bacterii specifice microbiocenozei tubului digestiv

Un alt obiectiv al cercetărilor ce vizează determinarea și identificarea tulpinilor de enterococi cu proprietăți utile în calitate de probiotice a fost focusat pe studierea compatibilității enterococilor intestinali cu alți reprezentanți ai microbiocenozei tubului digestiv, în special, cu cele din genurile considerate ca principale și obligative pentru această cavitate a macroorganismului (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*), în comparație cu bacteriile coliforme ce aparțin genului *Lactococcus* și *Streptococcus* din considerentele expuse anterior.

Se cunoaște, că sănătatea tubului digestiv în mare parte este determinată de echilibrul „sănătos” dintre membrii microbiotei intestinale, de diversitatea sa microbiană și metaboliții acestora, care la rândul său determină răspunsurile imune (reglatoare sau antiinflamatorii). Orice perturbare a acestui echilibru, fie în rezultatul administrării medicamentelor, în special a antibioticelor, fie ca urmare a aportului scăzut de fibre sau a altor afecțiuni, induce modificări ale compoziției microbiotei intestinale, cunoscute sub termenul de disbioză intestinală (Martin A. et al., 2023).

Astfel, în rezultatul interacțiunii dintre bacterii, în mare parte a compatibilității lor, se stabilește un ecosistem complex, ce determină sănătatea tubului digestiv. Microbii intestinali se angajează în multiple interacțiuni, dintre care unele pot fi pozitive, cum ar fi schimbul de metaboliți utili sau negative, cum ar fi competiția pentru nutrienți sau eliberarea de substanțe antimicrobiene.

Compatibilitatea sau interacțiunea enterococilor cu alți reprezentanți ai microflorei intestinale prezintă interes și din aspectul semnificației duale ale acestor bacterii – ca comensali și agenți patogeni nosocomiali.

Manipularea microbiomului intestinal pentru a preveni răspândirea tulpinilor bacteriene rezistente la antibiotice, susținând în același timp ecosistemul sensibil intestinal, este o sarcină destul de dificilă ce stă în fața terapiilor inovative. Elucidarea mecanismelor care stau la baza intercomunicării dintre bacteriile intestinale va permite de a dezvolta tehnici/strategii de

restabilire a microbiotei intestinale la o stare sănătoasă pentru a contracara, în acest mod, apariția continuă a microorganismelor rezistente la antibiotice.

Compatibilitatea enterococilor a fost testată experimental în condiții *in vitro.* În scopul studierii compatibilității enterococilor cu alte bacterii specifice tubului digestiv, drept material de studiu a servit suspensia microbiană de enterococi, streptococi și lactococi intestinali, care a fost inoculată separat și în comun cu reprezentanții genului *Bifidobacterium* și *Lactobacillus*. Au fost realizate două serii de experimente. În prima serie a fost determinată compatibilitatea enterococilor cu 5 specii de bifidobacterii, în baza indicilor cantitativi ai acestora (Tabelul 4.8.). De asemenea, compatibilitatea enterococilor a fost elucidată în comparație cu cea a streptococilor și lactococilor. În a doua serie au fost studiați aceiași indici ai bacteriilor coliforme (enterococi, streptococi și lactococi) inoculați separat și în comun cu cinci specii de lactobacili (Tabelul 4.9.).

În ambele serii de experimente, mostrele au fost divizate în 4 loturi. Lotul I a servit drept martor, în care speciile de bacterii au fost inoculate separat. În lotul II, specia *E. faecium*, a fost inoculată cu 5 specii de bifidobacterii și respectiv cu 5 specii de lactobacili, fiind determinată compatibilitatea enterococilor cu bifidobacteriile și lactobacilii. În Lotul III, specia *S. thermophilus* a fost inoculată cu 5 specii de bifidobacterii și 5 specii de lactobacili, fiind determinată compatibilitatea streptococilor cu bifidobacteriile și respectiv cu lactobacilii în comparație cu cea a enterococilor. În lotul IV, specia de *L. lactis* a fost inoculată cu 5 specii de bifidobacterii și 5 specii de lactobacili, fiind determinată compatibilitatea lactococilor cu bifidobacteriile și respectiv cu lactobacilii în comparație cu cea a enterococilor (Tabelele 4.8. și 4.9.).

Toate mostrele de suspensie microbiană ale bacteriilor inoculate au fost supuse incubării la temperatura de (37)±1 ºC timp de 72 de ore, apoi numărării cantității de colonii crescute pe medii nutritive selective. La finele experimentelor s-a calculat cantitatea de celule microbiene la 1 ml de suspensie microbiană inoculată, iar rezultatele obținute sunt exprimate în logaritmi zecimali (lg/1 ml).

Datele tabelului 4.8. au permis să afirmăm că toate speciile de bacterii coliforme (*E. faecium, S. thermophilus* și *L. lactis*), izolate din tubul digestiv uman, sunt compatibile cu bifidobacteriile utilizate în calitate de test-microbi, iar în unele cazuri se observă chiar și o acțiune stimulatorie asupra acestui tip de bacterii.

Analiza compatibilității *E. faecium* cu cele 5 specii de bifidobacterii a relevat o corelație înaltă cu *B. bifidum* și *B. breve*, marcată prin creșterea indicelui numeric al acestora respectiv cu 7,2% și 4,8%. Cu celelalte specii de bifidobacterii din nou se atestă o compatibilitate bună,

determinată prin menținerea la un nivel identic cu martorul a numărului de *B. adolescentis* și o majorare nesemnificativă a cantității de *B. infantis* (cu 1,6%) și *B. longum* (cu 1,2%). De asemenea, nivelul numeric al enterococilor (*E. faecium*) la înocularea în comun cu bifidobacteriile s-a majorat cu 1,7%, ceea ce iarăși denotă despre gradul de conexiune dintre aceste bacterii.

Tabelul 4.8. Nivelul de compatibilitate a *E. faecium, S. thermophilus* și *L. lactis* cu bifidobacteriile obligative tubului digestiv uman

Lot	Nr. mostrei	Speciile de bacterii determinate	Cantitatea de celule microbiene la 1 ml de suspensie microbiana, logaritmi zecimali (lg/ml)	Deosebirea, comparativ cu martorul, %
I	1	*Bifidobacterium infantis*	10,30±0,33	
	2	*Bifidobacterium bifidum*	9,88±0,22	
	3	*Bifidobacterium adolescentis*	9,63±0,25	
	4	*Bifidobacterium breve*	9,43±0,26	
	5	*Bifidobacterium longum*	10,20±0,22	
	6	*Streptococcus thermophilus*	9,88±0,24	
	7	*Enterococcus faecium*	8,63±0,20	
	8	*Lactococcus lactis*	8,92±0,22	
II	1	*Bifidobacterium infantis*	10,46±0,14	+1,55
	2	*Bifidobacterium bifidum*	10,59±0,15	+7,18
	3	*Bifidobacterium adolescentis*	9,67±0,11	+0,10
	4	*Bifidobacterium breve*	9,88±0,10	+4,77
	5	*Bifidobacterium longum*	10,32±0,13	+1,17
	6	*Enterococcus faecium*	8,78±0,25	+1,73
III	1	*Bifidobacterium infantis*	9,97±0,12	-3,20
	2	*Bifidobacterium bfidum*	9,82±0,12	-0,60
	3	*Bifidobacterium adolescentis*	9,88±0,13	+2,59
	4	*Bifidobacterium breve*	9,90±0,15	+4,98
	5	*Bifidobacterium longum*	9,92±0,11	-2,74
	6	*Streptococcus thermophilus*	8,46±0,22	-14,37
IV	1	*Bifidobacterium infantis*	10,65±0,09	+3,39
	2	*Bifidobacterium bifidum*	10,20±0,14	+3,23
	3	*Bifidobacterium adolescentis*	9,76±0,12	+1,34
	4	*Bifidobacterium breve*	9,77±0,14	+3,60
	5	*Bifidobacterium longum*	10,41±0,12	+2,05
	6	*Lactococcus lactis*	9,17±0,24	+2,80

Specia de streptococi *S. thermophilus*, la general, a manifestat o compatibilitate mai joasă comparativ cu cea a enterococilor. Cea mai negativă corelație s-a constatat între *S. thermophilus* cu *B. infantis* (micșorare cu 3,2% a indicelui numeric) și cu *B. longum* (micșorare cu 2,7% a indicelui numeric). Nivelul cantitativ al *B. bifidum*, este influențat nesemnificativ de streptococi.

Totuși, la inocularea *S. thermophilus* cu bifidobacteriile a fost observată o majorare cu 2,59% a numărului de bacterii *B. adolescentis* și cu 4,98% a bacteriilor speciei *B. breve,* care este mai mare în comparație cu lotul II, în care s-a efectuat inocularea cu enterococi. Însă, faptul că nivelul cantitativ al *S. thermophilus* scade aproximativ cu 14,4% comparativ cu martorul, denotă despre incompatibilitatea streptococilor cu bifidobacteriile. Mai mult, putem presupune că anume bifidobacteriile inhibă dezvoltarea streptococilor.

În lotul III, la inocularea bifidobacteriilor cu reprezentatntul lactococilor – *L. lactis,* se atestă cea mai bună compatibilitate (cu toate speciile de bifidobacterii), comparativ cu enterococii și streptococii. Astfel, la cultivarea speciei *L. lactis* cu bifidobacteriile s-a remarcat majorarea nivelului cantitativ al *B. infantis* cu 3,4%, a *B. bifidum* cu 3,2%, a *B. adolescentis* cu 1,3%, a *B. breve* cu 3,6% și a *B. longum* cu 2,1%. De asemenea, și cantitatea bacteriilor de *L. lactis* a crescut cu aproximativ 3%, fiind dovedită acțiunea reciprocă pozitivă dintre aceste bacterii.

În baza datelor obținute putem afirma că dintre bacteriile coliforme, enterococii (*E. faecium*) au un nivel bun de compatibilitate cu bifidobacteriile, identic cu cel al lactococilor (*L. lactis*) și mai mare comparativ cu cel al streptococilor (*S. thermophilus*).

La analiza datelor privind compatibilitatea cu cele 5 specii de lactobacterii s-a constat din nou corelația pozitivă a lor cu reprezentantul enterococilor și lactococilor (Tabelul 4.9.).

În lotul II, inocularea *E. faecium* cu lactobacteriile a determinat majorarea nivelului cantitativ al acestora comparativ cu lotul martor, după cum urmează: a *L. acidophilus* cu 4,4%; a *L. helveticus* cu 1,3%; a *L. coryniformis* cu 1,2%; a *L. fermentum* cu 4,5% și a *L. plantarum* cu 3,65%. Totodată, cantitatea de celule de *E. faecium* a crescut, față de valorile lotului martor, cu 2,4%, ceea ce indică la compatibilitatea acestor două grupe de bacterii.

Inocularea *S. thermophilus* în comun cu 5 specii de lactobacili (lotul III), a indus o majorare mai mare a *L. helveticus* (cu 4,2%) și a *L. fermentum* (cu 4,0%), precum și una nesemnificativă a *L. plantarum* (cu 1,6%) și *L. acidophilus* (cu 0,6%). În cazul *L. coryniformis* a fost stabilită o diminuare a cantității cu aproximativ 2%. Nivelul *S. thermophilus* nu s-a modificat esențial, fiind constatată o majorare de 0,5% față de martor. Aceste date denotă că asupra unor specii de lactobacili reprezentantul streptococilor are acțiune de stimulare a efectivului (*L. helveticus* și *L. fermentum*), asupra altora – de menținere la un nivel stabil (*L.* plantarum și *L. acidophilus*) și de inhibare a *L. coryniformis*. La rândul său lactobacilii față de *S. thermophilus* manifestă o acțiune neutră (de stabilizare).

Comportamentul bacteriilor în lotul IV, la inocularea *L. lactis* cu lactobacteriile a relevat compatibilitatea cea mai bună, comparativ cu cea a enterococilor și streptococilor, fiind

documentată o majorare a nivelului de celule bacteriene pentru toate speciile. Astfel, cantitatea celulelor de *L. acidophilus* s-a majorat cu 2,4%; de *L. helveticus* cu 7,0%; de *L. coryniformis* cu 6%; de *L. fermentum* cu 8,2% și de *L. plantarum* cu 8,0%. La rândul său lactobacilii au influențat pozitiv și efectivul *L. lactis,* contribuind la o sporire cu aproximativ 5% față de martor, ceea ce denotă despre compatibilitatea înaltă a lor.

Tabelul 4.9. Nivelul de compatibilitate a *E. faecium, S. thermophilus* și *L. lactis* cu lactobacili obligativi tubului digestiv uman

Sub seria	Lotul	Speciile de bacterii determinate	Cantitatea de celule microbiene la 1 ml de suspensie microbiana, logaritmi zecimali (lg/ml)	Deosebirea, comparativ cu martorul, %
	1	*Lactobacillus acidophilus*	8,58±0,28	
	2	*Lactobacillus helveticus*	8,38±0,25	
	3	*Lactobacillus coryniformis*	7,73±0,26	
	4	*Lactobacillus fermentum*	7,46±0,21	
	5	*Lactobacillus plantarum*	7,38±0,25	
	6	*Streptococcus thermophilus*	8,78±0,24	
	7	*Enterococcus faecium*	8,65±0,20	
	8	*Lactococcus lactis*	8,92±0,22	
I	1	*Lactobacillus acidophilus*	8,96±0,25	+4,42
	2	*Lactobacillus helveticus*	8,49±0,21	+1,31
	3	*Lactobacillus coryniformis*	7,82±0,23	+1,16
	4	*Lactobacillus fermentum*	7,80±0,21	+4,55
	5	*Lactobacillus plantarum*	7,65±0,20	+3,65
	6	*Enterococcus faecium*	8,86±0,25	+2,42
II	1	*Lactobacillus acidophilus*	8,63±0,25	+0,58
	2	*Lactobacillus. helveticus*	8,73±0,24	+4,17
	3	*Lactobacillus coryniformis*	7,59±0,28	1,81
	4	*Lactobacillus fermentum*	7,76±0,25	+4,02
	5	*Lactobacillus plantarum*	7,50±0,19	+1,62
	6	*Streptococcus thermophilus*	8,82±0,22	+0,45
V	1	*Lactobacillus acidophilus*	8,79±0,21	+2,44
	2	*Lactobacillus helveticus*	8,96±0,24	+6,92
	3	*Lactobacillus coryniformis*	8,17±0,30	+5,69
	4	*Lactobacillus fermentum*	8,07±0,28	+8,17
	5	*Lactobacillus plantarum*	7,96±0,31	+7,85
	6	*Lactococcus lactis*	8,30±0,22	+4,79

Așadar, în baza rezultatelor obținute, s-a stabilit că enterococii (*E. faecium*) au un nivel înalt de compatibilitate cu reprezentanții microbieni din genurile obligative (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*) comparabil cu cel al lactococilor (*L. lactis*).

Aceasta a determinat elaborarea unor noi asociații microbiene cu acțiune probiotică, în componența cărora au fost incluse tulpini de enterococi și lactococi, întrucât aceste grupe de bacterii au demonstrat compatibilitate sporită cu bifidobacteriile și lactobacilii.

Compoziții microbiene elaborate au fost testate în experimente pe cobai în calitate de animale model, care au fost divizați în 3 loturi: în lotul I (martor) animalele nu au primit niciun remediu de origine bacteriană; în lotul II animalele au primit o compoziție microbiană alcătuită din o tulpină de lactococi, una de lactobacili (lactobacterii) și două de bifidobacterii, iar cele din lotul III – o compoziție microbiană alcătuită dintr-o tulpină de enterococi, una de lactobacili și una de bifidobacterii. Detaliat schema experimentului este descrisă în capitolul 2.

Prin această serie de experimente s-a propus de a elucida efectul compozițiilor noi de bacterii ce conțineau enterococi și lactococi asupra bacteriilor obligative (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*) și bacteriilor patogene (*Escherichia* și *Proteus*), precum și asupra enterococilor. De menționat, că toate compozițiile au fost administrate oral, pe fondul dismicrobiosmului intestinal (caracterizat prin nivelul mai mic de bifidobacterii și lactobacili și nivel ridicat de *Escherichia* și *Proteus*). De la toate animalele au fost colectate mostre de conținut intestinal (rectal), care au fost inoculate pe medii selective pentru bifidobacterii, lactobacterii, lactococi și enterococi.

La animalele din lotul martor se observă o majorare a numărului de celule microbiene față de datele inițiale, menținându-se același raport cantitativ dintre bacteriile benefice și cele patogene, adică starea de dismicrobism (Tabelul 4.10.).

În lotul II, în conținutul intestinal al animalelor experimentale, care au primit asociația microbiană, ce conținea lactococi, lactobacili și bifidobacterii, s-a constatat o majorare a valorii numerice a bifidobacteriilor și lactobacililor cu 87% și respectiv 100% față de datele inițiale (până la administrarea preparatului) și cu 86% și respectiv 88% față de aceleași valori la animalele din lotul martor. Față de patogeni, remediul testat în lotul II a avut o acțiune de inhibare cu circa 35% a escherichiilor și cu circa 77% a proteilor, în comparație cu datele inițiale și cu martorul. De asemenea, s-a constatat o diminuare a efectivului de enterococi, cu circa 26-27%, care este mai mică față de cea a eschericiilor și proteilor (Tabelul 4.10.).

Administrarea asociației (compoziției) microbiene ce conținea enterococi, lactobacili și bifidobacterii (lotul III) a determinat o sporire a nivelului cantitativ al bifidobacteriilor și lactobacililor cu aproximativ 100%, atât față de valorile inițiale (la începutul experimentului), cât și comparativ cu valorile înregistrate la animalele din lotul martor. Asociația microbiană testată în lotul III a avut cea mai mare acțiune de inhibare a *Escherichia* (cu circa 40%) și Proteus (cu circa 79% față de datele inițiale și 98% față de martor). Nivelul enterococilor, de asemenea, a

diminuat, fiind atestat aproximativ același grad de inhibare ca și în lotul II, de aproximativ 26-28% (Tabelul 4.10.).

Tabelul 4.10. Indicii cantitativi ai microorganismelor intestinale la cobai la administrarea asociațiilor microbiene nou elaborate

Lotul animalelor	Genurile de bacterii	Numărul de celule microbiene (lg) la 1g de conținut intestinal		Deosebirea, %	
		Inițial	Final	Comparativ cu datele inițiale	Comparativ cu martor
I	*Bifidobacterium*	4,34±0,14	4,50±0,13	+3,68	
	Lactobacillus	4,17±0,15	4,59±0,14	+10,07	
	Escherichia	8,83±0,16	8,88±0,15	+0,56	
	Proteus	5,11±0,15	5,23±0,14	+2,34	
	Enterococcus	8,74±0,14	8,92±0,13	+2,05	
II	*Bifidobacterium*	4,47±0,12	8,36±0,11***	+87,02	+85,77
	Lactobacillus	4,32±0,15	8,64±0,08***	+100,00	+88,23
	Escherichia	8,81±0,13	5,73±0,15***	34,96	35,47
	Proteus	5,04±0,11	1,17±0,07***	76,78	77,62
	Enterococcus	8,80±0,16	6,49±0,13***	26,25	27,24
III	*Bifidobacterium*	4,53±0,15	9,04±0,09***	+99,55	+100,88
	Lactobacillus	4,43±0,13	9,17±0,07***	+100,00	+99,78
	Escherichia	8,90±0,16	5,32±0,14***	40,22	40,09
	Proteus	5,20±0,12	1,07±0,08***	79,42	98,08
	Enterococcus	8,77±0,14	6,41±0,11***	26,90	28,13

Notă: *– p≤0,05(statistic semnificativ); **– p≤0,01(statistic distinct semnificativ); ***– p≤0,001 (statistic foarte semnificativ).

Aceste modificări ale efectivului de bacterii obligative și facultative denotă despre acțiunea benefică a compozițiilor microbiene experimentate. De remarcat, că preparatul ce conținea enterococi a avut cea mai mare acțiune de inhibare a bacteriilor patogene.

Totodată, micșorarea conținutului enterococilor cu 26%-28% (care este mai mică comparativ cu cea a escherichiilor și proteilor), indică faptul că aceste bacterii, la acțiunea compozițiilor microbiene noi, ating un nivelul sanogen, determinat de un anumit coraport atât cu reprezentanții bacteriilor benefice, obligative tubului digestiv, cât și cu bacteriile patogene.

În baza datelor obținute, considerăm, că pe lângă bacteriile obligative (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*) este oportun de a include în componența remediilor cu acțiune probiotică (sanogenă) și unii comensali, cum ar fi enterococii și lactococii, care fiind parte a compozițiilor (asociațiilor) microbiene testate au contribuit la eliminarea dismicrobismului și stabilirea eubiozei intestinale.

4.3. Influența unor noi compoziții microbiene pe bază de enterococi asupra anumitor parametri funcționali la animalele de interes economic (animale agricole)

Securitatea alimentară se referă nu numai la furnizarea de alimente suficiente populației, ci și la asigurarea cu alimente de înaltă calitate. Laptele, carnea și ouăle (alimentele de origine animală) sunt una dintre cele mai bune surse de proteine și micronutrienți de înaltă calitate care sunt esențiali pentru dezvoltarea normală și sănătate (Smith J. et al., 2013). Astfel, îmbunătățirea calității produselor de origine animală reprezintă un aspect important al creșterii animalelor având ca obiective sporirea valorii nutritive, asigurarea sănătății consumatorilor și optimizarea caracteristicilor de procesare.

Sănătatea animalelor de interes economic (animale și păsări de fermă) reprezintă o cerință esențială pentru a obține alimente sigure și de bună calitate. Astfel, un obiectiv major în asigurarea unei producții animaliere calitative reprezintă cel ce vizează eliminarea bolilor (Collins J.D., Wall P.G., 2004).

Funcționalitatea eficientă a tractului gastrointestinal și sănătatea acestuia sunt factori importanți în determinarea performanței animalelor (Kogut M.H., Arsenault R.J., 2016). Prin susținerea funcționalității tractului gastrointestinal al animalelor de fermă, pot fi îmbunătăți astfel de parametri precum creșterea în greutate a animalelor, ceea ce duce la majorarea randamentelor de procesare.

Conceptul de „sănătate intestinală” sau „sănătatea tubului digestiv” devine unul de interes major în domeniul științelor zootehnice și a zootehniei, și se referă, în mare parte, la astfel de aspecte ce promovează performanța și bunăstarea animalelor, cum ar fi: dieta, structura și funcția eficientă a barierei gastrointestinale, interacțiunea gazdei cu microbiota gastrointestinală, digestia și absorbția eficientă a furajului și statutul imunitar înalt (Celi P. et al., 2017). Se crede că apariția multor boli la animalele de fermă se datorează dereglărilor ce intervin la nivelul microbiotei intestinale (Lee I.K. et al., 2016).

Este cunoscut faptul că în toate cavitățile organismului animal la diferite grupe de vârstă este caracteristic o anumită microfloră rezidentă (obligativă), care îndeplinește o funcție de protecție, enzimatică și sintetică în viața organismului. Cu toate acestea, imediat după naștere, microflora specifică unui animal adult pătrunde în tractul digestiv steril al animalelor nou-născute, care în majoritatea cazurilor sunt microorganisme de putrefacție, condiționat-patogene și patogene, ducând deseori la moartea animalelor de fermă tinere (Исаев В.В. и др., 2010).

Conform datelor statistice, bolile gastrointestinale majore provocate de microorganismele patogene, care sunt răspândite în rândul purceilor cu vârsta cuprinsă între 5-15 și 26-40 de zile, provoacă mari daune economice fermelor de porci inclusiv și celor din Republica Moldova

(Timoșco M., 1990). La purceii sugari, aceste boli se manifestă printr-un șoc microbian, iar la cei înțărcați – ca disbioza (Carol-Dumitriu E. și al., 1981).

În acest sens, cercetările ulterioare vizează identificarea metodelor de majorare a rezistenței naturale și a productivității animalelor tinere de fermă.

De asemenea, a fost stabilit rolul pozitiv al microflorei intestinale rezidente în creșterea forței bactericide a serului sanguin, creșterea funcției macrofagelor și a reactivității imunologice generale a organismului animal (Park H. et al., 2018; Rovira J., Melero B., 2018).

Astfel, un obiectiv al cercetărilor efectuate a fost de a studia acțiunea monoculturilor și asociațiilor de microorganisme nepatogene din genurile *Bifidobacterium, Enterococcus* și *Lacobacillus* asupra unor parametri ai funcționalității organismului animalelor, precum și efectul acestora asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali la viței și purcei. Enterococii intestinali fac parte din speciile de microorganisme obligative ale florei intestinale, care pot influența sănătatea animalelor de fermă, și respectiv, pot contribui la majorarea productivității în condiții industriale.

Datele descrise în acest subcapitol reprezintă rezultatul cercetărilor de mai mulți ani, efectuate în cadrul Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie de către grupul de cercetare condus de dr.hab., prof.cerc. Maria Timoșco, și au fost preconizate inițial să fie incluse în lucrare, în rezultatul promovării proiectului de doctorat, întrucât conțin rezultate ce vizează enterococii, fiind astfel respectate normele legate de etica și deontologia cercetării.

După cum a fost menționat anterior, microbiota tractului digestiv influențează semnificativ creșterea și dezvoltarea animalelor, în special la etapele inițiale (animalele tinere) și joacă un rol important în rezistența animalelor la bolile infecțioase. Formarea cât mai rapidă a unei microbiote obligative, benefice organismului constă în funcția de barieră a acesteia, ce constă în capacitatea de a preveni implantarea microbilor alohtoni în tractul gastrointestinal.

În acest aspect, în experimente pe viței a fost investigată acțiunea asociației de microorganisme a cinci specii obligative caracteristice acestor animale, cu o capacitate antagonistă sporită: *Bifidobacterium longum* var. longum, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus bovis* și *Enterococcus lactis*. Pentru aceasta, 30 de viței au fost împărțiți în trei loturi a câte 10 în fiecare. Primul lot a inclus animale clinic sănătoase; lotul II – viței cu disfuncții intestinale (contaminarea cu asociații de bacterii din genurile condiționat-patogene*: Clostridium, Proteus, Staphylococcus* și *Escherichia*); lotul III – viței identici lotului II (conform statutului clinic), dar care au primit peroral compoziții microbiene în baza asociației de microorganisme a cinci specii obligative vițeilor cu o capacitate antagonistă sporită (selecționate în experimentele gnotobiologice: *Bifidobacterium longum* var. longum,

Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus fermentum, Enterococcus bovis și *Enterococcus lactis*). Asociația microbiană supusă testării a fost administrată peroral, imediat după nașterea vițeilor, cu 30 min înaintea primirii colostrului și apoi odată în zi, peste o zi, până la vârsta de 9 zile, adică de 5 ori. Animalele au fost supravegheate timp de 30 de zile.

În primul rând, a fost determinată masa corporală a vițeilor la naștere și după 30 de zile de administrare a asociațiilor de microorganisme testate (Tabelul 4.11.).

S-a observat că energia de creștere a vițeilor din lotul III este mai mare comparativ cu viței din lotul martor. Creșterea în greutate la lotul III de animale a fost de 15,03 kg, la lotul martor – 13,63 kg și la lotul II – 12,22 kg.

Tabel 4.11. Masa corporală a vițeilor la naștere și după 30 de zile de administrare a asociațiilor de microorganisme testate

Loturile experimentale	***Masa corporală, kg***	
	Viței nou-născuți	**Viței de 30 de zile**
I	28,5±0,02	42,12±0,2*
II	29,9±0,01	42,1±0,12
III	31,3±0,04	46,33±0,02*

Notă: autenticitatea dintre viței nou-născuți și viței de 30 de zile – * p≥0,05; ** p≥0,01

Astfel, creșterea zilnică în greutate este de 454,33 g (0,454 kg) la lotul martor, la lotul II (animalele cu disfuncție intestinală) – 407,33 g (0,407 kg) și la lotul III – 501 g (0,501 kg).

Un alt parametru investigat a fost valoarea numerică a enterococilor intestinali (tabelul 4.12.).

Tabelul 4.12. Nivelul cantitativ al enterococilor intestinali la viței cu și fără disfuncții intestinale (lg la 1g de conținut intestinal)

Lotul	**Vârsta (zile)**				
	1	**4**	**7**	**15**	**30**
I	1,25±0,09	3,34±0,12	5,78±0,1	6,19±0,11	5,47±0,12
II	4,12±0,09	9,76±0,12	9,9±0,11	9,49±0,14	9,21±0,11
III	6,5±0,1**	8,4±0,07*	8,7±0,09	6,9±0,13*	6,4±0,09*

Notă: Rezultatele sunt autentice: *) p<0,02; **) p<0,05.

În conformitate cu datele prezentate în tabelul 4.12, este evidentă diferența între indicii cantitativi ai enterococilor în conținutul intestinal al animalelor din loturile experimentale. În lotul I, care include animale sănătoase, nivelul enterococilor în primele zile de viață este mic, însă, atinge valori mai înalte la vârsta de 15 zile, după care, la vârsta de 30 de zile indicii cantitativi ai enterococilor marchează valori, ce au fost notate pentru vârsta de 7 zile.

La animalele din lotul II, animale cu disfuncții intestinale, pe parcursul perioadei de investigare (30 de zile) s-a observat majorarea valorii numerice a enterococilor, maximum fiind înregistrat la viței cu vârsta de 7 zile.

La viței din lotul III, cărora le-a fost administrată compoziția în baza asociației de microorganisme obligative, conținutul maxim al enterococilor se atestă în primele 7 zile de viață, după care, nivelul cantitativ al lor atinge valori caracteristice animalelor sănătoase din lotul I (Tabelul 4.12.).

Totodată s-a stabilit, că în primele 7 zile de viață, la viței din lotul III, care au primit asociația de microorganisme obligative, au dispărut simptomele diareice. La animalele din lotul II, simptomele diareice, ce se caracterizau prin 100% de dismicrobism, s-au manifestat până la vârsta de 20 de zile, cauzând slăbirea rezistenței generale, deshidratarea macroorganismului, ca urmare determinând mortalitatea la 30% de viței. Aceasta denotă despre posibilitatea dezvoltării disfuncțiilor intestinale, în cazul când la animalele tinere nu se formează la timp microbiota benefică.

Determinarea indicilor rezistenței generale ai vițeilor din loturile experimentale (Tabelul 4.13.) relevă prevalarea activității bactericide a serului sanguin la viței lotului III comparativ cu cei din lotul I și II la vârsta de 15 zile (respectiv cu 18,4% și 15,84%) și 30 zile (respectiv cu 5,84% și 11,36%).

Tabelul 4.13. Indicii rezistenței generale la viței fără și cu disfuncții intestinale și la acțiunea asociației policomponente de microorganisme din genurile obligative tractului gastrointestinal

Indicii cercetați	***Lotul experimental***	***Vârsta animalelor, zile***	
		15	***30***
Activitatea bactericidă a serului sanguin, %	I	83,3±1,28	94,2±0,82
	II	81,5±0,9	89,0±0,87
	III	96,5±0,93*	96,0±1,37
Rezerva alcalină a sângelui (Bicarbonat, sânge), mg/%	I	370,0±7,06	376,7±12,44
	II	320,0±9,98	360,0±11,16
	III	355,0±12,33*	388,0±7,2*
Nivelul de glucoză în sânge, mg/%	I	96,7±0,95	103,8±1,4
	II	79,2±0,89	98,4±1,47
	III	104,9±1,06*	109,3±1,3*

Notă: *)P<0,05.

Conform datelor privind indicii rezervei alcaline a sângelui diferențele dintre loturile experimentale și în funcție de vârsta animalelor nu au fost neesențiale. La vârsta de 30 de zile acest indice era mai mare la viței din lotul III respectiv cu 3,03% și 7,78%, comparativ cu cei din loturile I și II.

Nivelul glucozei la animalele care au primit asociații policomponente de microorganisme în baza speciilor obligative tractului gastrointestinal (lotul III) la vârsta de 15 zile a fost cu 8,48% și 32,45% mai mare față de nivelul respectiv din loturile I și II. La vârsta de 30 de zile, această diferență a constituit 5,3% și 11,08% respectiv.

Deci, influința compoziției în baza asociației de mircroorganisme (ce conține și specii de enterococi) asupra organismului vițeilor tineri (în primele 30 de zile de viață) și asupra florei microbiene intestinale este benefică.

Modificări ale unor reprezentanți obligativi și facultativi ai microbiotei intestinale la acțiunea compozițiilor microbiene cu acțiune probiotică, ce conțin tulpini de enterococi, au fost semnalate și la animalele monogastrice precum purceii.

S-a stabilit, că modificările treptate ale compoziției microbiotei gastrointestinale care au loc la o anumită specie de animale sunt legate de vârstă (Smith H.W., 1965). La o vârstă fragedă microbiota tractului digestiv al animalelor tinere este foarte asemănătoare. Aceasta în mare parte depinde de faptul că după naștere microbiota intestinală este determinată de alimentația cu laptele matern. Mai mult, constituenții laptelui determină în mare parte ce bacterii au preferință în procesul de colonizare a intestinului (Bomba A. et al., 2006). Odată cu maturizarea organismului diferențele în ceea ce privește microflora intestinală sunt determinate de particularitățile anatomice și fiziologice ale tractului digestiv și depind, desigur, de sursa hrănii.

De menționat, că purceii nou născuți posedă sisteme de selecție foarte eficiente care le permite să favorizeze multiplicarea anumitor specii de bacterii ale microbiocenozelor intestinale. Această selecție este influențată de mulți factori: alimentația, condițiile de mediu precum starea igienică, temperatura, interacțiunile microbiene din tractul digestiv și efectul de barieră al microbiotei dominante împotriva bacteriilor din afară (Jiang L. et al., 2019).

Tulpinile de microorganisme, selectate au fost incluse în asociații microbiene experimentale, care au fost testate pe purcei, în condițiile întreprinderii tehnologice intensive. Animalele experimentale (400 de capete) au fost divizate în cinci loturi, a câte 80 de purcei fiecare. Imediat după naștere, înainte de primul aport de colostru, animalelor le-a fost injectat oral câte 10 ml de biomasă de microorganisme nepatogene (tipuri rezidente de microflora intestinală), conținând 10^9 celule microbiene în 1 ml, și apoi aceiași doză a fost administrată încă de șase ori peste o zi, adică până la vârsta de 14 zile. În același timp, lotul I nu a primit culturi de microorganisme și a servit drept lot martor. Lotul II a primit o monocultură de *Bifidobacterium thermophilum suis*; lotul III – a primit o monocultură de *Enterococcus faecium suis*; lotul IV – asociere din *Bifidobacterium thermophilum suis* + *Enterococcus faecium suis*; lotul V – asociația din *Bifidobacterium thermophilum suis* + *Enterococcus faecium suis* + *Lactobacillus acidophilus*

suis + *Lactococcus fermenti suis*. Toți purceii experimentali au fost crescuți conform tehnologiilor adoptate într-o fermă industrială de porci, cu un ciclu de reproducere închis și cu excluderea medicamentelor chimioterapice (sulfamide și antibiotice).

Monoculturile și asociațiile de microorganisme luate în studiu au fost testate pe purcei timp de 30 de zile, pe parcursul cărora animalele au fost monitorizate, înregistrându-se creșterea în greutate, indicii numerici ai enterococilor în tubul digestiv al lor, precum și starea de rezistență nespecifică (capacitatea fagocitară a leucocitelor din sângele periferic, activitatea bactericidă și lizozimă a serului sanguin, cantitatea de hemoglobină) conform metodelor clasice.

Datele privind acțiunea tulpinilor de microorganisme testate asupra masei corporale sunt prezentate în tabelul 4.14.

Tabelul 4.14. Masa corporală a purceilor din loturile experimentale

Lotul de animale	Masa purceilor, kg	
	la 3 zile	la 30 de zile
I	1,22±0,05	4,45±0,25**
II	0,89±0,06	6,25±0,31*
III	0,93±0,04	5,25±0,24
IV	1,18±0,03	6,2±0,22**
V	1,01±0,05	6,75±0,27

Notă: autenticitatea dintre masa purceilor la 3 și 30 de zile – * p≥0,95, ** p≥0,99

Tipurile de microorganisme testate au avut un efect pozitiv asupra productivității animalelor experimentale. Greutatea medie vie a unui purcel la vârsta de 30 de zile din lotul I – a constituit 4,45 kg; lotul II a fost de 6,25 kg; lotul III – 5,25 kg; lotul IV – 6,20 kg, iar în lotul V – 6,75 kg. Prin urmare, creșterea zilnică în greutatea a unui purcel a fost de 134 g în lotul I, de 210 g în lotul II; de 170 g în lotul III; de 204 g în lotul IV și de 230 g în lotul V. Rezultatele obținute au relevat că administrarea asociației de microorganisme – *Bifidobacterium thermophilum suis* + *Enterococcus faecium suis* + *Lactobacillus acidophilus suis* + *Lactococcus fermenti suis*, a avut cel mai benefic efect asupra creșterii în greutate a animalelor experimentale.

De asemenea, a fost investigat efectul monoculturilor și asociațiilor de microorganisme asupra multiplicării și dezvoltării enterococilor în tubul digestiv la purcei. Se cunoaște că conținutul optim al enterococilor în intestin asigură a bună funcționare a microbiotei intestinale. Enterococii sunt omniprezenți în tractul gastrointestinal, chiar dacă ei constituie o proporție mică din consorțiul intestinal, cuprinzând de obicei mai puțin de 1% din microflora adultă (Finegold S.M. et al., 1983; Sghir A. et al., 2000) și sunt localizați în principal în intestinul subțire și gros, unde constituie o componentă proeminentă a consorțiilor jejunale, ileale, cecale și recto-

sigmoidale (Hayashi H. et al., 2005). Din aceste considerente a fost documentată valoarea numerică a enterococilor a 6 segmente ale tubului digestiv: stomac, duoden, intestinul subțire, ileon, cec și rect. Rezultatele privind indicii numerici ai enterococilor intestinali la purcei în diferite segmente ale tubului digestiv sunt prezentate în tabelul 4.15.

Tabelul 4.15. Indicii cantitativi ai enterococilor intestinali la purceii sugari supuși administrării monotulpinilor și asociațiilor de microorganisme din genurile obligative tractului gastrointestinal

Lotul	Vârsta (zile)		
	3	7	30
Stomac			
I	4,29±0,17	3,88±0,2	3,00±0,21
II	0	0	0
III	5,98±0,13	6,77±0,15*	4,55±0,11**
IV	5,17±0,09*	0	5,17±0,05*
V	5,17±0,07*	5,75±0,09**	2,32±0,11**
Duoden			
I	6,35±0,19	4,67±0,15*	4,49±0,2*
II	0	2,26±0,07*	2,44±0,09*
III	6,71±0,12*	7,6±0,14**	2,24±0,08*
IV	5,65±0,1*	6,72±0,11*	6,69±0,09**
V	5,69±0,1*	6,26±0,08*	2,25±0,1*
Intestinul subțire			
I	7,64±0,22	5,8±0,19	5,28±0,17
II	2,48±0,07*	3,48±0,05*	3,26±0,08*
III	7,7±0,15*	7,82±0,13*	3,52±0,09*
IV	6,74±0,12*	7,57±0,1*	2,89±0,05*
V	2,88±0,13*	6,88±0,11*	3,32±0,06*
Ileon			
I	6,68±0,19	5,83±0,15	5,83±0,15
II	3,59±0,09*	4,5±0,11*	4,74±0,1*
III	7,93±0,18*	8,29±0,14*	5,46±0,1*
IV	7,69±0,13*	8,39±0,15*	4,39±0,1*
V	7,76±0,09*	7,84±0,08*	4,79±0,1*
Cec			
I	6,27±0,2	8,04±0,17	6,86±0,19
II	4,6±0,11*	5,52±0,12*	5,87±0,1*
III	8,65±0,17*	8,44±0,15*	8,44±0,15*
IV	7,69±0,13*	8,67±0,12*	6,07±0,1*
V	8,59±0,12*	8,4±0,13*	6,83±0,11*
Rect			
I	5,87±0,17	7,22±0,17	6,35±0,15
II	4,15±0,1*	5,55±0,12*	5,67±0,11*
III	8,69±0,17*	8,38±0,15*	5,91±0,12*
IV	8,62±0,12*	8,23±0,11*	5,45±0,13*
V	8,55±0,08*	7,54±0,06*	5,82±0,07*

Notă: *Rezultatele sunt autentice: *) p<0,02; **) p<0,05.*

Printre purceii din grupul martor a fost înregistrată gastroenterita bacteriană, provenită din disbacterioză, în timp ce în loturile experimentale nu au fost observate tulburări intestinale.

Analiza valorilor numerice ale enterococilor purceilor în primele 30 de zile de viață la administrarea compozițiilor în baza monoculturilor și asociațiilor de microorganisme a relevat un conținut mai mic al acestora la animalele din lotul II (administrarea monoculturii de *B. thermophilum suis*) și mai mare la animalele din lotul III, care a primit monocultura de *E. faecium suis*, în toate segmentele tubului digestiv.

De menționat, că în stomac conținutul de enterococi a fost cel mai mic comparativ cu celelalte segmente ale tubului digestiv, iar în cec și rect au fost detectate cele mai mari valori ale acestor bacterii.

La monitorizarea indicilor numerici ai enterococilor pe parcursul a 30 de zile de administrare a compozițiilor utilizate în studiu s-a stabilit că un conținut mai mare se atestă în a 7-ea zi la animalele din lotul III, IV și V în stomac, duoden, intestinul subțire, ileon și cec. În rect, nivelul cel mai mare al enterococilor se atestă în a 3-ea zi a experimentului la animalele din loturile experimentale III, IV și V.

După 30 de zile de studiu, valoarea numerică a enterococilor scade la toate animalele din loturile experimentale în toate segmentele tubului digestiv, cu excepția lotului II, la care s-a observat o creștere a cantității de enterococi după 30 de zile de administrare a monoculturii de *B. thermophilum suis*.

S-a stabilit că asociațiile de microorganisme testate în lotul IV și lotul V au contribuit la menținerea conținutului de enterococi, identic nivelului acestora la animalele din lotul martor în segmentele: stomac, duoden, intestinul subțire și ileon.

În cec și rect valori numerice înalte ale enterococilor sunt caracteristice pentru toate loturile experimentale (cu excepția lotului II), inclusiv și pentru lotul martor.

Astfel, în baza datelor obținute privind influența monoculturilor și asociațiilor de microorganisme asupra indicilor numerici ai enterococilor în segmentele tubului digestiv putem menționa că:

- administrarea monoculturii de *Bifidobacterium thermophilum* suis (lotul II) a contribuit la menținerea conținutului nivelului de enterococi la un nivel mic pe parcursul a 30 de zile de testare în toate segmentele tubului digestiv;
- administrarea monoculturii de *Enterococcus faecium* suis (lotul III) a determinat majorarea indicilor numerici ai enterococilor, atingând cel mai înalt nivel în cec și rect (comparativ cu celelalte loturi experimentale) în primele 7 zile de testare;
- administrarea asociațiilor de microorganisme *B. thermophilum suis* și *E. faecium suis* a contribuit, de asemenea, la majorarea conținutului de enterococi în segmentele tubului digestiv, în special, în cec și rect în primele 7 zile de testare;

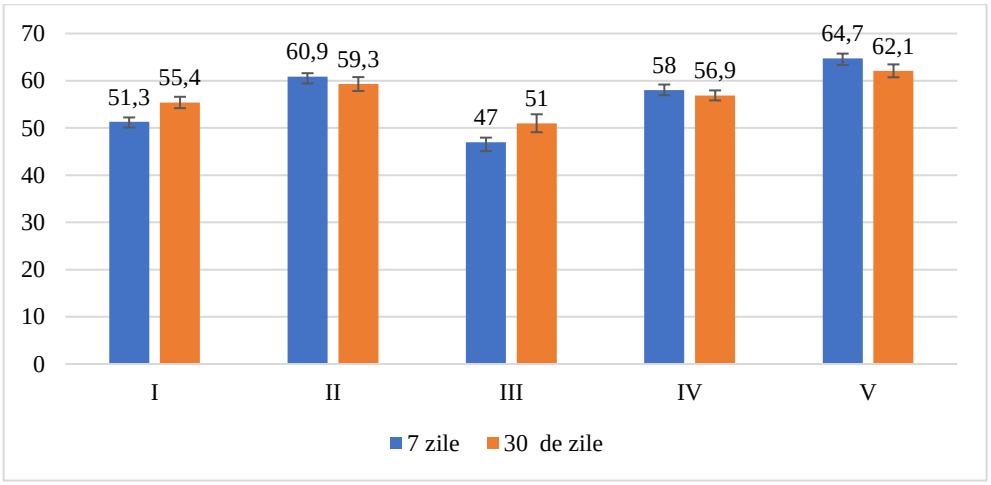
- administrarea asociațiilor de microorganisme *B. thermophilum* suis + *E. faecium* + *L. acidophilus* suis + *L. fermenti* suis a determinat, mai mult sau mai puțin, menținerea conținutului de enterococi în toate segmentele tubului digestiv, ceea ce relevă acțiunea benefică a acestui remediu asupra homeostaziei microbiotei și respectiv asupra sănătății tubului digestiv.

De remarcat, că microbii din genul *Enterococcus* sunt în principal membri vechi și foarte evoluați ai microbiocenozelor intestinale la diferite organisme gazde (Lebreton F. et al., 2014). Se știe că conținutul enterococilor în tubul digestiv poate varia, iar valoarea numerică a lor poate determina fie un efect pozitiv fie unul negativ. De obicei, multe specii de *Enterococcus* sunt considerate comensale pentru tractul intestinal la mamifere, dar unii membri (*E. durans* și *E. hirae*) au fost, de asemenea, asociați cu diareea la animalele care alăptează. Enterococii comensali indigeni pot acționa ca agenți patogeni oportuniști și pot trece peste bariera mucoasei, cauzând infecții sistemice la gazdele imunocompromise (Berg R.D., 1996; Donskey C.J., 2004).

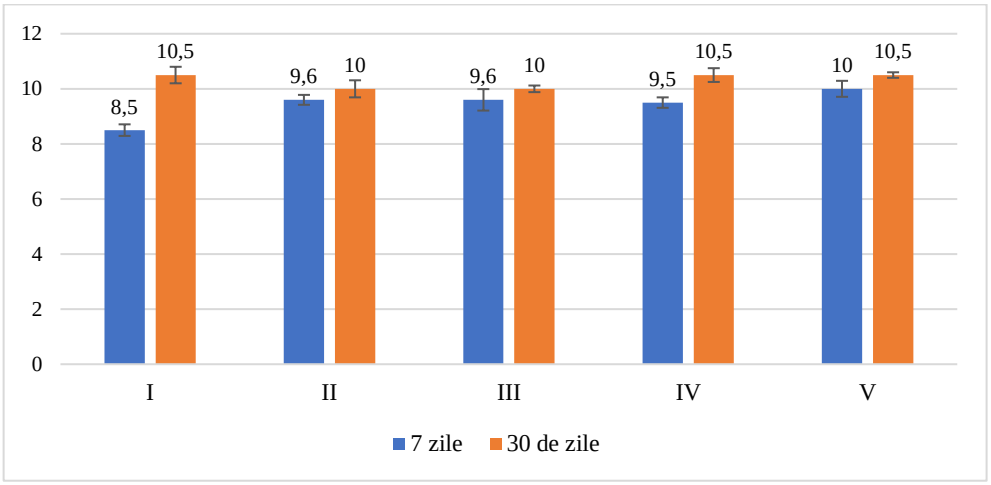
Astfel, putem presupune că asociațiile de microorganisme luate în studiu, precum și monocultura de *Bifidobacterium thermophilum suis* au cel mai benefic efect, în aspectul menținerii unui nivel redus și constant al enterococilor în tubul digestiv la purcei.

În scopul evidențierii acțiunii compozițiilor în baza monoculturilor și asociațiilor de microorganisme asupra stării generale a organismului purceilor, au fost determinați unii indici ai rezistenței nespecifice (activitatea bactericidă a serului sanguin, cantitatea de hemoglobină și de eritrocite). Datele obținute sunt prezentate în figura 4.1. Determinarea activității bactericide este importantă, deoarece acesta este unul dintre parametrii ce caracterizează imunitatea înnăscută.

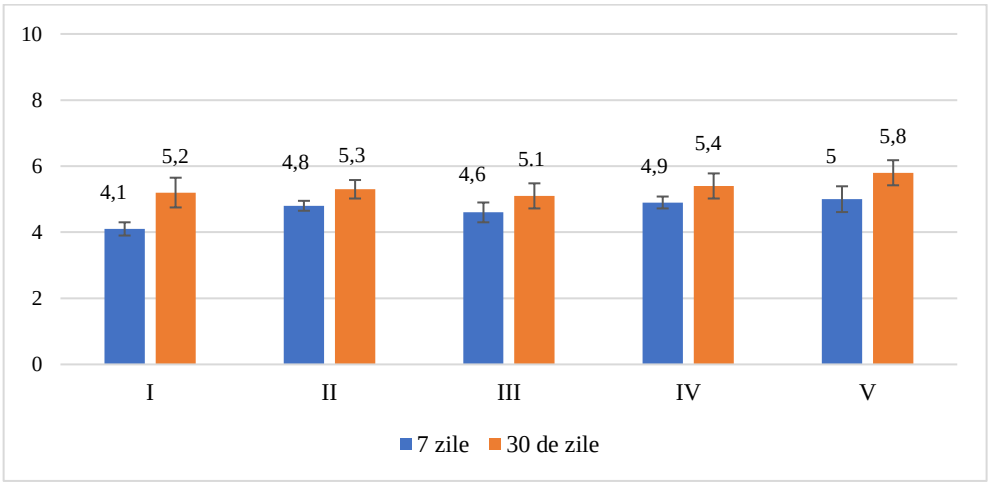
În urma investigațiilor a fost constatată acțiunea pozitivă a monoculturii de bifidobacterii (lotul II) și asociației testate de microorganisme (lotul V) asupra activității bactericide a serului sanguin la purcei. Indicele activității bactericide a crescut respectiv cu 18,7% la animalele din în lotul II, cu 13,1% la animalele din lotul IV și cu 26,7% la animalele din lotul V cu vârsta de 7 zile. La vârsta de 30 de zile, compozițiile microbiene testate au condiționat majorarea indicelui activității bactericide cu 11, 04% la animalele din lotul II, cu 6,5% la animalele din lotul IV și cu 16,3% la animalele din lotul V, comparativ cu indicii lotului martor (Figura 4.1. A).



A



B



C

Figura 4.1. Activitatea bactericidă a serului sanguin, % (A), nivelul de hemoglobina, g/dL (B) și conținutul eritrocitelor, $\times 10^{12}$/L (C) în serul sangvin al purceilor la influența monoculturii și a asociațiilor de microorganisme din genurile obligatorii tractului gastrointestinal

La animalele care au primit doar monoculturi de enterococi (lotul III), s-a observat o scădere a activității bactericide, care a fost la nivelul indicilor din lotul martor (Figura 1.A). Astfel, cele mai bune rezultate ale indicilor studiați au fost relatate la loturile de animale care au primit monoculturi de bifidobacterii (lotul II) și asociația de microorganisme, (lotul V) atât la vârsta de 7 zile, cât și la vârsta de 30 de zile.

Conținutul de hemoglobină din sângele purceilor de 7 zile care au primit asociații experimentale de microorganisme a fost mai mare comparativ cu martorul, iar la purceii de 30 de zile, conținutul de hemoglobină este identic în toate loturile experimentale (inclusiv martorul) (Figura 4.1.B).

Conținutul de eritrocite are aceeași tendință de modificare ca și a parametrilor hemoglobinei: la purceii cu vârsta de 7 zile este mai mare la loturile experimentale, iar la animalele de 30 de zile se stabilește la nivelul lotului martor (Figura 4.1.C).

Aceasta denotă despre faptul că compozițiile elaborate pe baza monoculturii și asociațiilor de microorganisme au avut un efect mai pronunțat asupra indicilor de rezistență nespecifică în primele zile de viață ale purceilor, ceea ce este important în formarea rezistenței generale a organismului față de agenții patogeni care la rândul său determină scăderea mortalității la animalele tinere și, respectiv, o creștere a productivității acestora.

Așadar, toate tipurile de microorganisme testate au avut un efect benefic asupra creșterii și dezvoltării animalelor agricole în condiții de fermă industrială.

La viței, asociațiile de microorganisme în timpul experimentelor au asigurat creșterea masei corporale cu 9,8%-10 %. Monocultura de *Bifidobacterium thermophilum* și asociația de noi microorganisme, inclusiv enterococi au asigurat creșterea medie zilnică în greutate a purceilor de 1,26 - 1,7 ori față de martor și menținerea vitalității acestuia cu 20%-32,5%.

Asociațiile de microorganisme investigate, precum și monocultura de *Bifidobacterium thermophilum suis* au avut un efect homeostatic asupra conținutului de enterococi din tubul digestiv al vițeilor și purceilor, ceea ce argumentează acțiunea benefică a acestora asupra microbiocenozelor microbiene gastrointestinale și, respectiv, asupra sănătății tubului digestiv.

De asemenea, a fost stabilită o relație directă între indicatorii rezistenței naturale a animalelor de fermă din loturile experimentale și productivitatea acestora, ceea ce indică oportunitatea utilizării bifidobacteriilor, enterococilor și bacteriilor lactice în procesul de creștere și nutriție a purceilor și vițeilor tineri în fermele industriale în scopul creșterii rezistenței naturale a animalelor și productivității lor, precum și pentru prevenirea gastroenteritei bacteriene.

Efectul benefic al remediilor bazate pe monoculturi și asociația de microorganisme obligatorii argumentează utilizarea tulpinilor microbiene, inclusiv și a enterococilor, ca alternative antibioticelor pentru producția alimentară durabilă a animalelor.

4.4. Concluzii la capitolul 4

1. Tulpinile de enterococi izolate pentru prima dată din conținutul intestinal al subiecților umani (copii) și animalelor au demonstrat proprietăți utile organismului, confirmate prin valori înalte ale activității antagoniste și capacității adezive. Tulpinile de enterococi specifice tractului digestiv uman au prezentat o capacitate adezivă și antagonistă mai mare în comparație cu cele specifice tractului digestiv animal.

2. În baza analizei datelor privind capacitatea de adeziune și activitatea antagonistă (antibacteriană) s-a constatat că cei mai înalți indici au manifestat tulpina de enterococi cu nr. 116 din conținutul intestinal uman și tulpina de enterococi cu nr. 77 din conținutul intestinal animal, care pot fi recomandate pentru aplicare ulterioară în calitate de probiotice.

3. Tulpinile de enterococi au avut o activitate de combatere a bacteriilor patogene și indice adeziv mai mare comparativ cu tulpinile selectate de lactococi, ceea ce confirmă potențialul probiotic al lor.

4. A fost stabilit că enterococii (*E. faecium*) au un nivel înalt de compatibilitate cu reprezentanții microbieni din genurile obligative (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*) comparabil cu cel al lactococilor (*L. lactis*) și mai mare comparativ cu a streptococilor (*S. thermophilus*), iar în unele cazuri se observă chiar și o acțiune stimulatorie asupra acestui tip de bacterii. Compatibilitatea sau interacțiunea enterococilor cu alți reprezentanți ai microflorei intestinale prezintă interes și din aspectul semnificației duale ale acestor bacterii – ca comensali și agenți patogeni nosocomiali.

5. Experimental a fost demonstrată oportunitatea includerii, pe lângă bacteriile obligative (*Bifidobacterium și Lactobacillus*) a unor tulpini de enterococi, care fiind parte a preparatelor (asociațiilor) microbiene testate au contribuit la eliminarea dismicrobismului și stabilirea eubiozei intestinale.

6. Modificările conținutului enterococilor induse de administrarea compozițiilor noi microbiene, ce includ și tulpinile selectate de enterococi indică la faptul că aceste bacterii ating un nivelul sanogen, ce este determinat de un anumit coraport al lor atât cu reprezentanții bacteriilor benefice obligative ale tubului digestiv, cât și cu bacteriile patogene.

7. Remediile elaborate pe baza monoculturii și asociațiilor de microorganisme, ce conțin tulpini de enterococi testate pe animale tinere agricole (viței și purcei) au avut un efect benefic

asupra creșterii și dezvoltării acestora în condiții de fermă industrială. Preparatele noi microbiene, bazate pe asociații de microorganisme comensale au asigurat creșterea masei corporale a vițeilor și purceilor și menținerea vitalității acestora.

8. Asociațiile de microorganisme investigate, precum și monocultura de *Bifidobacterium thermophilum suis* au avut un efect homeostatic asupra conținutului de enterococi din tubul digestiv al vițeilor și purceilor, ceea ce argumentează acțiunea benefică a acestora asupra microbiocenozelor microbiene gastrointestinale și respectiv asupra sănătății tubului digestiv.

9. A fost stabilită o relație directă între indicatorii rezistenței naturale a animalelor de fermă din loturile experimentale și productivitatea acestora, ceea ce indică oportunitatea utilizării bifidobacteriilor, enterococilor și bacteriilor lactice în procesul de creștere și nutriție a purceilor și vițeilor tineri în fermele industriale în scopul creșterii rezistenței naturale a animalelor și productivității lor, precum și pentru prevenirea gastroenteritei bacteriene.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Rezultatele științifice obținute în cadrul tezei de doctorat „*Rolul fiziologic al enterococilor intestinali în menținerea sănătății tubului digestiv*”, în concordanță cu scopul și obiectivele de cercetare propuse, au permis formularea următoarelor concluzii generale:

1. Modificările cantitative ale enterococilor din conținutul intestinal de la subiecți umani și animale în diferite condiții și în funcție de statutul fiziologic al tubului digestiv și al organismului atestă o corelație cu valorile bifidobacteriilor și lactobacteriilor, ceea ce indică la o posibilă cooperare a acestor bacterii în menținerea efectivului bacteriilor de *E. coli* la un nivel ce nu permite dezvoltarea patogeniilor intestinale [cap. 3].

2. Incidența enterococilor la diferite specii de animale depinde de mediul de trai al acestora, fiind mai mare la animalele de companie și la speciile de păsări din mediul rural comparativ cu cele din mediul urban, iar corelația joasă a nivelului enterococilor cu cel al bacteriilor benefice (bifido- și lactobacteriile) și înaltă – cu agenții patogeni (*E. coli*) la animalele de companie, la unele animale agricole și la păsările din mediul rural relevă că contactul apropiat al animalelor cu oamenii, precum și partajarea unor medii comune de trai, determină modificarea microflorei intestinale cu dominanța preponderentă a bacteriilor patogene [cap. 3, sub. 3.2.1.].

3. Efectivul enterococilor este semnificativ influențat și de starea de sănătate a tubului digestiv, fiind documentată majorarea cantității acestora la subiecții umani și la animalele agricole cu dismicrobism intestinal și disfuncții intestinale diareice, iar cele mai mari diferențe între subiecții umani sănătoși și cu dereglări ale homeostaziei intestinale s-au observat la grupa de copii cu vârsta de 31-60 de zile și de 1-4 ani, iar la animalele agricole în primele 30 de zile de viață, ceea ce permite de a concluziona că în primele, zile, luni și ani de viață, formele sau tulpinile comensale ale enterococilor pot căpăta caractere patogene/virulente în cazurile, când se creează condițiile respective de infectare (de dismicrobism intestinal și disfuncții intestinale diareice) [cap. 3, sub. 3.2.2.].

4. Modificările cantitative ale enterococilor în conținutul intestinal pe fondalul administrării rațiilor de diferită valoare nutritivă (cu exces: fie de proteine; fie de lipide; fie de glucide) relevă caracterul de comensali al acestora, întrucât valorile numerice ale lor corelează pozitiv cu cele ale bacteriilor sanogene mediului intestinal și negativ cu microbii patogeni. Acțiunea diferențiată a rațiilor testate cu diferită structură calorică asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali denotă că valoarea numerică a enterococilor poate fi reglată și menținută nu numai prin preparate microbiene cu acțiune probiotică, ci și prin utilizarea rațiilor alimentare, care manifestă acțiune prebiotică [cap. 3, sub. 3.3.].

5. A fost evidențiată sensibilitatea diferită a enterococilor în cazurile modificării statutului fiziologic al organismului și stabilită posibilitatea de a influența efectivul acestora prin

variația valorii calorice a nutrienților cu repercusiune asupra stării sănătății tubului digestiv și al organismului [cap. 3, sub. 3.4.2.].

6. Majorarea efectivului enterococilor în condiții de inaniție (înfometare) în comun cu cel al bacteriilor de *E. coli* și reducerea nivelului bifidobacteriilor și lactobacililor demonstrează că lipsa hranei creează, într-un timp destul de mic, condiții de dezvoltare a disbiozei, ce presupune că bacteriile patogene pot forma „coaliții" cu enterococii, care în condiții normale nu manifestă patogenitate [cap. 3, sub. 3.4.1.].

7. Tulpinile de enterococi izolate pentru prima dată din conținutul intestinal al subiecților umani (copii) și al animalelor au demonstrat proprietăți de probiotice confirmate prin valori înalte ale activității antagoniste și capacității adezive, fiind mai pronunțate comparativ cu tulpinile de lactococi și mai marcate la tulpinile de origine umană față de cele de origine animală [cap. 4, sub. 4.1.].

8. A fost stabilit că enterococii (*E. faecium*) au un nivel înalt de compatibilitate cu reprezentanții microbieni din genurile obligative (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*) comparabil cu cel al lactococilor (*L. lactis*) și mai mare comparativ cu al streptococilor (*S. thermophilus*). Compatibilitatea sau interacțiunea enterococilor cu alți reprezentanți ai microflorei intestinale prezintă semnificație în manifestarea aspectului de comensali sau de patogeni nosocomiali al lor și în argumentarea asocierii enterococilor cu alte bacterii în compoziții microbiene cu acțiune probiotică [cap. 4, sub. 4.2.].

9. Experimental, a fost stabilită acțiunea probiotică (sanogenă) a compozițiilor microbiene, elaborate în baza asociațiilor de bacterii obligative (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*) și a tulpinilor testate de enterococi, care au determinat menținerea unui echilibru intestinal sanogen, condiționat de o anumită corelație a enterococilor atât cu reprezentanții bacteriilor obligative benefice, cât și cu bacteriile patogene, contribuind, astfel, la eliminarea dismicrobismului și stabilirea eubiozei intestinale [cap. 4, sub. 4.1. și 4.2.].

10. Au fost elaborate compoziții, pe baza monoculturilor și asociațiilor de microorganisme, ce conțin tulpini de enterococi, testate pe animale tinere agricole (viței și purcei), care au manifestat un efect benefic asupra creșterii și dezvoltării acestora în condiții de fermă industrială, fiind stabilită o relație directă dintre conținutul de enterococi din tubul digestiv al vițeilor și purceilor, indicatorii rezistenței naturale a animalelor de fermă din loturile experimentale și productivitatea acestora, ceea ce trasează oportunitatea utilizării enterococilor, bifidobacteriilor și altor bacterii acidolactice în procesul de creștere și nutriție a purceilor și vițeilor tineri în fermele industriale în scopul creșterii rezistenței naturale și productivității lor [cap. 4, sub. 4.3.].

Recomandări practice

Aspectul aplicativ al cercetărilor și al rezultatelor obținute vizează testarea tulpinilor sigure de enterococi cu proprietăți antibacteriene demonstrate și indici adezivi înalți, și posibilitatea utilizării lor în elaborarea compozițiilor microbiene mixte cu acțiune probiotică, ceea ce a permis conturarea următoarelor recomandări:

- Includerea în compozițiile microbiene cu acțiune probiotică a tulpinilor de enterococi, care posedă capacitate adezivă înaltă și activitate antagonistă sporită față de bacteriile patogene, și care prezintă siguranță pentru sănătatea tubului digestiv;
- Compozițiile noi microbiene pe baza tulpinilor de enterococi pot fi utilizate în baza testării efectului benefic al lor asupra microflorei intestinale și asupra parametrilor fiziologici și fizici ai organismului și demonstrării siguranței pentru sănătate;
- Aplicarea compozițiilor noi microbiene trebuie să se conformeze cerințelor normative înaintate față de tulpinile de enterococi recomandate în calitate de probiotice.

Sugestii privind cercetările de perspectivă. În aspectul descris mai sus, drept perspectivă a continuității cercetărilor privind efectul benefic al tulpinilor de enterococi reprezintă investigarea trăsăturilor asociate produsului comercial finit, cum ar fi: identificarea bacteriilor la nivel de gen, specie, tulpină; depunerea tulpinii în colecții ale microorganismelor public accesibile; secvențierea și documentarea expresiei genelor; determinarea stabilității genetice; excluderea efectelor patogenice, invazive și carciogenice; identificarea nivelului de doză corespunzător cu descripția respectivă; demonstrarea viabilității și stabilității la păstrare; testarea privind susceptibilitatea la antibiotice și controlul tulpinilor la virulență.

De asemenea, se propune de a investiga detaliat efectul prebiotic al rațiilor alimentare asupra efectivului enterococilor în raport cu cel al bacteriilor obligative și facultative din mediul intestinal, în aspectul utilizării nutrienților din diferite surse și de diferită natură și combinării acestora în formula, ce ar avea cea mai benefică acțiune asupra componentelor microbiotei intestinale.

Aportul personal. Autorul a realizat montarea experimentelor pe durata realizării programului de doctorat, efectuarea investigațiilor microbiologice, cuantificarea, sistematizarea și analiza datelor colectate, prin aplicarea metodelor respective de cercetare, interpretarea, generalizarea datelor și a concluziilor conform temei abordate și scopului stabilit.

BIBLIOGRAFIE

1. AKAGAWA, S., TSUJI, S., ONUMA, C., AKAGAWA, Y., YAMAGUCHI, T., YAMAGISHI, M., YAMANOUCHI, S., KIMATA, T., SEKIYA, S.I., OHASHI, A., HASHIYADA, M., AKANE A., KANEKO K. Effect of delivery mode and nutrition on gut microbiota in neonates. In: *Ann Nutr Metab.* 2019, nr. 74(2), pp. 132-139. doi: 10.1159/000496427. ISSN 0250-6807.

2. ALBENBERG, L.G., WU, G.D. Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. In: *Gastroenterology*. 2014, nr. 146(6), pp. 1564-1572. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.058). ISSN 0016-5085.

3. ALLAM-NDOUL, B., CASTONGUAY-PARADIS, S., VEILLEUX, A. Gut microbiota and intestinal trans-epithelial permeability. In: *Int. J. Mol. Sci.* 2020, nr. 21(17), p. 6402. doi: 10.3390/ijms21176402. ISSN 1422-0067.

4. ANDOH, A. Physiological role of gut microbiota for maintaining human health. In: *Digestion*. 2016, nr. 93(3), pp. 176-81. doi: 10.1159/000444066.ISSN 0012-2823.

5. ANDRES, S.F., ZHANG, Y., KUHN, M., SCOTTOLINE, B. Building better barriers: how nutrition and undernutrition impact pediatric intestinal health. In: *Front Immunol*. 2023, nr. 14, p. 1192936. doi: 10.3389/fimmu.2023.1192936. ISSN 1664-3224.

6. ANWAR, H., IFTIKHAR, A., MUZAFFAR, H., ALMATROUDI, A., ALLEMAILEM, K.S., NAVAID, S., SALEEM, S., KHURSHID, M. Biodiversity of gut microbiota: Impact of various host and environmental factors. In: *Biomed Res Int.* 2021, nr. 2021, p. 5575245. doi: 10.1155/2021/5575245. ISSN 2314-6141.

7. AOUN, A., DARWISH, F., HAMOD, N. The influence of the gut microbiome on obesity in adults and the role of probiotics, prebiotics, and synbiotics for weight loss. In: *Prev Nutr Food Sci*. 2020, nr. 25(2), pp. 113-123. doi: 10.3746/pnf.2020.25.2.113. eISSN 2287-8602.

8. ARAÚJO, T.F., DE LUCES FORTES FERREIRA, C.L. The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. In: *Brazilian Archives of Biology and Technology. International Journal*. 2013, nr. 56(3), pp. 457-466. ISSN 1516-8913.

9. ARUMUGAM, M., RAES, J., PELLETIER, E., LE PASLIER, D., et al. Enterotypes of the human gut microbiome. In: *Nature.* 2011, nr. 473(7346), pp. 174-80. doi: 10.1038/nature09944. ISSN 1476-4687.

10. BÄCKHED, F., DING, H., WANG, T. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, nr. 101(44), pp. 15718-15723. ISSN 0027-8424.

11. BAGHBANI, T., NIKZAD, H., AZADBAKHT, J., IZADPANAH, F., HADDAD KASHANI, H. Dual and mutual interaction between microbiota and viral infections: a possible treat for COVID-19. In: *Microb Cell Fact*. 2020, nr. 19(1), p. 217. doi: 10.1186/s12934-020-01483-1. ISSN 1475-2859.

12. BALCÁZAR, J. L. VENDRELL, D., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., GIRONÉS, O., MÚZQUIZ, J. L. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. In: *Vet Microbiol*. 2007, vol. 122, nr. 3-4, pp. 373-380. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.01.023. ISSN 0378-1135.

13. BANDYOPADHYAY, B., DAS, S., MITRA, PK., KUNDU, A., MANDAL, V., ADHIKARY, R., MANDAL, V., MANDAL, NC. Characterization of two new strains of

Lactococcus lactis for their probiotic efficacy over commercial synbiotics consortia. In: *Braz J Microbiol*. 2022, nr. 53(2) pp. 903-920. doi: 10.1007/s42770-022-00685-6. ISSN 1517-8382.

14. BANLA, L.I., SALZMAN, N.H., KRISTICH, C.J. Colonization of the mammalian intestinal tract by enterococci. In: *Curr Opin Microbiol*. 2019, 47, pp. 26-31. doi: 10.1016/j.mib.2018.10.005. ISSN 1369-5274.

15. BAQUERO, F., NOMBELA, C. The microbiome as a human organ. In: *Clin Microbiol Infect*. 2012, Suppl 4, pp. 2-4. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x. ISSN 1198-743X.

16. BAR, K., WISPLINGHOFF, H., WENZEL, R.P. Systemic inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial bloodstream infections due to enterococci. In: *BMC Infect Dis*, 2006, nr. 6, p. 145. doi: org/10.1186/1471-2334-6-145. ISSN 147-2334.

17. BARBOSA, A.A.T., MANTOVANI, H.C., JAIN, S. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products. In: *Critic. Rev. Biotechnol.* 2017, nr. 37, pp. 852-864. doi: 10.1080/07388551.2016.1262323. ISSN 0738-8551.

18. BEAM, A., CLINGER, E., HAO, L. Effect of diet and dietary components on the composition of the gut microbiota. In: *Nutrients*. 2021, nr. 13, p. 2795. doi: org/10.3390/nu13082795. ISSN 2072-6643.

19. BECQUET, P. EU assessment of enterococci as feed additives. In: *Int J Food Microbiol*., 2003, nr. 1(88:2-3), pp. 247-254. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00187-9. ISSN 0168-1605.

20. BELKAID, Y., HAND, T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. In: *Cell*. 2014, nr. 157(1), pp.121-41. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011. ISSN 0092-8674.

21. BEN BRAÏEK, O, SMAOUI, S. Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. In: *Biomed Res Int*. 2019, p. 5938210. doi: 10.1155/2019/5938210. ISSN 2314-6141.

22. BERG, D., CLEMENTE, J. C., COLOMBEL, J. F. Can inflammatory bowel disease be permanently treated with short-term interventions on the microbiome? In: *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015, nr. 9(6), pp. 781-795. doi: 10.1586/17474124.2015.1013031. ISSN 1747-4124.

23. BERG, R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. In: *Trends in Microbiology*, 1996. nr. 4(11), pp. 430-435. ISSN 0966-842X.

24. BERGEY, D.H., HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1994. 976 p. ISBN 9780683006032.

25. BERLOW, M., KOHL, K.D., DERRYBERRY, E.P. Evaluation of non-lethal gut microbiome sampling methods in a passerine bird. In: *International Journal of Avian Science*. 2019, nr. 162, pp. 911-923. doi: org/10.1111/ibi.12807. ISSN 0019-1019.

26. BEUKERS, A.G., ZAHEER, R., GOJI, N., AMOAKO, K.K., CHAVES, A.V., WARD, M.P., MCALLISTER, T.A. Comparative genomics of *Enterococcus* spp. isolated from bovine feces. In: *BMC Microbiol.* 2017, nr. 17, p. 52. doi: org/10.1186/s12866-017-0962-1. ISSN 1471-2180.

27. BHUTE, S.S., MEFFERD, C.C., PHAN, J.R. et al. A high-carbohydrate diet prolongs dysbiosis and clostridioides difficile carriage and increases delayed mortality in a hamster model of infection. In: *Microbiol Spectr.* 2022, nr. 10(4), pp. e01804-21. ISSN 2165-0497.

28. BINDA, S., HILL, C., JOHANSEN, E., OBIS, D., POT, B., SANDERS, M.E., TREMBLAY, A., OUWEHAND, A.C. Criteria to qualify microorganisms as „probiotic" in foods and dietary supplements. In: *Front Microbiol.* 2020, nr. 11, p. 1662. doi: 10.3389/fmicb.2020. ISSN 1664-302X.

29. **BOGDAN, V**. Incidența streptococilor intestinali și rolul lor în sănătătea organismului. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2016, nr. 3(330), pp. 59-64. ISSN 1857-064X.

30. **BOGDAN, V**. Streptococii intestinali semnificativi pentru sănătatea organismului. In: *Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători,* Ed. Ediția IX, 15 iunie 2020, Chișinău, Republica Moldova: 2020, Ediția 9, Vol.1, pp. 104-111. ISBN 978-9975-108-66-9.

31. **BOGDAN, V**., VRABIE, V. The influence of new microbial associations on some functional parameters of calves and piglets. In: *Scientific Papers. Series D. Animal Science*, 2021, nr. 2(64), pp. 95-102. ISSN 2285-5750.

32. **BOGDAN, V**., VRABIE, V., CIOCHINĂ, V. Adhesion and antagonists' properties of Enterococus monocultures and the opportunity of their use as probiotics. In: *Scientific Papers. Series D. Animal Science*, 2022, nr. 1(65), pp. 127-132. ISSN 2285-5750.

33. **BOGDAN, V**., VRABIE, V., CIOCHINĂ, V. The influence of the food ration on the process of multiplication and development of the intestinal *Enterococcus* component. In: *Scientific Papers. Series D. Animal Science,* 2021, nr. 1(64), pp. 121-126. ISSN 2285-5750.

34. BOMBA, A., JONECOVÁ, Z., GANCARČÍKOVÁ, S., NEMCOVA, R. The gastrointestinal microbiota of farm animals. In: *Gastrointestinal Microbiology.* 2006, pp. 381-400. doi: 10.3109/9781420014952-21. ISBN 9780824726416.

35. BONACINA, J., SUÁREZ, N., HORMIGO, R., FADDA, S., LECHNER, M., SAAVEDRA, L. A genomic view of food-related and probiotic *Enterococcus* strains. In: *DNA Res.* 2017, nr. 24(1), pp. 11-24. doi: 10.1093/dnares/dsw043. ISSN 1756-1663.

36. BOSCAINI, S., LEIGH, S.J., LAVELLE, A. et al. Microbiota and body weight control: Weight watchers within? In: *Mol Metab.* 2022, nr. 57, p. 101427. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101427. ISSN 2212-8778.

37. BRON, P.A., VAN BAARLEN, P., KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. In: *Nat. Rev. Microbiol.* 2012, nr. 10, pp. 66-78. ISSN 1740-1526.

38. BYAPPANAHALLI, M.N., NEVERS, M.B., KORAJKIC, A., STALEY, Z.R., HARWOOD, V.J. Enterococci in the environment. In: *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012, nr. 76(4), pp. 685-706. doi: 10.1128/MMBR.00023-12.; ISSN 1092-2172.

39. CAESAR, R., TREMAROLI, V., KOVATCHEVA-DATCHARY, P., CANI, P. D., BÄCKHED, F. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates wat inflammation through tlr signaling. In: *Cell Metabolism.* 2015, nr. 22(4), pp. 658-668. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.026. ISSN 1550-4131.

40. CALATRAVA, E. Other *Streptococcus* species and *Enterococcus*. *Encyclopedia of Infection and Immunity*, 2022, nr. 1, pp. 529–541. doi: org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00159-2. ISBN 978-0-323-90303-5.

41. AMERON, R., DUNCANSON, K., HOEDT, E.C. et al. Does the microbiome play a role in the pathogenesis of colonic diverticular disease? A systematic review. In: *J Gastroenterol Hepatol.* 2023, nr. 38(7), pp. 1028-1039. doi: 10.1111/jgh.16142. ISSN 0815-9319.

42. CANI, P.D., DELZENNE, N.M., AMAR, J., BURCELIN, R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. In: *Pathol Biol (Paris).* 2008, nr. 56(5) pp. 305-9. doi: 10.1016/j.patbio.2007.09.008. ISSN 0369-8114.

43. CAROL-DUMITRIU, E., BERCEA, I., DOBRE, I., GIBRACICA, R. Investigation into swine streptococcemia. I. Anatomo-clinical and etiological correlative aspects in suckling piglet streprococcemia. In: *Lucr. Stiint. Ser. C Med. Vet.*, 1981, nr. 23, pp. 53-57. ISSN1454-7406.

44. CELI, P., COWIESON, A.J., FRU-NJI, F., STEINERT, R.E., KLUENTER, A.-M., VERLHAC, V. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. In: *Animal Feed Science and Technology*. 2017, nr. 234, pp. 88-100. ISSN 1873-2216.

45. CHENG Y., LING Z., LI L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. In: *Front. Immunol.* 2020, nr. 11, p. 3100. doi: 10.3389/fimmu.2020.615056. ISSN 1664-3224.

46. CHENOWETH, C.; SCHABERG, D. The epidemiology of enterococci. In: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1990, nr. 9, pp. 80-89. ISSN 0934-9723.

47. CHOEISOONGNERN, T., SIRILUN, S., WADITEE-SIRISATTHA, R., PINTHA, K., PEERAJAN, S., CHAIYASUT, C. Potential probiotic *Enterococcus faecium* OV3-6 and its bioactive peptide as alternative bio-preservation. In: *Foods*. 2021, nr. 10(10), p. 2264. doi: 10.3390/foods10102264. ISSN 2304-8158.

48. CHUNXI, L., HAIYUE, L., YANXIA, L., JIANBING, P., JIN, S. The Gut Microbiota and Respiratory Diseases: New Evidence. In: *J Immunol Res.* 2020, nr. 31, p. 2340670. doi: 10.1155/2020/2340670. ISSN 2314-7156.

49. CIANCI, R., PAGLIARI, D., PICCIRILLO, C.A., FRITZ, J.H., GAMBASSI, G. The Microbiota and Immune System Crosstalk in Health and Disease. In: *Mediators Inflamm*. 2018, nr. 2018, p. 2912539. doi: 10.1155/2018/2912539. ISSN 0962-9351.

50. COKER, J.K., MOYNE, O., RODIONOV, D.A., ZENGLER, K. Carbohydrates great and small, from dietary fiber to sialic acids: How glycans influence the gut microbiome and affect human health. In: *Gut Microbes.* 2021, nr. 13(1), pp. 1-18. doi: 10.1080/19490976.2020.1869502. ISSN 1949-0976.

51. COLLABO, M.C., GUEIMONDE, M., HERNÁNDEZ, M., SANZ, Y., SALMINEN, S. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. In: *Journal of Food Protection*, 2005, nr. 68(12), pp. 2672-2678. doi: org/10.4315/0362-028x-68.12.2672. ISSN 0362-028X.

52. COLLINS, J.D., WALL, P.G. Food safety and animal production systems: controlling zoonoses at farm level. In: *Rev Sci Tech.* 2004, nr. 23(2), pp. 685-700. doi: 10.20506/rst.23.2.1510. ISSN 0253-1933.

53. COOK, T.M., MANSUY-AUBERT, V. Communication between the gut microbiota and peripheral nervous system in health and chronic disease. In: *Gut Microbes*. 2022, 14(1), p. 2068365. doi: 10.1080/19490976.2022.2068365. ISSN 1949-0976.

54. COSTABILE, A., SANTARELLI, S., CLAUS, S.P. et al. Effect of breadmaking process on in vitro gut microbiota parameters in irritable bowel syndrome. In: *PLoS One*. 2014, nr. 9(10), p. e111225. doi: 10.1371/journal.pone.0111225. ISSN 1932-6203.

55. CUMMINGS, J.H., MACFARLANE, G.T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. In: *Clin. Nutr.* 1997, nr. 16, pp. 3-11. doi: 10.1016/S0261-5614(97)80252-X. ISSN 0261-5614.

56. DA SILVA, V.L., CAÇADOR, N.C., DA SILVA CDOS, S., FONTES, C.O., GARCIA, G.D., NICOLI, J.R., DINIZ, C.G. Occurrence of multidrug-resistant and toxic-metal tolerant

enterococci in fresh feces from urban pigeons in Brazil. In: *Microbes Environ*. 2012, nr. 27(2), pp. 179-85. doi: 10.1264/jsme2.me11296. ISSN 1342-6311.

57. DACA, A., JARZEMBOWSKI, T. From the Friend to the Foe – *Enterococcus faecalis* Diverse Impact on the Human Immune System. In: *Int. J. Mol. Sci.* 2024, nr. *25*, p. 2422. *doi: org/10.3390/ijms25042422*. ISSN 1661-6596.

58. DAVID, L., MAURICE, C., CARMODY, R. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. In: *Nature.* 2014, nr. 505, pp. 559-563. doi: org/10.1038/nature12820. ISSN 1476-4687.

59. DEL CHIERICO, F., VERNOCCHI, P., PETRUCCA, A., PACI, P., FUENTES, S., PRATICO, G. et al. Phylogenetic and Metabolic Tracking of Gut Microbiota during Perinatal Development. In: *PloS One*, 2015, nr. 10(9), p. e0137347. doi: 10.1371/journal.pone.0137347 ISSN 1932-6203.

60. DERRIEN, M., ALVAREZ, A.S., DE VOS, W.M. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. In: *Trends Microbiol*. 2019, nr. 27(12), pp. 997-1010. doi: 10.1016/j.tim.2019.08.001. ISSN 0966-842X (1878-4380).

61. DEVKOTA, S., WANG, Y., MUSCH, M.W. et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10-/- mice. In: *Nature*. 2012, nr. 487(7405), pp. 104-8. doi: 10.1038/nature11225. ISSN 1476-4687.

62. DIETHER, N.E., WILLING, B.P., 2019 Microbial Fermentation of Dietary Protein: An Important Factor in Diet–Microbe–Host Interaction. In: *Microorganisms.* 2019, nr. 7(1), p. 19. doi: 10.3390/microorganisms7010019.) ISSN 2076-2607.

63. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. [online] disponibil: https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2000/54/oj/eng. [citat 23.04.2024]

64. DONG, T.S., LUU, K., LAGISHETTY, V., SEDIGHIAN, F., WOO, S.-L., DRESKIN, B.W. et al. A high protein calorie restriction diet alters the gut microbiome in obesity. In: *Nutrients*. 2020, nr. 12(10), p. 3221. ISSN 2072-6643.

65. DONKEY, C. J. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. In: *Clinical Infectious Diseases*, 2004, nr. 39(2), pp. 219-226. ISSN 1058-4838.

66. DUBIN, K., PAMER, E.G. Enterococci and Their Interactions with the Intestinal Microbiome. In: *Microbiol Spectr*. 2014, nr. 5(6), p. 10. doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0014-2016. ISSN 2165-0497.

67. EATON, T.J., GASSON, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. In: *Appl Environ Microbiol*. 2001, nr. 67(4), pp. 1628-35. doi: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001. ISSN 0099-2240.

68. ECKBURG, P.B., BIK, E.M., BERNSTEIN, C.N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, M., GILL, S.R., NELSON, K.E., RELMAN, D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. In: *Science*. 2005, nr. 308(5728), pp. 1635-8. doi: 10.1126/science.1110591. ISSN 0036-8075.

69. EDWARDS, J.G., ODELL, W.D. Partial characterization of chorionic gonadotropin-like binding sites from the bacteria Xanthomonas maltophilia. In: *Exp Biol Med (May-wood).* 2003, nr. 228(8), pp. 926-934. ISSN 1535-3702.

70. EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ), KOUTSOUMANIS, K, ALLENDE, A, ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Update of the list of QPS-recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 16: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2022. In: *EFSA J.* 2022, nr. 20(7), p. e07408. doi: 10.2903/j.efsa.2022.7408. Disponibil: https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qps ISSN 1868-596X.

71. ELASHIRY, M.M, ELASHIRY, M., ZEITOUN, R., ELSAYED, R., TIAN, F., SABER, S.E., ELASHRY, S.H., TAY, F.R., CUTLER, C.W. *Enterococcus* faecalis induces differentiation of immune-aberrant dendritic cells from murine bone marrow-derived stem cells. In: *Infect Immun*. 2020, nr. 88(11), pp. e00338-20. doi: 10.1128/IAI.00338-20. ISSN 0019-9567.

72. Ending the War Metaphor. The Changing Agenda for Unraveling the Host-Microbe Relationship: Workshop Summary. The National Academies Press: Washington, DC, USA, 2006. ISBN-10 0-309-09601-4.

73. ENGSTRAND, L., LINDBERG, M. *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. In: *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013, nr. 27, pp. 39-45. ISSN 1521-6918.

74. FAN, M., CHOI, Y.J., WEDAMULLA, N.E., TANG, Y., HAN, K.I., HWANG, J.Y., KIM, E.K. Heat-Killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 attenuate lipid accumulation in diet-induced obese (DIO) mice by activating AMPK signaling in liver. In. *Foods.* 2022, nr. 11, p. 575. ISSN 2304-8158.

75. FAO/WHO *Guidelines for the Evaluation Of Probiotics in Food*. Paris: FAO, 2002, pp. 1-11. ISBN: 22-5-105513-0

76. FEDERLE, M.J., BASSLER, B.L. Interspecies communication in bacteria. In: *J Clin Invest.* 2003, nr. 112(9), pp. 1291-1299. ISSN 0021-9738.

77. FERNÁNDEZ-HIDALGO, N., ESCOLÀ-VERGÉ, L. *Enterococcus* faecalis bacteremia: consider an echocardiography, but consult an infectious diseases specialist. In: *J Am Coll Cardiol*. 2019, nr. 74(2), pp. 202-204. doi: 10.1016/j.jacc.2019.03.526. ISSN 0735-1097.

78. FINEGOLD, S.M., ATTEBERY, H.R., SUTTER, V.L. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. In: *Am J Clin Nutr*. 1974, nr. 27(12), pp.1456-69. doi: 10.1093/ajcn/27.12.1456. ISSN 1938-3207.

79. FINEGOLD, S.M., SUTTER, V.L., MATHIESEN, G.E. Microflora composition and development. In: *Human Intestinal Microflora in Health and Disease.* Hentges D.J., editor. Academic Press: New York. 1983. pp. 3-119. ISBN 0123412803.

80. FINEGOLD, S.M., SUTTER, V.L., MATHISEN, G.E. Normal indigenous intestinal flora. In: D. J. Hentges. *Human intestinal microflora in health and disease*. 1983, pp. 3-29. Waltham: Academic Press. ISBN 0123412803.

81. FIORE, E., VAN TYNE, D., GILMORE, M.S. Pathogenicity of Enterococci. In: *Microbiol Spectr.* 2019, vol 7, nr. 4. p. 1128. doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0053-2018. ISSN 2165-0497.

82. FISHER, K., PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. In: *Microbiology (Reading).* 2009, nr. 155(Pt 6), pp.1749-1757. doi: 10.1099/mic.0.026385-0. ISSN 1350-0872.

83. FONTAINE, F., TURJEMAN, S., CALLENS, K.et al. The intersection of undernutrition, microbiome, and child development in the first years of life. In: *Nat Commun.* 2023, nr. 14, p. 3554. doi: org/10.1038/s41467-023-39285-9. ISSN 2041-1723.

84. FOULQUIÉ MORENO, M.R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. In: *Int J Food Microbiol.* 2006, nr. 106(1), pp. 1-24. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026. ISSN 0168-1605.

85. FRANK, D., ST AMAND, A., FELDMAN, R., BOEDEKER, E., HARPAZ, N., PACE, N. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, nr. 104, pp. 13780-13785. ISSN 1091-6490.

86. FRANZ, C.M.A.P., HOLZAPFEL, W.H., STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? In: *Inter J Food Microbiol*. 1999, nr. 47, pp. 1-24. ISSN 0168-1605.

87. FRANZ, C.M.A.P., HUCH, M., ABRIOUEL, H., HOLZAPFEL, W., GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. In: *Int. J. Food Microbiol.* 2011, nr. 151, pp. 125-140. ISSN: 0168-1605. ISSN 0168-1605.

88. FUGABAN, J.I.I., HOLZAPFEL, W.H., TODOROV, S.D. Probiotic potential and safety assessment of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* strains with antibacterial activity against *Listeria* and vancomycin-resistant enterococci. In: *Curr Res Microb Sci.* 2021, nr. 2, p. 100070. doi: 10.1016/j.crmicr.2021.100070. ISSN 2666-5174.

89. GARCIA, N., GUTIERREZ, E. Anorexia nervosa and microbiota: systematic review and critical appraisal. In: *Eat Weight Disord*. 2023, nr. 28(1), p. 1. doi: 10.1007/s40519-023-01529-4. ISSN 1124-4909, ISSN 1124-4909.

90. GARCÍA-DÍEZ, J., SARAIVA, C. Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety. In: *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021, nr. 18, p. 2544. doi: 10.3390/ijerph18052544. ISSN 1661-7827.

91. GARCIA-MAZCORRO, J.F., ALANIS-LOPEZ, C., MARROQUIN-CARDONA, A.G., KAWAS, J.R. Composition and potential function of fecal bacterial microbiota from six bird species. In: *Birds. 2021, nr. 2(1),* pp. 42-59. doi:org/10.3390/birds2010003. ISSN 0007-0335.

92. GARCÍA-SOLACHE, M., RICE, L.B. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. In: *Clin microbiol rev*. 2019, nr. 32(2), p. e00058-18. doi: 10.1128/CMR.00058-18. ISSN 0893-8512.

93. GÉRARD, Ph. The crosstalk between the gut microbiota and lipids. In: *OCL. Microbiota, nutrition and lipids: consequences on health*. 2020, nr. 27 (2020), p. 70. doi: org/10.1051/ocl/2020070. ISSN 2272-6977.

94. GEWOLB, I.H., SCHWALBE, R.S., TACIAK, V.L., HARRISON, T.S., PANIGRAHI, P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. In: *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1999, nr. 80, pp. F167-173. ISSN 1359-2998.

95. GIBSON, G.R., HUTKINS, R., SANDERS, M.E. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. In: *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017, nr. 14, pp. 491-502. ISSN 1759-5045.

96. GIBSON, G.R., ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. In: *J Nutr*. 1995, nr. 125(6), pp.1401-12. doi: 10.1093/jn/125.6.1401. ISSN 0022-3166.

97. GILL, S.R., POP, M., DEBOY, R.T. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. In: *Science.* 2006, nr. 312(5778), pp. 1355-1359. ISSN 0036-8075.

98. GILMORE, M., CLEWELL, D., COURVALIN, P., DUNNY, G. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance.* Murray, B.E., Rice, L.B., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2002. 439 p. ISBN-10 1555812341. ISBN-13 978-1555812348.

99. GILMORE, M.S., CLEWELL, D.B., IKE, Y., SHANKAR, N. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 2014. Disponibil: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24649510/ [citat: 05.06.2023]

100. GIN, A.S., ZHANEL, G.G. Vancomycin-resistant enterococci. In: *Ann Pharmacother*. 1996, nr. 30(6), pp. 615-24. doi: 10.1177/106002809603000610. ISSN 1060-0280.

101. GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. In: *Int. J. Food Microbiol.* 2003, nr. 88, pp. 215-222. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00183-1. ISSN 0168-1605.

102. GOLBAN, R. *Microbiologie generală: Îndrumări metodice de laborator*. Chișinău: Tehnica-UTM, 2023. 66 p. ISBN 978-9975-45-915-0.

103. GOMES, A.C., HOFFMANN, C., MOTA, J.F. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. In: *Gut Microbes*. 2018, nr. 9(4), pp. 308-325. doi: 10.1080/19490976.2018.1465157. ISSN 1949-0976.

104. GOODRICH, J.K., DAVENPORT, E.R., BEAUMONT, M. et al. Genetic determinants of the gut microbiome in UK twins. In: *Cell Host Microbe.* 2016, nr. 19, pp. 731-743. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.017. ISSN 1931-3128.

105. GORBACH, S.L., Microbiology of the Gastrointestinal Tract. In: *Medical Microbiology.* Baron S, editor. 4th edition. 1996. [online]. pp.1-7. Disponibil: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7670/ [citat 23.04.2024].

106. GOST 30518-1997 Food products. Methods for detection and quantity determination of coliformes - Std. & Spec. [online]. [citat 27.04.2024]. Disponibil: https://orochem.org/416478.html.

107. GREENBERG, E.P. Bacterial communication and group behavior. In: *J Clin Invest.* 2003, nr. 112(9), pp. 1288-1290. ISSN 0021-9738.

108. GRIFFITHS, S.M., HARRISON, X.A., WELDON, C., WOOD, M.D., PRETORIUS, A., HOPKINS, K., FOX, G., PREZIOSI, R.F., ANTWIS, R.E. Genetic variability and ontogeny predict microbiome structure in a disease-challenged montane amphibian. In: *ISME J*. 2018, nr. 12(10), pp. 2506-2517. doi: 10.1038/s41396-018-0167-0. ISSN 1751-7362.

109. GUZMAN, P.A.M., VAN SCHAIK, W., ROGERS, M.R. et al. Global emergence and dissemination of Enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the clones? In: *Front Microbiol*. 2016, nr. 7, p. 788. doi: 10.3389/fmicb.2016.00788. ISSN 1664-302X.

110. HAMILTON, M.K., BOUDRY, G., LEMAY, D.G., RAYBOULD, H.E. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2015, nr. 308, pp. G840-G851. doi: 10.1152/ajpgi.00029.2015. ISSN 0193-1857.

111. HAMMAMI, R., FERNANDEZ, B., LACROIX, C., AND FLISS, I. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. In. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013, nr. 70, pp. 2947-2967. doi: 10.1007/s00018-012-1202-3. ISSN 1420-682X.

112. HAMMERUM, A.M. Enterococci of animal origin and their significance for public health. In: *Clin Microbiol Infect*. 2012, nr. 18(7), pp. 619-25. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03829 x. ISSN 1198-743X.

113. HANCHI, H., MOTTAWEA, W., SEBEI, K., HAMMAMI, R. The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns-an update. In: *Front Microbiol.* 2018, nr. 9, p.1791. doi: 10.3389/fmicb.2018.01791. ISSN 1664-302X.

114.HAYASHI, H., TAKAHASHI, R., NISHI, T., SAKAMOTO, M., BENNO, Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. In: *Journal of Medical Microbiology*, 2005, nr. 54(11), pp. 1093-1101. ISSN 0022-2615.

115. HE, Y., XU, X., ZHANG, F., XU, D., LIU, Z., TAO, X., WEI, H. Anti-adhesion of probiotic *Enterococcus* faecium WEFA23 against five pathogens and the beneficial effect of its S-layer proteins against Listeria monocytogenes. In: *Can J Microbiol*. 2019, nr. 65(3), pp. 175-184. doi: 10.1139/cjm-2018-0031. ISSN 0008-4166.

116. HENKE, J.M., BASSLER, B.L. Bacterial social engagements. In: *Trends Cell Biol.* 2004, nr. 14(11), 648-656. ISSN 0962-8924.

117. HIDRON, A.I., EDWARDS, J.R., PATEL J., HORAN, T.C., SIEVERT, D.M., POLLOCK, D.A., FRIDKIN, S.K. NHSN. Annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. In: *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008, nr. 29, pp. 996-1011. http://dx.doi.org/10.1086/591861 ISSN 0899-823X.

118. HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G.R., MERENSTEIN, D. J., POT, B. et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. In: *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014, nr. 11, pp. 506-514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66. ISSN 1759-5045.

119. HOLLISTER, E.B., RIEHLE, K., LUNA, R.A. et al. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. In: *Microbiome*. 2015, nr. 3, p. 36. doi: 10.1186/s40168-015-0101-x. ISSN 2755-1652.

120. HOMANN, C.M., ROSSEL, C.A.J., DIZZELL, S. et al. Infants' first solid foods: Impact on gut microbiota development in two intercontinental cohorts. In: *Nutrients*. 2021, nr. 13(8), p. 2639. doi: 10.3390/nu13082639. ISSN 2072-6643.

121. HOOPER, L.V., MIDTVEDT, T., GORDON, J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. In: *Annu Rev Nutr.* 2002, nr. 22, pp. 283-307. ISSN 0199-9885.

122. HORSLEY, A.R., DAVIES, J.C., GRAY, R.D. et al. Changes in physiological, functional and structural markers of cystic fibrosis lung disease with treatment of a pulmonary exacerbation. In: *Thorax*. 2013, nr. 68(6), pp. 532-9. doi: 10.1136/thoraxjnl-2012-202538. ISSN·0040-6376.

123. HOUGHTELING, P.D., WALKER, W.A. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? In: *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015, nr. 60(3), pp. 294-307. doi: 10.1097/MPG.0000000000000597. ISSN 0277-2116.

124. HSIAO, W.W., METZ, C., SINGH, D.P., ROTH, J. The microbes of the intestine: an introduction to their metabolic and signaling capabilities. In: *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008, nr. 37(4), pp. 857-871. doi: 10.1016/j.ecl.2008.08.006. ISSN 0889-8529.

125. HUANG, L., LUO, L., ZHANG, Y., WANG. Z., XIA, Z. Effects of the dietary probiotic, *Enterococcus faecium* NCIMB11181, on the intestinal barrier and system immune status in *Escherichia coli* O78-Challenged Broiler Chickens. In: *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019, nr. 11(3), pp. 946-956. doi: 10.1007/s12602-018-9434-7. ISSN 1867-1306.

126. HUANG, S., RONG, X., LIU, M. et al. Intestinal mucosal immunity-mediated modulation of the gut microbiome by oral delivery of *Enterococcus faecium* against *Salmonella Enteritidis* pathogenesis in a laying hen model. In: *Front Immunol*. 2022, nr. 13, p. 853954. doi: 10.3389/fimmu.2022.853954. ISSN 1664-3224.

127. HUTTENHOWER, C., GEVERS, D., KNIGHT, R. The human microbiome project consortium. structure, function and diversity of the healthy human microbiome. In: *Nature.* 2012, nr. 486, pp. 207-214. ISSN 1476-4687.

128. HUUS, K.E,. HOANG, T.T., CREUS-CUADROS, A. et al. Cross-feeding between intestinal pathobionts promotes their overgrowth during undernutrition. In: *Nat Commun*. 2021, nr. 12(1), p. 6860. doi: 10.1038/s41467-021-27191-x. ISSN 2041-1723.

129. IDDRISU, I., MONTEAGUDO-MERA, A., POVEDA, C. et al. Malnutrition and gut microbiota in children. In: *Nutrients.* 2021, nr. 13(8), p. 2727. doi: 10.3390/nu13082727. ISSN 2072-6643.

130. IM, E.J., LEE, H.H, KIM, M., KIM, M.K. Evaluation of Enterococcal Probiotic Usage and Review of Potential Health Benefits, Safety, and Risk of Antibiotic-Resistant Strain Emergence. In: *Antibiotics (Basel).* 2023, nr. 12(8), p. 1327. doi: 10.3390/antibiotics12081327. ISSN 2079-6382.

131.*Improving the quality of health care for mental and substance-use conditions*. Institute of Medicine (US) Committee on Crossing the Quality Chasm: Adaptation to Mental Health and Addictive Disorders. Washington (DC): National Academies Press (US), 2006. [online] Disponibil: *https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19830/* [citat 23.04.2024]. ISBN-10 0-309-10044-5.

132. ISAEV, V.V., BLOHIN, A.A., BUROVA, O.A., HRISANFOVA, T.D. Prevention of gastrointestinal diseases in calves. In: *Materials of the International Scientific and Practical Conference dedicated to the 40th anniversary of GNU VNIVIPFiT*. 2010, pp. 32-34.

133. JAHAN, M., ZHANEL, G.G., SPARLING, R., HOLLEY, R.A. Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of E. faecium and *Enterococcus faecalis*. In: *Int. J. Food Microbiol.* 2015, nr. 199, pp. 78-85. ISSN 0168-1605.

134. JANDHYALA, S.M., TALUKDAR, R., SUBRAMANYAM, C., VUYYURU, H., SASIKALA, M., NAGESHWAR, REDDY, D. Role of the normal gut microbiota. In: *World J Gastroenterol.* 2015, nr. 21(29), pp. 8787-803. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787. ISSN 1007-9327.

135. JAWAHAR, J., MCCUMBER, A.W., LICKWAR, C.R. et al. Starvation causes changes in the intestinal transcriptome and microbiome that are reversed upon refeeding. In: *BMC Genomics.* 2022, nr. 23, p. 225. doi:org/10.1186/s12864-022-08447-2. ISSN 1471-2164.

136. JEFFERY, I.B., O'TOOLE, P.W. Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living. In: *Nutrients*. 2013, nr. 5(1), pp. 234-252. ISSN 2072-6643.

137. JETT, B.D., HUYCKE, M.M., GILMORE M.S. Virulence of enterococci. In: *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, nr. 7, pp. 462-478. ISSN 0893-8512.

138. JIANG, L., FENG, C., TAO, S., LI, N., HAN, D., WANG, J. Maternal imprinting of the neonatal microbiota colonization in intrauterine growth restricted piglets: a review. In: *J Animal Sci Biotechnol.*, 2019, nr. 10, pp. 88. doi: 10.1186/s40104-019-0397-7. ISSN1674-9782.

139. JIN, L.Z., MARQUARDT, R.R., ZHAO, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. In: *Appl Environ Microbiol*. 2000, nr. 66(10), 4200-4204. doi: 10.1128/AEM.66.10.4200-4204.2000. ISSN 0099-2240.

140. JOHN, G.K,. MULLIN, G.E. The gut microbiome and obesity. In: *Curr Oncol Rep.* 2016, nr. 18, p. 45. doi: 10.1007/s11912-016-0528-7. ISSN: 1523-3790.

141.JUNG, A., METZNER, M., RYLL, M. Comparison of pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus cecorum* strains from different animal species. In: *BMC Microbiol*. 2017, nr. 17(1), p. 33. doi: org/10.1186/s12866-017-0949-y. ISSN 1471-2180.

142. KASIMIN, M.E, SHAMSUDDIN, S., MOLUJIN, A.M., SABULLAH, M.K., GANSAU, J.A., JAWAN, R. Enterocin: promising biopreservative produced by *Enterococcus* sp. In: *Microorganisms.* 2022, nr. 10(4) p. 684. doi: 10.3390/microorganisms10040684. ISSN 2076-2607.

143. KAU, A., AHERN, P., GRIFFIN, N., GOODMAN, A., GORDON, J. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. In: *Nature.* 2011, nr. 474, pp. 327-336. ISSN 1476-4687.

144. KEVANS, D., TURPIN, W., MADSEN, K., MEDDINGS, J., SHESTOPALOFF, K., XU, W., MORENO-HAGELSIEB, G., GRIFFITHS. A., SILVERBERG, M.S., PATERSON, A., CROITORU, K. GEM Project. Determinants of intestinal permeability in healthy first-degree relatives of individuals with Crohn's disease. In: *Inflamm Bowel Dis.* 2015, nr. 21(4), pp. 879-87. doi: 10.1097/MIB.0000000000000323. ISSN 1078-0998.

145. KHALEDI, M., POURESLAMFAR, B., ALSAAB, H.O. et al. The role of gut microbiota in human metabolism and inflammatory diseases: a focus on elderly individuals. In: *Ann Microbiol.* 2024, nr.74, p. 1. doi: org/10.1186/s13213-023-01744-5. ISSN 1590-4261.

146. KHANNA, S., TOSH, P.K. A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease. In: *Mayo Clin Proc*. 2014, nr. 89(1), pp. 107-14. doi: 10.1016/j.mayocp.2013.10.011. ISSN 0025-6196.

147. KIM, C. S., CLAUD, E. C. Necrotizing enterocolitis pathophysiology: how microbiome data alter our understanding. In: *Clin. Perinatol.* 2019, 46 (1), pp. 29-38. doi: 10.1016/j.clp.2018.10.003. ISSN 0095-5108.

148.KIM, G.H., SHIM, J.O. Gut microbiota affects brain development and behavior. In: *Clin Exp Pediatr.* 2023, nr. 66(7), pp. 274-280. doi: 10.3345/cep.2021.01550. ISSN 2713-4148.

149. KOGUT, M.H., ARSENAULT, R.J. Editorial: Gut health: The new paradigm in food animal production. In: *Front Vet Sci*. 2016, nr. 3, pp. 71. doi:10.3389/fvets.2016.00071. ISSN 2297-1769.

150. KONG, C., GAO, R., YAN, X., HUANG, L., QIN, H. Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. In: *Nutrition.* 2019, nr. 60, pp. 175-184. doi: 10.1016/j.nut.2018.10.002. ISSN 1873-1244.

151.KOUTSOUMANIS, K., ALLENDE, A., ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 11: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2019. In: *EFSA J.* 2020, nr. 18, p. 5965. ISSN 1868-596X.

152. KRAWCZYK, B., WITYK, P., GAŁĘCKA, M., MICHALIK, M. The many faces of *Enterococcus* spp.– commensal, probiotic and opportunistic pathogen. In: *Microorganisms*. 2021, nr. 9(9), p. 1900. doi.org/10.3390/microorganisms9091900. ISSN 2076-2607

153. KUANG, YS., LI, SH., GUO, Y. et al. Composition of gut microbiota in infants in China and global comparison. In: *Sci Rep.* 2016, nr.6, p. 36666. doi: 10.1038/srep36666. ISSN 2045-2322.

154. KUDSK, K.A., STONE, J.M., CARPENTER G., SHELDON, G.F. Enteral and parenteral feeding influences mortality after hemoglobin-e. coli peritonitis in normal rats. In: *J Trauma.* 1983, nr. 23, pp. 605-609. doi: 10.1097/00005373-198307000-00010. ISSN: 2287-1683

155. LAFOREST-LAPOINTE, I., ARRIETA, M.C. Patterns of early-life gut microbial colonization during human immune development: An ecological perspective. In: *Front Immunol.* 2017, nr. 8, p. 788. doi: 10.3389/fimmu.2017.00788. ISSN 1664-3224.

156. LAISSUE, J.A., CHAPPUIS, B.B., MÜLLER, C., REUBI, J.C., GEBBERS, J.O. The intestinal immune system and its relation to disease. In: *Dig.Dis.* 1993, nr. 11, pp. 298-312. doi: 10.1159/000171421. ISSN 0257-2753.

157. LAM, Y.Y., MAGUIRE, S., PALACIOS, T., CATERSON, I.D. Are the gut bacteria telling us to eat or not to eat? reviewing the role of gut microbiota in the etiology, disease progression and treatment of eating disorders. In: *Nutrients.* 2017, nr. 9(6), p. 602. doi: 10.3390/nu9060602. ISSN 2072-6643.

158. LAURSEN, M.F., LARSSON, M.W., LIND, M.V. et al. Intestinal *Enterococcus* abundance correlates inversely with excessive weight gain and increased plasma leptin in breastfed infants. In: *FEMS Microbiol Ecol.* 2020, nr. 96(5), p. fiaa066. doi: 10.1093/femsec/fiaa066. ISSN 0168-6496.

159. LEBRETON, F., WILLEMS, R.J.L., GILMORE M.S. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [online]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. Disponibil: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/. [citat: 25.01.2023]

160. LEDERBERG, J. Infectious history. In: *Science.* 2000, nr. 288(5464), pp. 287-93. doi: 10.1126/science.288.5464.287. ISSN 0036-8075.

161. LEE, I.K., KYE, Y.C., KIM, G., KIM, H.W., GU, M.J., UMBOH, J., MAARUF, K., KIM, S.W., YUN, C.H. Stress, nutrition, and intestinal immune responses in pigs - A Review. In: *Asian-Australas J Anim Sci*. 2016, nr. 29(8), pp.1075-1082. doi: 10.5713/ajas. ISSN 10112367.

162. LEEMING, E.R., JOHNSON, A.J., SPECTOR, T.D., LE ROY, C.I. Effect of diet on the gut microbiota: rethinking intervention duration. In: *Nutrients.* 2019, nr. 22, 11(12), p. 2862. doi: 10.3390/nu11122862). ISSN 2072-6643.

163. LEY, R., PETERSON, D., GORDON, J. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. In: *Cell.* 2006, nr. 124, pp. 837-838; ISSN 1674-800X.

164. LEY, R.E. Obesity and the human microbiome. In: *Curr Opin Gastroenterol*. 2010, nr. 26(1), pp. 5-11. doi: 10.1097/MOG.0b013e328333d751. ISSN 0267-1379.

165. LEY, R.E., TURNBAUGH, P.J., KLEIN, S., GORDON, J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. In: *Nature.* 2006, nr. 444(7122), pp. 1022-1023. doi: 10.1038/4441022a. ISSN 1476-4687.

166. LI, G, YANG, M, ZHOU, K. et al. Diversity of duodenal and rectal microbiota in biopsy tissues and luminal contents in healthy volunteers. In: *J Microbiol Biotechnol*. 2015, nr. 25(7), pp. 1136-1145. doi: 10.4014/jmb.1412.12047. ISSN 1017-7825.

167. LI, J.; JIA, H.; CAI, X.; ZHONG, H.; FENG, Q.; SUNAGAWA, S.; ARUMUGAM, M.; KULTIMA, J.R.; PRIFTI, E.; NIELSEN, T.; et al. An integrated catalgof reference genes in the human gut microbiome. In: *Nat. Biotechnol.* 2014, nr. 32, pp. 834-841. ISSN 1087-0156.

168. LI, N., ZUO, B., HUANG, S. *et al.* Spatial heterogeneity of bacterial colonization across different gut segments following inter-species microbiota transplantation. In: *Microbiome*, 2020, nr. 8(161), pp. 1-24. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00917-7. ISSN 2755-1652.

169. LI, X.X., WONG, G.L., TO, K.F. et al. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. In*: PLoS One*. 2009, nr. 4, pp. e7985-e7985. ISSN 1932-620.

170. LIN, L., ZHANG, J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. In: *BMC Immunol*, 2017, nr.18, p. 2. doi: org/10.1186/s12865-016-0187-3.

171.LING, Z., LIU, X., CHENG, Y., YAN, X., WU, S. Gut microbiota and aging. In: *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022, nr. 62(13), pp. 3509-3534. ISSN 1549-7852.

172.LIU, J., TAN, Y., CHENG, H., ZHANG, D., FENG, W., PENG, C. Functions of gut microbiota metabolites, current status and future perspectives. In: *Aging Dis*. 2022, nr. 13(4), pp. 1106-1126. doi: 10.14336/AD.2022.0104. ISSN 2152-5250.

173. LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H., WHITMAN, W.B. Revised road map to the phylum Firmicutes. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* De Vos, P., et al. Eds., 2nd Edition, The Firmicutes, SpringerVerlag, New York, 2009, nr. 3, 117 p. ISBN 978-0-387-95041-9.

174. LYTE, M. Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: How bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. In: *PLoS Pathog*. 2013, nr. 9(11), p. e1003726. doi: 10.1371/journal.ppat.1003726. ISSN 1553-7366.

175.LYTE, M., FODOR, A.A., CHAPMAN, C.D., MARTIN, G.C., PEREZ-CHANONA, E., JOBIN, C., DESS, N.K. Gut microbiota and a selectively bred taste phenotype: A novel model of microbiome-behavior relationships. In: *Psychosomatic Medicine*. 2016, nr. 78. pp. 610-619. ISSN 0033-3174.

176.MACCHIA, V., BATES, R.W., PASTAN, I. The purification and properties of a thyroid-stimulating factor isolated from Clostridium perfringens. In: *J Biol Chem.* 1967, nr. 242(16), pp. 3726-3730. ISSN 0021-9258.

177. MACK, I., PENDERS, J., COOK, J., DUGMORE, J,. MAZURAK, N., ENCK, P. Is the impact of starvation on the gut microbiota specific or unspecific to anorexia nervosa? A narrative review based on a systematic literature search. In: *Curr Neuropharmacol.* 2018, nr. 16(8), pp. 1131-1149. doi: 10.2174/1570159X16666180118101354. ISSN 1875-6190.

178. MACKIE, R.I., SGHIR, A., GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. In: *Am J Clin Nutr.* 1999, nr. 69(5), pp. 1035-1045. ISSN 1938-3207.

179. MACPHERSON, A.J., SLACK, E., GEUKING, M.B., MCCOY, K.D. The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. In: *Semin. Immunopathol*. 2009, nr. 31, pp. 145-149. ISSN 1863-2297.

180. MANGIOLA, F., IANIRO, G., FRANCESCHI, F., FAGIUOLI, S., GASBARRINI, G., GASBARRINI, A. Gut microbiota in autism and mood disorders. In: *World J Gastroenterol*. 2016, nr. 22(1), pp. 361-8. doi: 10.3748/wjg.v22.i1.361. ISSN 1007-9327.

181. MARTIN, AJM., SEREBRINSKY-DUEK, K., RIQUELME, E., SAA, PA., GARRIDO, D. Microbial interactions and the homeostasis of the gut microbiome: the role of *Bifidobacterium*. In: *Microbiome Res Rep.* 2023, nr. 2, p. 17. doi: 10.20517/mrr.2023.10. ISSN(s) 2771-5965.

182. MATSUMOTO, Y., ISHII, M., HASEGAWA, S. et al. *Enterococcus faecalis* YM0831 suppresses sucrose-induced hyperglycemia in a silkworm model and in humans. In: *Commun Bio.* 2019, nr. 2, p. 157. doi: org/10.1038/s42003-019-0407-5. ISSN 2399-3642.

183. MCBURNEY, M.I. DAVIS, C., FRASER, C.M. et al. Establishing what constitutes a healthy human gut microbiome: state of the science, regulatory considerations, and future directions. In: *J Nutr.* 2019, nr. 149(11), pp. 1882-1895. doi: 10.1093/jn/nxz154. ISSN 0022-3166.

184. MCHUGH, C.P., ZHANG, P., MICHALEK, S., ELEAZER, P.D. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. In: *J Endod*. 2004, nr. (4), pp. 218-9. doi: 10.1097/00004770-200404000-00008. ISSN 0099-2399.

185. MIKA, A., TREUREN, W.V., GONZÁLEZ, A., HERRERA, J.J., KNIGHT, R., FLESHNE, M. Exercise is more effective at altering gut microbial composition and producing stable changes in lean mass in juvenile versus adult male F344 rats. In: *PLoS ONE.* 2015, nr. 10, p. e0125889. doi: 10.1371/journal.pone.0125889MetS. ISSN1932-6203.

186. MILLER, W.R., MURRAY, B.E., RICE, L.B., ARIAS, C.A. Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century. In: *Infect Dis Clin North Am.* 2016, nr. 30(2), pp. 415-439. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.006. ISSN 0891-5520.

187. *Minimum criteria for probiotics: ISAPP perspectives*. Sacramento, CA: International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. [online] 2018. Disponibil: https://isappscience.org/minimum-criteria-probiotics/ (citat: 24.02.2023)

188. MOHAMED ELASHIRY, M., TIAN, F., ELASHIRY, M., ZEITOUN, R., ELSAYED, R., ANDREWS, M.L., BERGEON, B.E., CUTLER, C., TAY, F. *Enterococcus faecalis* shifts macrophage polarization toward M1-like phenotype with an altered cytokine profile. In: *J Oral Microbiol.* 2021, nr. 13(1), p.1868152. doi: 10.1080/20002297.2020.1868152. ISSN 0902-0055.

189. MONTEAGUDO-MERA, A., RASTALL, R.A., GIBSON, G.R., CHARALAMPOPOULOS, D., CHATZIFRAGKOU, A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. In: *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019, nr. 103(16), pp. 6463-6472. doi:10.1007/s00253-019-09978-7). ISSN 0175-7598.

190. MONTEALEGRE, M.C., SINGH, K.V., AND MURRAY, B.E. Gastrointestinal tract colonization dynamics by different *Enterococcus faecium* clades. In: *J. Infect. Dis.* 2016, nr. 213, pp. 1914-1922. doi: 10.1093/infdis/jiv597. ISSN 0022-1899.

191. MONTEALEGRE, M.C., TEDIM, A.P., RUIZ-GARBAJOSA, P. et al. Population biology of intestinal *Enterococcus* isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in

different age groups. In: *Appl Environ Microbiol*. 2015, nr. 81(5), pp. 1820-1831. doi: 10.1128/AEM.03661-14. ISSN 0099-2240.

192. MONTICELLI, J., KNEZEVICH, A., LUZZATI, R., DI BELLA, S. Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens*. In: *J Infect Chemother*. 2018, nr. 24(4), pp. 237-246. doi: 10.1016/j.jiac.2018.01.001. ISSN 1341-321X.

193. MORA-FLORES, L.P., MORENO-TERRAZAS C.R., FUENTES-CABRERA, J. et al. The role of carbohydrate intake on the gut microbiome: A weight of evidence systematic review. In: *Microorganisms*. 2023, nr. 1(7), p. 1728. doi: 10.3390/microorganisms11071728. ISSN 2076-2607

194. MOUSAVI, S.M., EJTAHED, HS., MALMIR, H. et al. The effect of "moderately restricted carbohydrate" diet on gut microbiota composition and metabolic parameters in women with metabolic syndrome: a study protocol for a randomized controlled trial. In: *Trials*. 2022, nr. 23, p. 959. doi:org/10.1186/s13063-022-06922-5. ISSN 1745-6215.

195. MU, C., YANG, Y., LUO, Z., ZHU, W. Temporal microbiota changes of high-protein diet intake in a rat model. In: *Anaerobe.* 2017, nr. 47, pp. 218-225. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.06.003. ISSN 1095-8274.

196.MUNDT, J.O. Enterococci. In: *J. G. Holt, P. H. Sneath, & N. R. Krieg, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.1986, vol. 2, pp. 1063-1065. ISBN-10 0683078933.

197. MURPHY, E.F., COTTER, P.D., HEALY, S., MARQUES, T.M., O'SULLIVAN, O., FOUHY, F., CLARKE, S.F., O'TOOLE, P.W., QUIGLEY, E.M., STANTON, C., ROSS, P.R., O'DOHERTY, R.M., SHANAHAN, F. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. In: *Gut*. 2010, nr. 59(12), pp. 1635-42. doi: 10.1136/gut.2010.215665. ISSN 0017-5749.

198.MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. *Janeway's immunobiology.* 7th. New York: Garland Science, 2008. 887 p. ISBN 0815341237.

199. MURRAY, BE. The life and times of the *Enterococcus*. In: *Clin Microbiol Rev.* 1990, nr. 3(1), pp. 46-65. doi: 10.1128/CMR.3.1.46. ISSN 0893-8512.

200. NAGPAL, R., TSUJI, H., TAKAHASHI, T. et al. Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: A quantitative bird's-eye view. In: *Front Microbiol*. 2017, nr. 8, p. 1388. doi: 10.3389/fmicb.2017.01388. ISSN 1664-302X.

201. NAGPAL, R., YAMASHIRO, Y. Gut microbiota composition in healthy japanese infants and young adults born by c-section. In: *Ann Nutr Metab*. 2018, nr.73, Suppl 3, pp. 4-11. doi: 10.1159/000490841. ISSN 0250-6807.

202. NAKKARACH, A., FOO, H.L., SONG, A.A.-L., MUTALIB, N.E.A., NITISINPRASERT, S., WITHAYAGIAT, U. Anti-cancer and anti-inflammatory effects elicited by short chain fatty acids produced by escherichia coli isolated from healthy human gut microbiota. In: *Microb. Cell Fact*. 2021, nr. 20(36), pp.1-17. doi: 10.1186/s12934-020-01477-z. ISSN 1475-2859.

203. NALAWADE, T.M., BHAT, K.G., SOGI, S. Antimicrobian activity of endodontic medicaments and vehicles using agar well diffusion method on facultatative and obligate anaerobes. In: *Int J Clin Pediatr Dent.* 2016, nr. 9(4), pp. 335-341. ISSN 0974-7052.

204. NICHOLSON, J.K., HOLMES, E., WILSON, I.D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. In: *Nat Rev Microbiol.* 2005, nr. 3(5), pp. 431-438. ISSN 1740-1526.

205. NILSSON, O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals - occurrence and importance. In: *Infect Ecol Epidemiol*. 2012, nr. 2, pp. 1-8. doi: 10.3402/iee.v2i0.16959. ISSN 2000-8686.

206. NISHIYAMA, K., SUGIYAMA, M., MUKAI, T. Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin. In: *Microorganisms.* 2016, nr. 4(3), p. 34. doi: 10.3390/microorganisms4030034 ISSN 2076-2607.

207. NOBLE, E.E., HSU, T.M., JONES, R.B., FODOR, A.A., GORAN, M.I., KANOSKI, S.E. Early-life sugar consumption affects the rat microbiome independently of obesity. In: *J Nutr*. 2016, nr. 147, pp. 20-28. doi:10.3945/jn.116.238816. ISSN 0022-3166.

208. NOVAIS, C., COQUE, T.M., SOUSA, J.C., PEIXE, L.V. Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal. In: *Clin. Microbiol. Infect*. 2006, nr. 12, pp. 1131-1134. ISSN 1198-743X.

209. NOVAIS, C., FREITAS, A.R., SOUSA, J.C., BAQUERO, F., COQUE, T.M., PEIXE, L.V. Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, nr. 52, pp.1001-1008. ISSN 0066-4804.

210. NOVAKOVIC, M., ROUT, A., KINGSLEY, T., KIRCHOFF, R., SINGH A., VERMA, V., KANT, R., CHAUDHARY, R. Role of gut microbiota in cardiovascular diseases. In: *World J Cardiol.* 2020, nr. 12(4), pp.110-122. doi: 10.4330/wjc.v12.i4.110. ISSN 19498462.

211. NOWAKIEWICZ, A., ZIÓŁKOWSKA, G., TROŚCIAŃCZYK, A., ZIĘBA, P., GNAT, S. Determination of resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains isolated from poultry and their genotypic characterization by ADSRRS-fingerprinting. In: *Poult. Sci.* 2017, nr. 96, pp. 986-996. ISSN 1525-3171.

212. O'DRISCOLL, T., CRANK, C.W. 2015. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. In: *Infect Drug Resist.* nr. 8, pp. 217-230. ISSN 1178-6973.

213. OGIER, J.C., SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. In: *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 126, pp. 291-301. ISSN 0168-1605.

214. PALMER, C., BIK, E.M., DIGIULIO, D.B, RELMAN, D.A., BROWN, P.O. Development of the human infant intestinal microbiota. In: *PloS Biol.* 2007, nr. 5(7), p. e177. doi: 10.1371/journal.pbio.0050177. ISSN 1544-9173.

215. PANTAZI, A.C., BALASA, A.L., MIHAI, C.M., CHISNOIU, T., LUPU, V.V., KASSIM, M.A.K., MIHAI, L., FRECUS, C.E., CHIRILA, S.I., LUPU, A., ANDRUSCA, A., IONESCU, C., CUZIC, V., CAMBREA, S.C. Development of gut microbiota in the first 1000 days after birth and potential interventions. In: *Nutrients.* 2023, nr. 15(16), p. 3647. doi: 10.3390/nu15163647. ISSN 2072-6643

216. PARK, H., YEO, S., ARELLANO, K., KIM, H. R., HOLZAPFEL, W. Role of the gut microbiota in health and chronic GI disease. In: *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*. Diana Di Gioia and Bruno Biavati Eds. Springer International Publishing. 2018. pp. 35-62. ISBN 978-3-319-71948-1.

217. PENDERS, J., THIJS, C., VINK, C., STELMA, F. F., SNIJDERS, B., KUMMELING, I., VAN DEN BRANDT, P. A. & STOBBERINGH, E. E. Factors influencing the composition of

the intestinal microbiota in early infancy. In: *Pediatrics*. 2006, nr. 118(2), pp. 511-521. doi: 10.1542/peds.2005-2824. PMID: 16882802. ISSN 0031-4005.

218. PIENIZ, S., ANDREAZZA, R., ANGHINONI, T., CAMARGO, F., BRANDELLI, A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. In: *Food Control.* 2014, nr. 37, pp. 251-256. ISSN 0956-7135.

219. PILLAY, S., ZISHIRI, O.T., ADELEKE, M.A. Prevalence of virulence genes in *Enterococcus* species isolated from companion animals and livestock. In: *Onderstepoort J Vet Res.* 2018, nr. 85(1), pp. e1-e8. doi: 10.4102/ojvr.v85i1.1583. ISSN 0030-2465.

220. PINKES, M.E., WHITE, C. & WONG, C.S. Native-valve *Enterococcus hirae* endocarditis: a case report and review of the literature. In: *BMC Infect Dis.* 2019, nr. 19(1), p. 891. doi: org/10.1186/s12879-019-4532-z. ISSN 147-2334.

221. PORTUNE, K.J., BEAUMONT, M., DAVILA, A., TOMÉ, D., BLACHIER, F., SANZ, Y. Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin. In: *Trends Food Sci. Technol.* 2016, nr. 57, pp. 213-232. doi: 10.1016/j.tifs.2016.08.011. ISSN 0924-2244.

222.*Practical Handbook of Microbiology.* Editors E. Goldman, L.H. Green, 2end Ed. 2009, 854 p. ISBN 978-0-8493-9365-5.

223. PREIDIS, GA, AJAMI, NJ, WONG, MC, BESSARD, BC, CONNER, ME, PETROSINO, JF. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015, nr. 26(10), pp. 1050-1057. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.04.010. ISSN 1873-4847.

224. ISAPP. *Probiotics in the Year 2018 - International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)* [online]. Disponibil: https://isappscience.org/probiotics-2018/ [citat 2024 Apr 23].

225. QIN, J., LI, R., RAES, J., ARUMUGAM, M., BURGDORF, K., MANICHANH, C. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. In: *Nature*. 2010, nr. 464, pp. 59-65. ISSN 2045-2322.

226. QIN, J., LI, Y., CAI, Z., LI, S., ZHU, J., ZHANG, F. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. In: *Nature.* 2012, nr. 490, pp. 55-60. ISSN 1476-4687.

227. RAGONNAUD, E., BIRAGYN, A. Gut microbiota as the key controllers of “healthy” aging of elderly people. In: *Immunity & Ageing*. 2021, nr. 18(2), p. 1-11. doi: org/10.1186/s12979-020-00213-w. ISSN 1742-4933.

228. RAMOS, S., SILVA, V., DAPKEVICIUS, M.L.E., IGREJAS, G., POETA, P. Enterococci, from harmless bacteria to a pathogen. In: *Microorganisms*. 2020, nr. 8(8), p.1118. doi: 10.3390/microorganisms8081118. ISSN 2076-2607.

229. RAMSEY, M., HARTKE, A., HUYCKE, M. The Physiology and metabolism of Enterococci. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 2014. [Internet]. [citat 23.04.2024]. disponibil: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190432/

230. REYES, K., BARDOSSY, A.C., ZERVOS, M. Vancomycin-resistant enterococci. Epidemiology, infection, prevention and control. In: *Infect. Dis Clin. N. Am.* 2016, nr. 30, pp. 953-965. doi: 10.1016/j.idc.2016.07.009. ISSN 0891-5520.

231. RICCIO, P., ROSSANO, R. The human gut microbiota is neither an organ nor a commensal. In: *FEBS Lett.* 2020, nr. 594, pp. 3262-3271. *doi: org/10.1002/1873-3468.13946.* ISSN 0014-5793.

232. RINGEL-KULKA, T., CHENG, J., RINGEL, Y., SALOJÄRVI, J., CARROLL, I., PALVA, A., DE VOS, W.M., SATOKARI, R. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults--a high throughput microarray analysis. In: *PLoS One.* 2013, nr. 8(5), p. e64315. doi: 10.1371/journal.pone.0064315. ISSN 1932-6203.

233. ROBERTS, D.J. Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract. In: *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 2000, nr. 219, pp. 109-120. ISSN 1673-5374.

234.RODRÍGUEZ, J.M., MURPHY, K., STANTON, C. et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. In: *Microb Ecol Health Dis.* 2015, nr. 26, p. 26050. doi: 10.3402/mehd.v26.26050. ISSN 1651-2235.

235. ROHR, M.W., NARASIMHULU, C.A., RUDESKI-ROHR, T.A., PARTHASARATHY, S. Negative effects of a high-fat diet on intestinal permeability: A Review. In: *Adv Nutr*. 2020, nr. 11(1), pp. 77-91. doi: 10.1093/advances/nmz061. ISSN 2156-5376.

236. ROSSI, E., CIMDINS, A., LÜTHJE, P., BRAUNER, A., SJÖLING, A., LANDINI, P., RÖMLING, U. „It's a gut feeling" - *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. In: *Crit Rev Microbiol*. 2018, nr. 44(1), pp. 1-30. doi: 10.1080/1040841X.2017.1303660. ISSN 1040-841X.

237. ROTH, J., LEROITH, D., LESNIAK, M.A. et al. Molecules of intercellular communication in vertebrates, invertebrates and microbes: do they share common origins? In: *Prog Brain Res.* 1986, nr. 68, pp. 71-79. ISSN 0079-6123.

238. ROTH, J., QIANG, X., LIOTTA, A.S. et al. *Gut bacterium releases endogenous 33AA peptide that mimics alpha-MSH in activating melanocortin receptors of macrophages and neurons.* Paper presented at: Endocrine Society's 90th Annual Meeting; San Francisco. 2008.

239. ROVIRA, J., MELERO, B. Protective cultures for the safety of animal-derived foods. In: *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*. Gioia D.D., Biavati B. Eds. Springer International Publishing, 2018, pp. 63-107. ISBN 978-3-319-71948-1.

240. ROWAN-NASH, A.D., KORRY, B.J., MYLONAKIS, E., BELENKY, P. Cross-domain and viral interactions in the microbiome. In: *Microbiol Mol Biol Rev*. 2019, nr. 83(1), pp. 44-18. doi: 10.1128/MMBR.00044-18. ISSN 1092-2172.

241. ROWLAND I, GIBSON G, HEINKEN A, SCOTT K, SWANN J, THIELE I, TUOHY K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. In: *Eur J Nutr*. 2018, nr. 57(1), pp.1-24. doi: 10.1007/s00394-017-1445-8. ISSN 0022-316.

242. RUIGROK RAAA, WEERSMA RK, VICH VILA A. The emerging role of the small intestinal microbiota in human health and disease. In: *Gut Microbes*. 2023, nr. 15(1), p. 2201155. doi: 10.1080/19490976.2023.2201155. ISSN 1949-0976.

243. RUIZ-GARBAJOSA, P., CANTÓN, R., PINTADO, V. et al. Genetic and phenotypic differences among *Enterococcus faecalis* clones from intestinal colonisation and invasive disease. In. *Clin Microbiol Infect*. 2006, nr. 12, pp. 1193-1198. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01533.x ISSN 1198-743X.

244. RUSCH, K., RUSCH, V. *Mikrobiologische Therapie Grundlagen und Praxis*. Georg Thieme Verlag: New York, NY, USA, 2001. ISBN 13 9783830471219.

245. RUTHERFORD, S.T., BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. In: *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012, nr. 2(11), p. a012427. doi: 10.1101/cshperspect.a012427. ISSN 2157-1422.

246. RŮŽIČKOVÁ, M., VÍTĚZOVÁ, M., KUSHKEVYCH, I. The Characterization of *Enterococcus* genus: Resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. In: *Open Med (Wars)*. 2020, nr. 15, pp. 211-224. doi: 10.1515/med-2020-0032. ISSN 1895-1058.

247. RYAN, K.J., RAY, C.G. *Sherris Medical Microbiology*. International Edition, 6th Edition. Publisher: McGraw-Hill Professional. 2014. 994 p. ISBN-13 9781259255182.

248. SAAVEDRA, J.M. Clinical applications of probiotic agents. In: *Am J Clin Nutr*. 2001, nr. 73(6), pp. 1147S-1151S. doi: 10.1093/ajcn/73.6.1147S. ISSN 1938-3207.

249. SADEGHPOUR HERAVI, F., HU, H. *Bifidobacterium*: Host-microbiome interaction and mechanism of action in preventing common gut-microbiota-associated complications in preterm infants: A narrative review. In: *Nutrients.* 2023, nr. 15, p. 709. *doi: 10.3390/nu15030709*. ISSN 2072-6643.

250. SAILLANT, V., LIPUMA, D., OSTYN, E., JOUBERT, L., BOUSSAC, A., GUERIN, H., BRANDELET, G., ARNOUX, P., LECHARDEUR, D.A. A novel *Enterococcus faecalis* heme transport regulator (FhtR) senses host heme to control its intracellular homeostasis. In: *mBio.* 2021, nr. 12(1), pp. e03392-20. doi: 10.1128/mBio.03392-20. ISSN 2161-2129.

251. SAMEER, A.S., NISSAR, S. Toll-Like receptors (TLRs): Structure, functions, signaling, and role of their polymorphisms in colorectal cancer susceptibility. In: *Biomed Res Int*. 2021, nr. 2021, p. 1157023. doi: 10.1155/2021/1157023. ISSN 2314-6141.

252. SAMET, A., ŚLEDZIŃSKA, A., KRAWCZYK, B., HELLMANN, A., NOWICKI, S., KUR, J., NOWICKI, B. Leukemia and risk of recurrent *Escherichia coli* bacteremia: Genotyping implicates E. Coli translocation from the colon to the bloodstream. In: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, nr. 32, pp.1393–1400. doi: 10.1007/s10096-013-1886-9. ISSN 0934-9723.

253. SANDERS, M.E., AKKERMANS, L.M.A., HALLER, D., HAMMERMAN C., HEIMBACH, J., HÖRMANNSPERGER, G., et al. Safety assessment of probiotics for human use. In: *Gut Microbes*. 2010, nr. 1, pp. 164-185. doi: 10.4161/gmic.1.3.12127. ISSN 1949-0976.

254. SANDRINI, S., ALDRIWESH, M., ALRUWAYS, M., FREESTONE, P. Microbial endocrinology: host-bacteria communication within the gut microbiome. In: *J Endocrinol.* 2015, nr. 225(2), pp. R21-34. doi: 10.1530/JOE-14-0615. ISSN 0022-0795.

255. SCHLEIFER, K. H., KILPPER-BALZ, R. (1984). Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. In: *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1984, nr. 34(1), pp. 31-34. doi.org/10.1099/00207713-34-1-31. ISSN 0020-7713.

256.SCHLEIFER, K.H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILPPER-BALZ, R., COLLINS, M.D., FISCHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. In: *Syst. Appl. Microbiol*. 1985, nr. 6 (2), pp. 183-195. doi: 10.1016/s0723-2020(85)80052-7. ISSN 0723-2020.

257. SCHOELER, M., CAESAR, R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. In: *Rev Endocr Metab Disord*. 2019, 20(4), pp. 461-472. doi: 10.1007/s11154-019-09512-0. ISSN 1389-9155.

258. SCHWARTZMAN, J.A., LEBRETON, F., SALAMZADE, R., MARTIN, M.J., SCHAUFLER, K., URHAN, A., ABEEL, T., CAMARGO, I.L.B.C., SGARDIOLI, B.F.,

PRICHULA, J., FRAZZON, A.P.G., VAN TYNE, D., TREINISH, G., INNIS, C.J., WAGENAAR, J.A., WHIPPLE, R.M., MANSON, A.L., EARL, A.M., GILMORE, M.S. Global diversity of enterococci and description of 18 novel species. In: *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*. 2023, nr. 121(10), p. e2310852121. doi: 10.1101/2023.05.18.540996. ISSN 2692-8205.

259. SEDLÁČEK, I., HOLOCHOVÁ, P., MAŠLAŇOVÁ, I., KOSINA, M., SPRÖER, C., BRYNDOVÁ, H., VANDAMME, P., RUDOLF, I., HUBÁLEK, Z., ŠVEC, P. *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing enterococci from the environment. In: *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013, nr. 63(Pt 2), pp. 502-510. doi: 10.1099/ijs.0.041152-0. ISSN 1466-5026.

260. SEKIROV, I., RUSSELL, S.L., ANTUNES, L.C., FINLAY, B.B. Gut microbiota in health and disease. In: *Physiol Rev*. 2010, nr. 90(3), pp. 859-904. doi: 10.1152/physrev.00045.2009. ISSN 0031-9333.

261. SEO, Y.S., LEE, H.B., KIM, Y., PARK, H.Y. Dietary Carbohydrate Constituents Related to Gut Dysbiosis and Health. In: *Microorganisms.* 2020, nr. 8(3), p. 427. doi: 10.3390/microorganisms8030427. ISSN 2076-2607.

262. SGHIR, A., GRAMET, G., SUAU, A., VIOLAINE, R., POCHART, P. & DORE, J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, nr. 66(5), pp. 2263-2266. ISSN 1070-6291.

263. SHAO, Y., FORSTER, S.C., TSALIKI, E. et al. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. In: *Nature.* 2019, nr. 574, pp.117-121 ISSN 1476-4687.

264. SHARON, I, QUIJADA, N.M., PASOLLI, E. et al. The core human microbiome: Does it exist and how can we find it? A critical review of the concept. In: *Nutrients*. 2022, nr. 14(14), p. 2872. doi: 10.3390/nu14142872. ISSN 2072-6643.

265. SHEPARD, B.D., GILMORE, M.S. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. In: *Infect Immun*. 2002, nr. 70(8), pp. 4344-52. doi: 10.1128/IAI.70.8.4344-4352.2002. ISSN 0019-9567.

266. SIVIERI, K., SPINARDI-BARBISAN, A.L.T., BARBISAN, L.F. et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. In: *Eur Food Res Technol.* 2008, nr. 228, pp. 231-237. doi: 10.1007/s00217-008-0927-6. ISSN 1438-2377.

267. SM EN ISO 4833-1:2014. Microbiologia lanțului alimentar. Metoda orizontală pentru enumerarea microorganismelor. Partea 1: Tehnica de numărare a coloniilor la 30°C prin metoda turnării în plăci. Chișinău: Institutul Național de Standardizare, 2014, 21 p.

268. SMITH, H.W. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. In: *J Pathol Bacteriol*, 1965, nr. 90, pp. 495-513.10.1002/path.1700900218. ISSN 0368-3494.

269. SMITH, J., SONES, K., GRACE, D., MACMILLAN, S., TARAWALI, S., HERRERO, M. Beyond milk, meat, and eggs: Role of livestock in food and nutrition security. In: *Animal Frontiers*, 2013, nr. 3(1), pp. 6-13. doi: 10.2527/af.2013-0002. ISSN 2160-6064.

270. SONNENBURG, E.D., SONNENBURG, J.L. The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. In: *Nature Reviews Microbiology*. 2019, nr. 17(6), pp. 383-390. doi: 10.1038/s41579-019-0191-8. ISSN 1740-1526.

271. SPINEI, L. *Biostatistica.* Ch.: Școala de Management în Sănătate Publică, 2009.186 p. ISBN 978-9975-78-743-7.

272. SUN, Y., O'RIORDAN, M.X. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. In: *Adv Appl Microbiol*. 2013, nr. 85, pp. 93-118. ISSN 0065-2164.

273. ŠVEC, P., FRANZ, C.M.A.P. The genus *Enterococcus*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. 2014. Vol. 9781444333831, pp. 175-211. doi: 10.1002/9781118655252.CH15.

274. SWANSON, A., KOSMALA, M., LINTOTT, C., SIMPSON, R., SMITH, A., PACKER, C. Snapshot Serengeti, high-frequency annotated camera trap images of 40 mammalian species in an African savanna. In: *Sci Data.* 2015, nr. 2, p.150026. doi: 10.1038/sdata.2015.26. ISSN 2052-4463.

275. TANNOCK, G. W., COOK G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: Gilmore M.S., editor. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. Washington: ASM Press, DC, USA. 2002, pp.101-132. ISBN 1555812341.

276.TERRY, S.M., BARNETT, J.A., GIBSON, D.L. A critical analysis of eating disorders and the gut microbiome. In: *J Eat Disord,* 2022, nr. 10, p. 154. doi:org/10.1186/s40337-022-00681-z. ISSN 2050-2974.

277. TEUBER, M. The genus *Lactococcus*. *The genera of lactic acid bacteria, the lactic acid bacteria*. Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. Eds. Springer, Boston. 1995, vol 2. pp. 173-234. doi: 10.1007/978-1-4615-5817-0. ISBN 978-0-7514-0215-5.

278. THAISS, C.A., LEVY, M., ITAV, S., ELINAV, E. Integration of innate immune signaling. In: *Trends Immunol.* 2016, nr. 37, pp.84-101. ISSN 1471-4981.

279. THOMAS, A.M.; SEGATA, N. Multiple levels of the unknown in microbiome research. In: *BMC Biol.* 2019, nr. 17, p. 48. ISSN 1741-7007.

280.THONGARAM, T., HOEFLINGER, J.L., CHOW, J., MILLER, M.J. Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli. In: *J Dairy Sci.* 2017, nr. 100(10), pp.7825-7833. doi: 10.3168/jds.2017-12753. ISSN 1525-3198.

281. TIMOȘCO, M., **BOGDAN, V**., FLOREA, N. Impactul unor agenți microbieni din familia *Streptococcaceae* în activitatea vitală a organismului uman și animal. In: *Curierul Medical.* 2014, nr. 57(1), pp.73-77. ISSN 1857-0666.

282. TIMOȘCO, M., **BOGDAN, V**., VELCIU, A. Elucidarea oportunității includerii enterococilor autohtoni în componența preparatelor microbiene, destinate fortificării sănătății. In: *Buletin de perinatologie*, 2015, nr. 2, pp. 60-65. ISSN 1810-5289.

283. TIMOȘCO, M., VELCIU, A., **BOGDAN, V**. Nivelul cantitativ al unor genuri de microorganism obligative tubului digestiv ca factor determinator al stării funcționale intestinale. In: *Biotehnologia microbiologică – domeniu scientointensiv al științei contemporane:* Matereialele Conferinței Științifice internaționale, Ed. 1, 6-8 iulie 2011, Chișinău, Republica Moldova: „Elena-V.I." SRL, 2011, p. 115. ISBN 978-9975-106-78-8.

284. TIMOȘCO, M., VELCIU, A., **BOGDAN, V**. Starea bacteriocenozei intestinale ca factor de semnalizare a dereglărilor în sănătate. În: *Buletin de Perinatologie*. 2015, nr. 3(67), pp. 54-58. ISSN 1810-5289.

285. TIMOȘCO, M., VELCIU, A., FLOREA, N., **BOGDAN, V.** Diversitatea lactobacteriilor tubului digestiv și rolul lor în menținerea statutului funcțional intestinal optim. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină.* 2011, nr. 5(40), pp. 19-22. ISSN 1729-8687.

286. TIMOȘCO, M., VELCIU, A., FLOREA, N., **BOGDAN, V**. Microorganismele din genurile obligatorii tractului gastrointestinal uman cu unele proprietăți potențiale sanbiotice. In: *Info-Med.* 2010. nr. 1(16), pp. 36-39. ISSN 1810-3936.

287.TIWARI P, DWIVEDI R, BANSAL M, TRIPATHI M, DADA R. Role of gut microbiota in neurological disorders and its therapeutic significance. In: *J Clin Med*. 2023, nr. 12(4), p. 1650. doi: 10.3390/jcm12041650. ISSN 2077-0383.

288.TRAN, C.D., GRICE, D.M., WADE, B., KERR, C.A., BAUER, D.C., LI, D., HANNAN, G.N. Gut permeability, its interaction with gut microflora and effects on metabolic health are mediated by the lymphatics system, liver and bile acid. In: *Future Microbiol.* 2015, nr. 10, pp. 1339-1353. doi: 10.2217/FMB.15.54. ISSN 1746-0921.

289.TRAN, T.H.T., EVERAERT, N., BINDELLE, J. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens Salmonella and *Escherichia coli* in pig production. In: *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2018, nr. 102, pp. 17-32. ISSN 1439-0396.

290.TROPINI, C. How the Physical Environment Shapes the Microbiota. In: *mSystems*. 2021, nr. 6(4), p. e0067521. doi: 10.1128/mSystems.00675-21. ISSN 2379-5077.

291. TURNBAUGH, P.J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B.L., DUNCAN, A., LEY, R.E., SOGIN, M.L., JONES, W.J., ROE, B.A., AFFOURTIT, J.P., EGHOLM, M., HENRISSAT, B., HEATH, A.C., KNIGHT, R., GORDON, J.I. A core gut microbiome in obese and lean twins. In: *Nature*. 2009, nr. 457(7228), pp. 480-4. doi: 10.1038/nature07540. ISSN 1476-4687.

292. TURNER, C.E., SOMMERLAD, M., MCGREGOR, K., DAVIES, F.J., PICHON, B., CHONG, D.L., FARZANEH, L., HOLDEN, M.T., SPRATT, B.G., EFSTRATIOU, A., SRISKANDAN, S. Superantigenic activity of emm3 *Streptococcus pyogenes* is abrogated by a conserved, naturally occurring smeZ mutation. In: *PLoS One.* 2012, nr 7(10), p. e46376. doi: 10.1371/journal.pone.0046376. ISSN 1932-6203.

293.URASHIMA, T., ASAKUMA, S., LEO, F., FUKUDA, K., MESSER, M., OFTEDAL, O.T. The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. In: *Adv Nutr*. 2012, nr. 3(3), pp. 473S-82S. doi: 10.3945/an.111.001412. ISSN 2156-5376.

294. VANKERCKHOVEN, V., VAN AUTGAERDEN, T., VAEL, C., LAMMENS, C., CHAPELLE, S., ROSSI, R., JABES, D., GOOSSENS, H. Development of a multiplex PCR for the detection of asa1, gelE, cylA, esp, and hyl genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. In: *J Clin Microbiol*. 2004, nr. 42(10), pp. 4473-9. doi: 10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004. ISSN 0095-1137.

295. VARSHA, K.K., NAMPOOTHIRI, K.M. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. In: *Food Cont.* 2016, nr. 69, pp. 61-64. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.04.032. ISSN 0956-7135.

296. VELCIU, A., TIMOȘCO, M., CIOCHINĂ, V. *Diferenţierea dismicrobismului şi disfuncţiile intestinale diareice: (recomandare metodică).* Chișinău: Tipografia AȘM, 2011. 38 p. ISBN 978-9975-62-298-1.

297. VELCIU, A., TIMOȘCO, M., SAINSUS, N., **BOGDAN, V.** Bacteriocenoza intestinală a copiilor cu divers mod de constituire. În: *Analele științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”*. 2008, nr. 2, pp. 61-64. ISSN 1857-1719.

298. VENUGOPALAN, V., SHRINER, K.A., WONG-BERINGER, A. Regulatory oversight and safety of probiotic use. In: *Emerg. Infect. Dis.* 2010, nr. 16, pp. 1661-1665. 10.3201/eid1611.100574. ISSN 1080-6059.

299.VIDEVALL, E., STRANDH, M., ENGELBRECHT, A., CLOETE, S., CORNWALLIS, C.K. Measuring the gut microbiome in birds: Comparison of faecal and cloacal sampling. In: *Molecular Ecology Resources*. 2018, nr. 18(3), pp. 424-434. doi: 10.1111/1755-0998. ISSN 1755-098X.

300. VIGNOLO, G., SAAVEDRA, L., SESMA, F., RAYA, R. Food bioprotection: lactic acid bacteria as natural preservatives. In: *Progress in Food Preservation* [online]. 2012. Disponibil: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781119962045.ch22. [citat 2024 Apr 23], pp.451-83. ISBN 9780470655856.

301. VIJAY, A., VALDES, A.M. Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review. In: *Eur J Clin Nutr.* 2022, nr. 76, pp. 489–501. doi: org/10.1038/s41430-021-00991-6. ISSN 0954-3007.

302. VLASOVA, AN, KANDASAMY, S, CHATTHA, KS, RAJASHEKARA, G, SAIF, LJ. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. In: *Vet Immunol Immunopathol.* 2016, nr. 172, pp. 72-84. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.01.003. ISSN 0165-2427.

303. VRABIE, V., **BOGDAN, V.**, LEORDA, A., CIOCHINĂ, V., CREȚU, R. Microbiota from feces as an indicator of the health status of some wild birds in the Chisinau Zoo. In: *Oltenia. Studii si comunicari. Stiintele Naturii*. 2023, Tom XXXIX, No.2, pp. 139-146. ISSN 1454-6914.

304. VU, J., CARVALHO, J. *Enterococcus*: Review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. In: *Frontiers in Biology***.** 2011, nr. 6(5), pp. 357–366. ISSN: 1674-7992.

305. WAITE, D.W., TAYLOR, M.W. Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions. In: *Front Microbiol.* 2015, nr. 6, p. 673. doi: 10.3389/fmicb.2015.00673. ISSN 1664-302X.

306. WALKER, A. Intestinal colonization and programming of the intestinal immune response. In: *J Clin Gastroenterol*. 2014, 48 Suppl 1, pp. S8-11. doi: 10.1097/MCG.0000000000000230. ISSN 0192-0790.

307. WAMPACH, L., HEINTZ-BUSCHART, A., FRITZ, J.V., RAMIRO-GARCIA, J., HABIER, J., HEROLD, M., NARAYANASAMY, S., KAYSEN, A., HOGAN, A.H., BINDL, L., BOTTU, J., HALDER, R., SJÖQVIST, C., MAY, P., ANDERSSON, A.F., DE BEAUFORT, C., WILMES, P. Birth mode is associated with earliest strain-conferred gut microbiome functions and immunostimulatory potential. In: *Nat Commun.* 2018, nr. 9(1), p. 5091. doi: 10.1038/s41467-018-07631-x. ISSN 2041-1723.

308. WAN, L. Y. M., CHEN, Z. J., SHAH, N. P., EL-NEZAMI, H. Modulation of intestinal epithelial defense responses by probiotic bacteria. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, nr. 56(16), pp. 2628-2641. doi: org/10.1080/10408398.2014.905450. ISSN 1040-8398.

309. WAN, Y. WANG, F., YUAN, J. et al Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial. In: *Gut.* 2019, nr. 68, pp. 1417-1429. ISSN 0017-5749.

310.WANG, B., YAO, M., LV, L., LING, Z., LI, L. 2017. The human microbiota in health and disease. In: *Engineering (Beijing)* 2017, nr. 3, pp. 71-82. ISSN 2096-0026.

311. WANG, Q., YANG, Q., LIU, X. The microbiota-gut-brain axis and neurodevelopmental disorders. In: *Protein Cell*. 2023, nr. 14(10), pp. 762-775. doi: 10.1093/procel/pwad026. ISSN 1674-800X.

312. WANG, X., YANG, Y., HUYCKE, M.M. Risks associated with enterococci as probiotics. In: *Food Res Int.* 2020, nr. 129, p. 108788. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108788. ISSN 0963-9969.

313. WANG, Y., JIAN, C., SALONEN, A., DONG, M., YANG, Z. Designing healthier bread through the lens of the gut microbiota. In: *Trends in Food Science & Technology*. 2023, nr. 134, pp. 13-28. doi: org/10.1016/j.tifs.2023.02.007. ISSN 0924-2244.

314. WU, H., WU, FT., ZHOU, Q.H., ZHAO, D.P. Comparative analysis of gut microbiota in captive and wild oriental white storks: implications for conservation biology. In: *Frontiers in Microbiology.* 2021, nr. 12, pp. 649466. doi: 10.3389/fmicb.2021.649466. ISSN 1664-302X.

315. WU, S., BHAT, Z.F., GOUNDER, R.S. et al., Effect of dietary protein and processing on gut microbiota-a systematic review. In: *Nutrients.* 2022, nr. 14(3), p. 453. doi: 10.3390/nu14030453. ISSN 2072-6643

316. WU, Y., PANG, X., WU, Y., LIU, X., ZHANG, X. Enterocins: Classification, synthesis, antibacterial mechanisms and food applications. In: *Molecules.* 2022, nr. 27(7), p. 2258. doi: 10.3390/molecules27072258. ISSN 1420-3049.

317.XIAO, K., FAN, Y., ZHANG, Z., SHEN, X., LI, X., LIANG, X., BI, R., WU, Y., ZHAI, J., DAI, J., IRWIN, D.M., CHEN, W., SHEN, Y. Covariation of the fecal microbiome with diet in nonpasserine birds. In: *mSphere*. 2021, nr. 6(3), pp. e00308-21. doi: 10.1128/mSphere.00308-21. ISSN 2379-5042.

318. XU, J., GORDON, J.I. Inaugural article: honor thy symbionts. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, nr. 100(18), pp. 10452-10459. ISSN 0027-8424.

319. YANG, L., XIE, X., LI, Y., WU, L., FAN, C., LIANG, T., XI, Y., YANG, S., LI, H., ZHANG, J., DING, Y., XUE, L., CHEN, M., WANG, J., WU, Q. Evaluation of the cholesterol-lowering mechanism of *Enterococcus faecium* Strain 132 and *Lactobacillus paracasei* Strain 201 in hypercholesterolemia rats. In: *Nutrients.* 2021, nr. 13(6), p. 1982. doi: 10.3390/nu13061982. ISSN 2072-6643.

320. YANG, X., XIE, L., LI, Y., WEI, C. More than 9,000,000 unique genes in human gut bacterial community: Estimating gene numbers inside a human body. In: *PLoS ONE.* 2009, nr. 4(6), p. 6074 doi: 10.1371/journal.pone.0006074. ISSN 1932-6203.

321. YATSUNENKO, T., REY, F.E., MANARY, M.J. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. In: *Nature.* 2012, nr. 486(7402), pp. 222-7. doi: 10.1038/nature11053. ISSN 1476-4687.

322.YE, Z., XU Y., LIU, Y. Influences of dietary oils and fats, and the accompanied minor content of components on the gut microbiota and gut inflammation: A review. In: *Trends in Food Science & Technology*. 2021, 113. 10.1016/j.tifs.2021.05.001. ISSN 0924-2244.

323. ZARRINPAR, A., CHAIX, A., YOOSEPH, S., PANDA, S. Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. In: *Cell Metab*. 2014, nr. 20(6), pp. 1006-17. doi: 10.1016/j.cmet.2014.11.008. ISSN 1550-4131.

324. ZHANG, C., ZHANG, M, WANG, S. et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. In: *ISME J*. 2010, nr. 4(2), pp. 232-241. doi: 10.1038/ismej.2009.112. ISSN 1751-7362.

325.ZHANG, F., QIU, L., XU, X. et al. Beneficial effects of probiotic cholesterol-lowering strain of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infants on diet-induced metabolic syndrome in rats. In: *J Dairy Sci.* 2017, nr. 100(3), pp. 1618-1628. doi: 10.3168/jds.2016-11870. ISSN 1525-3198.

326. ZHANG, Y., LIANG, X.F., HE, S. et al. Effects of high carbohydrate diet-modulated microbiota on gut health in chinese perch. In: *Front Microbiol*. 2020, nr. 11, p. 575102. doi: 10.3389/fmicb.2020.575102. ISSN 1664-302X

327. ZHEN, X., LUNDBORG, C.S., SUN, X., HU, X., DONG, H. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review. In: *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019, nr. 13(8), p. 137. doi: 10.1186/s13756-019-0590-7. ISSN 2047-2994.

328. ZHENG, D., LIWINSKI, T., ELINAV, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. In: *Cell Res.* 2020, nr. 30, pp. 492-506. doi: org/10.1038/s41422-020-0332-7. ISSN 1001-0602.

329. ZHONG, H., PENDERS, J., SHI, Z. *et al.* Impact of early events and lifestyle on the gut microbiota and metabolic phenotypes in young school-age children. In: *Microbiome*. 2019, nr. 7(1), p. 2. doi: org/10.1186/s40168-018-0608-z (2019). ISSN 2755-1652.

330. ZHONG, X., HARRINGTON, J.M., MILLAR, S.R., PERRY, I.J., O'TOOLE, P.W., PHILLIPS, C.M. Gut microbiota associations with metabolic health and obesity status in older adults. In: *Nutrients.* 2020, nr. 12(8), p. 2364. doi: 10.3390/nu12082364. ISSN 2072-6643.

331. ZHOU, A., YUAN, Y., YANG, M., HUANG, Y., LI, X., LI, S, YANG, S., TANG, B. Crosstalk between the gut microbiota and epithelial cells under physiological and infectious conditions. In: *Front Cell Infect Microbiol*. 2022, nr. 12, p. 832672. doi: 10.3389/fcimb.2022.832672. ISSN 2235-2988.

332. ZIELIŃSKA, D., KOLOŻYN-KRAJEWSKA, D. Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties: Review. In: *Biomed Res Int.* 2018, nr. 2018, p. 5063185. doi: 10.1155/2018/5063185. ISSN 2314-6141.

În limba rusă

333. БАННИКОВА, Л.А. *Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности*. М., Пищ. пром-ть, 1975, 256 с.

334. БИРГЕР, М.О. ВЕДЬМИНА, Е.А., ВЛОДАВЕЦ, В.В. и др. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования*. 3-е изд., перераб. и доп., М.: Медицина, 1982. 464 с.

335. БОГДАНОВ, В. Молочнокислая микрофлора молока и ее источники. В: Труды ВНИМИ, 1959, выпуск 20, 70 с.

336. БРИЛИС, Т.А., БРИЛЕНЕ, Х.П., ЛЕНЦНЕР, А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. В: *Лабораторнае дело*. 1986, vol. 4, pp. 210-212. ISSN 0023-6748.

337. ВАСИЛЬЕВ, Д.А., ЗОЛОТУХИН, С.Н., НИКИШИНА Н.М. *Методы частной бактериологии: учебно-методическое пособие*. 2006. с. 175-183.

338. ГАРМАШЕВА, И.Л., КОВАЛЕНКО, Н.К. Биологическая активность и безопасность энтерококков. В: *Мікробіологічний журнал.* 2011, nr. 4(73), pp.77-84. ISSN 1028-0987.

339. ГОСТ ISO 7218-2015. *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям*. [online]. [citat 2.12.2022]. Disponibil: https://files.stroyinf.ru/Index2/1/4293759/4293759314.htm)

340. ДАВЛЕТШИНА, Г.К., ТУЙГУНОВ, М.М., ГАБИДУЛЛИН, Ю.З., АХТАРИЕВА, А.А., БУЛГАКОВ, АК. САВЧЕНКО, Т.А. *Микробиологические методы: учеб. пособие*. Уфа: Изд-во ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2018. 119 с.

341. ДЖАФАРОВ М.М. Влияние температуры на рост штаммов молочнокислых бактерий, относящихся к роду *Streptococcus*. В: *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. 2009, № (11), сс. 20-22. ISSN 2073-0071.

342. ЕГОРОВ, Н.С. *Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности*. Москва: Высшая школа. 1965, 212 с.

343. ЕРМОЛЕНКО, Е.И., ЕРОФЕЕВ, Н.П., ЗАХАРОВА, Л.Б., ПАРИЙСКАЯ, Е.Н., КОТЫЛЕВА, М.П., КРАМСКАЯ, Т.А., СУВОРОВ, А.Н. Влияние индигенных энтерококков на микробиоту. Особенности двигательной функции толстой кишки при экспериментальном дисбиозе. В: *Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения.* 2016, сс. 769-781. ISSN 2076-4618.

344. ЗОЛОТИЛОВА, Г.Д., ЩАКИРЗЯНОВА, М.Р. Жизнеспособность коллекционного фонда бактерий при длительном хранении. В: *Доклады Академии Республики Узбекистан*, 2004, nr.2, p.84-90. ISSN 2181-5372.

345. КВАСНИКОВ, Е.И. *Молочнокислые бактерии и пути их использования*. Москва: Наука, 1975. 388 с.

346. ЛОРАНСКАЯ, И. Д., ЛАВРЕНТЬЕВА, О. А. Функциональный анализ микробиоценоза желудочно– кишечного тракта**.** В: *РМЖ.* 2011, Т. 19, № 17, сс. 1057-1060. ISSN 2225-2282.

347. НЕТРУСОВ, А.И. Практикум по микробиологии. Москва, 2005, 603 с.

348. ПЕРЕТЦ, Л.Г. *Значение нормальной микрофлоры для организма человека.* Москва: Издательство «Медицина». 1955, 436 с.

349. *Расчет t-критерия Стьюдента при сравнении средних величин*. [online]. [citat 30.11.2022]. (Disponibil: https://medstatistic.ru/calculators/averagestudent.html).

350. ТИМОШКО, М.А. *Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных*. Кишинев: Штиинца, 1990. 187 с. ISBN 5376006913.

351.ФУРДУЙ, Т., ЧОКИНЭ, В., ФУРДУЙ, В. Три важнейшие проблемы физиологии и санокреатологии, детерминирующие состояние здоровья общества. Пути их решения. În: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2015, nr. 1(325), pp. 4-17. ISSN 1857-064X.

352.ФУРДУЙ, Т., ЧОКИНЭ, В., ФУРДУЙ, В., БОДРУГ, А., ПОЛЯКОВА, Л., ГЕОРГИУ, З. Детоксикация организма– одна из задач саногенного питания. În: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2014, nr. 2(323), pp. 37-46. ISSN 1857-064X.

353. ФУРДУЙ, Ф.И. Стресс и здоровье. В: *Известия АН МССР. Сер. биол. и хим. наук*. 1989. № 1, с. 3-16.

354. ФУРДУЙ, Ф.И. *Физиологические механизмы стресса и адаптации при остром действии стресс-факторов.* Монография. Кишинев: Штиинца, 1986. 239 с.

355. ФУРДУЙ, Ф.И., ЧОКИНЭ, В.К., ГЛИЖИН, А.Г., ФУРДУЙ, В.Ф., ВРАБИЕ, В.Г., Шептицкий В.А. *Трактат о научных и практических основах санокреатологии. Том 1. Проблема здоровья. Санокреатология. Потребность общества в ее развитии.* Кишинэу: Tipografia AȘM, 2016. 228 с. ISBN 978-9975-62-400-8.

356. ФУРДУЙ, Ф.И., ЧОКИНЭ, В.К., ГЛИЖИН, А.Г., ФУРДУЙ, В.Ф., ВРАБИЕ, В.Г., ГЕОРГИУ, З.Б. Психосанокреатология, психогенный стресс и эмоции (Доклад на Всероссийском симпозиуме с международным участием «Стресс: физиологические эффекты, патологические последствия и способы их предотвращения»). В: *Вестник образования и науки РАЕН*. 2017, №4, сс. 109-119. ISNN 1683-6200.

357. ФУРДУЙ, Ф.И., ЧОКИНЭ, В.К., ФУРДУЙ, В.Ф., ВРАБИЕ, В.Г. БОДРУГ, А.И. *и др*. Пребиотики, пробиотики и эубиотики-важнейшие компоненты саногенных рационов питания человека. În: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2014, nr. 3(324), pp. 32-38. ISSN 1857-064X.

358.ФУРДУЙ, Ф.И., ЧОКИНЭ, В.К., ФУРДУЙ, В.Ф., ВУДУ, Г.А. Причины преждевременной общебиологической деградации человека, пути ее предупреждения и решения проблемы здоровья с позиции санокреатологии. În: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2011b, nr. 2(314), pp. 4-15. ISSN 1857-064X.

359.ФУРДУЙ, Ф.И., ЧОКИНЭ, В.К., ФУРДУЙ, В.Ф., ВУДУ, Л.Ф. и др. Предпосылки и основные положения санокреатологической теории питания человека. I. Анализ современных теорий и систем питания человека с позиции санокреатологии. В: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2010, nr. 3(312), сс. 4-22. ISSN 1857-064X.

360.ФУРДУЙ, Ф.И., ЧОКИНЭ, В.К., ФУРДУЙ, В.Ф., ВУДУ, Л.Ф., *и др*. Предпосылки и основные положения санокреатологической теории питания человека. II. Постулаты санокреатологической теории питания. În: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2011a, 1(313), pp. 4-14. ISSN 1857-064X.

ANEXE

ANEXA.1.

Tabelul A1. Sinteza indicilor cantitativi ai unor reprezentanți ai bacteriocenozei intestinale la copii, maturi și animale de diversă vârstă

Sursa	Vârsta	Cantitatea de celule microbiene la 1g de conținut intestinal, logaritmi zecimali (lg)											
		Loturile experimentale											
		I				II				III			
Copii	zile	Enterococi	Bifidobacteri	Lactobacili	*Escherichia*	Enterococi	Bifidobacteri	Lactobacili	*Escherichia*	Enterococi	Bifidobacteri	Lactobacili	*Escherichia*
	0-6	5,93±0,15	10,89±0,17	9,17±0,14	6,07±0,11	-	-	-	-	6,63±0,12	8,48±0,13	7,43±0,14	8,74±0,11
	7-30	5,76±0,1	11,23±0,15	9,53±0,12	5,83±0,13	-	-	-	-	6,84±0,12	8,83±0,12	7,75±0,17	8,98±0,15
	31-60	5,23±0,14	11,65±0,17	9,87±0,11	5,69±0,12	-	-	-	-	7,17±0,16	8,67±0,15	7,53±0,12	9,23±0,11
	61-90	6,19±0,13	9,53±0,14	8,49±0,16	7,88±0,1	-	-	-	-	6,57±0,14	7,57±0,1	6,84±0,17	9,77±0,12
	91-120	6±0,11	10,17±0,12	8,65±0,13	7,04±0,09	-	-	-	-	6,04±0,13	8,49±0,14	7,37±0,16	8,7±0,15
	121-180	5,92±0,1	10,75±0,16	9,04±0,1	6,89±0,12	-	-	-	-	5,65±0,11	8,87±0,13	7,69±0,12	8,53±0,14
	181-240	6,53±0,09	8,87±0,11	7,53±0,13	7,2±0,12	-	-	-	-	6,49±0,12	7,39±0,11	6,46±0,14	9,61±0,13
	241-300	5,63±0,12	10,97±0,14	9,2±0,11	6,57±0,13	-	-	-	-	6,38±0,17	8±0,12	7,11±0,1	8,07±0,16
	301-360	5,53±0,07	11,65±0,15	9,47±0,17	5,75±0,13	-	-	-	-	6,25±0,11	9,87±0,11	6,68±0,15	6,77±0,2
	1 an	5,25 ± 0,11	10,07±0,11	8,88±0,15	5,77±0,2	7,59±0,14	5,55±0,13	3,91±0,2	8,34±0,18	7,96±0,18	5,85±0,17	3,9±0,19	8,55±0,2
	2 ani	5,65± 0,11	9,37±0,11	7,58±0,15	5,47±0,2	7,79±0,13	5,65±0,12	4,03±0,19	8,57±0,17	7,86± 0,18	5,98±0,17	3,75±0,19	8,45±0,18
	3 ani	5,85 ± 0,11	8,67±0,11	7,08±0,15	5,87±0,2	7,69±0,15	4,75±0,18	3,51±0,16	8,44±0,19	7,66±0,18	5,8±0,17	3,85±0,19	8,35±0,2
	4 ani	5,20±0,25	9,65± 0,13	8,76±0,14	5,46± 0,11	6,30±0,46	7,53±0,18	6,65±0,19	8,95±0,11	8,65±0,18	5,23±0,21	3,38± 0,25	9,3± 0,19
	6 ani	5,38±0,15	9,59± 0,1	8,88±0,12	5,76± 0,13	7,20±0,40	7,84±0,15	6,74±0,17	9,00±0,14	8,77±0,23	5,77±0,22	3,46± 0,24	9,53± 0,21
	8 ani	5,46±0,22	9,17±0,14	8,64±0,11	5,90±0,15	7,53±0,32	7,38±0,17	6,13±0,2	9,17±0,16	8,17±0,2	5,7±0,25	3,77± 0,21	9,41± 0,26
	10 ani	5,88±0,22	8,92±0,13	7,82±0,15	6,13±0,12	7,86±0,32	7,69±0,13	5,82±0,18	9,25±0,17	8,11±0,25	5,53±0,24	3,62± 0,23	9,38± 0,22
	12 ani	5,90±0,15	8,87±0,12	7,53±0,16	6,32±0,14	7,92 ±0,17	7,11±0,12	5,76±0,15	9,11±0,19	8,04±0,22	5,61± 0,23	3,81± 0,25	9,30± 0,21
	14 ani	6,13±0,18	8,76±0,11	7,38±0,12	6,62±0,16	7,76±0,18	6,68±0,16	5,32±0,14	9,23±0,15	7,88±0,21	5,07±0,26	3,77± 0,2	9,53± 0,23
	16 ani	6,00±0,16	8,49±0,15	7,30±0,13	6,76±0,1	7,54±0,14	6,46±0,11	5,2±0,15	9,38±0,18	7,64±0,25	4,77±0,2	3,62±0,19	9,5±0,24
Adulți	20 de ani	7,54 ± 0,14	8,54±0,14	-	-	8,43 ± 0,18	5,43±0,16	-	-	9,38 ± 0,22	4,38±0,22	-	-
	30 de ani	7,62 ± 0,10	8,38±0,13	-	-	8,54 ± 0,20	6,88±0,19	-	-	9,49 ± 0,23	4,3±0,21	-	-
	40 de ani	7,74 ± 0,12	8,17±0,15	-	-	8,64 ± 0,19	6,64±0,17	-	-	9,54 ± 0,21	4,23±0,23	-	-
	50 de ani	7,90 ± 0,11	8,13±0,12	-	-	8,49 ± 0,17	6,25±0,18	-	-	9,60 ± 0,22	3,92±0,22	-	-
	60 de ani	8,20±0,13	6,23±0,18	-	-	8,92±0,18	5,32±0,21	-	-	9,77±0,20	3,32±0,26	-	-
	70 de ani	8,64±0,15	5,2±0,19	-	-	8,96±0,21	4,23±0,25	-	-	9,80±0,23	2,53±0,27	-	-
	80 de ani	8,77±0,17	-	-	-	9,2±0,2	-	-	-	9,88±0,19	-	-	-
Purcei	3 zile	3,32±0,15	-	-	-	5,80±0,25	-	-	-	7,6±0,27	-	-	-
	7 zile	5,28±0,12	-	-	-	7,36±0,22	-	-	-	9,3±0,29	-	-	-
	10 zile	5,53±0,11	9,60±0,12	7,54±0,1	5,65±0,11	7,88±0,19	-	-	-	8,77±0,15	7,17±0,19	5,38±0,17	9,8±0,2
	30 de zile	6,34±0,11	9,38±0,14	8,46±0,15	7,49±0,13	8,92±0,21	6,59±0,16	5,38±0,18	8,77±0,21	9,86±0,23	4,17±0,22	3,3±0,2	9,2±0,24
	45 de zile	6,8±0,14	9,47±0,1	8,54±0,13	7,36±0,11	8,14±0,16	6,84±0,17	6,65±0,2	8,88±0,22	8,53±0,23	5,46±0,21	3,5±0,19	9,5±0,21
	75 de zile	6,66±0,11	9,96±0,1	8,38±0,14	7,2±0,12	8,04±0,21	7,5±0,18	6,72±0,19	8,95±0,17	8,30±0,19	5,84±0,25	3,47±0,21	9,04±0,24
	105 de zile	6,53±0,1	9,13±0,13	8,04±0,11	7,11±0,15	7,08±0,17	7,49±0,22	6,88±0,19	8,38±0,21	8,07±0,21	5,62±0,24	3,41±0,23	8,9±0,18

	135 de zile	6,49±0,13	8,83±0,11	7,27±0,14	7,07±0,1	7,46±0,2	7,46±0,21	6,5±0,19	8,3±0,22	7,82±0,2	5,5±0,23	3,32±0,25	8,63±0,22
Viței	10 zile	6,53±0,14	10,2±0,1	8,38±0,11	5,18±0,09	8,49±0,14	-	-	-	9,23±0,19	5,25±0,16	3,6±0,17	8,75±0,19
	20 de zile	6,43±0,12	-	-	-	8,3±0,12	-	-	-	8,94±0,17	-	-	-
	30 de zile	6,2±0,13	-	-	-	8,43±0,11	-	-	-	8,79±0,15	-	-	-
Pui	10 zile	5,43±0,12	-	-	-	8,54±0,18	-	-	-	9,38±0,22	-	-	-
	20 de zile	5,88±0,1	-	-	-	8,79±0,17	-	-	-	8,92±0,19	-	-	-

Notă: Loturile: I.- martor (clinic sănătoși), II – cu dismicrobism intestinal, III – cu disfuncții intestinale diareice

Datele incluse în tabel reprezintă o totalizare a rezultatelor referitor la conținutului bacteriilor facultative și obligative din conținutul intestinal de la om și animale în funcție de statutul fiziologic al organismului.

ANEXA 2.

Figura A2.1. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de proteine la începutul experimentului (inițial)

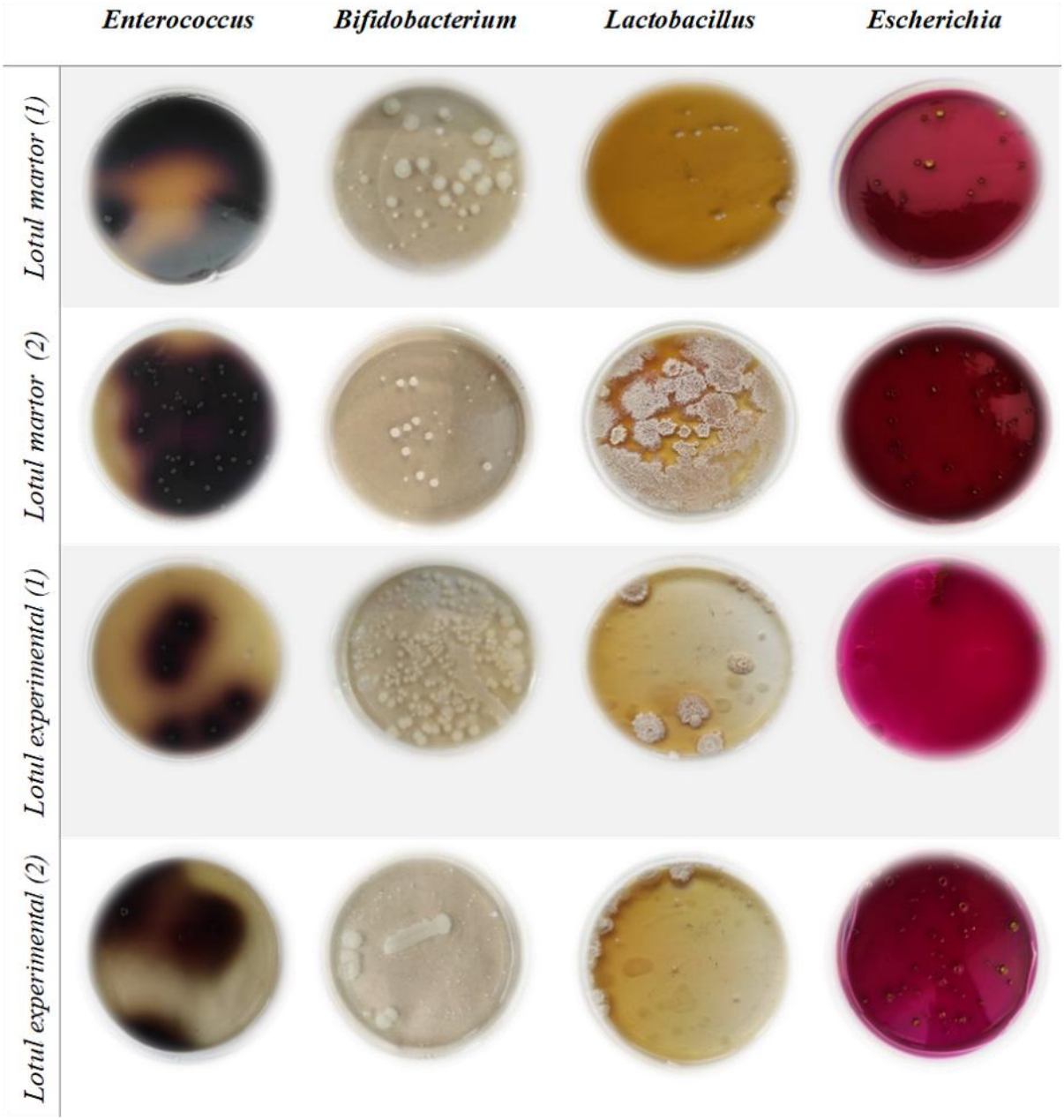


Figura A2.2. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de proteine peste 5 zile de experiment

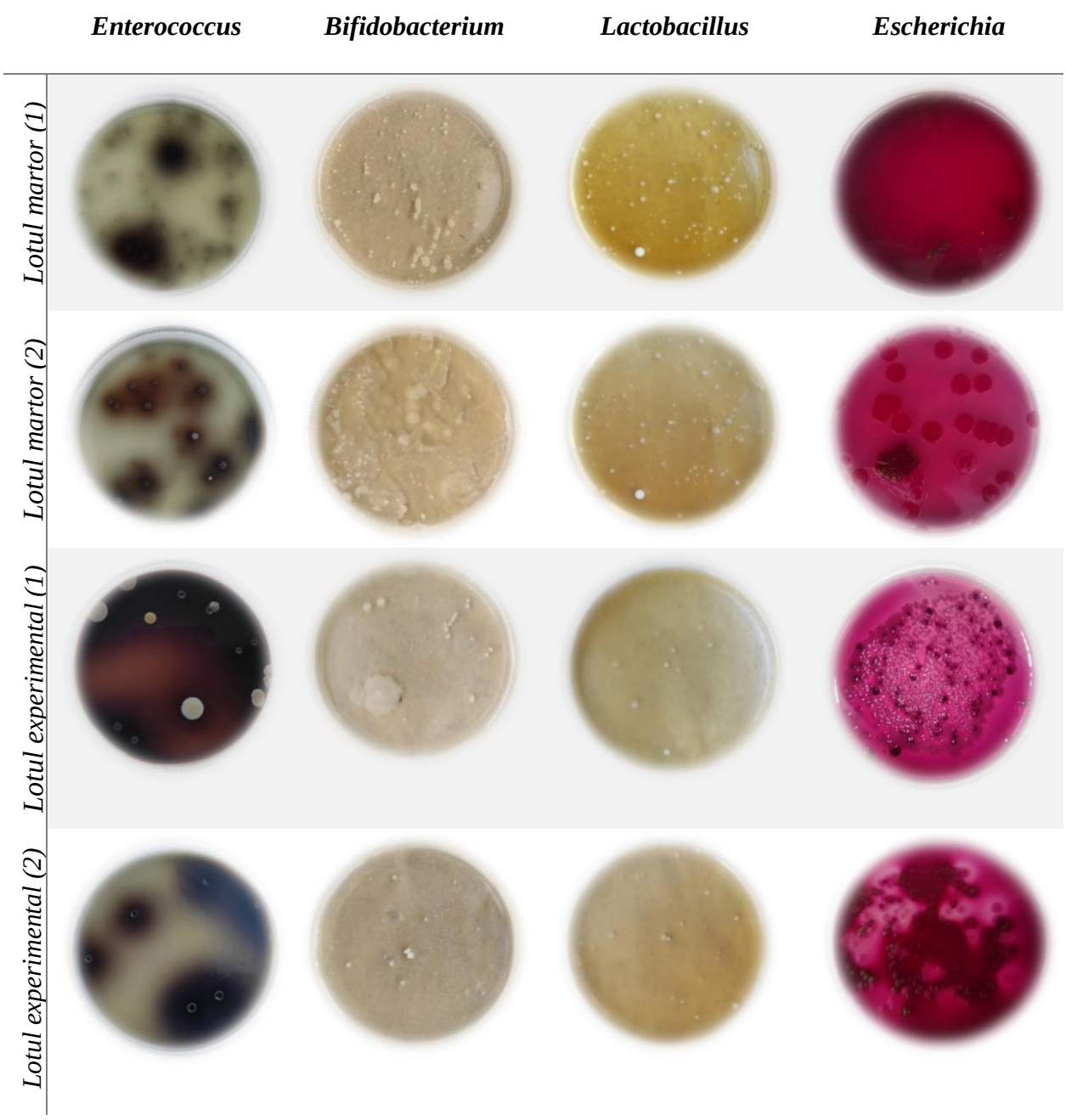


Figura A2.3. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de proteine peste 10 zile de experiment

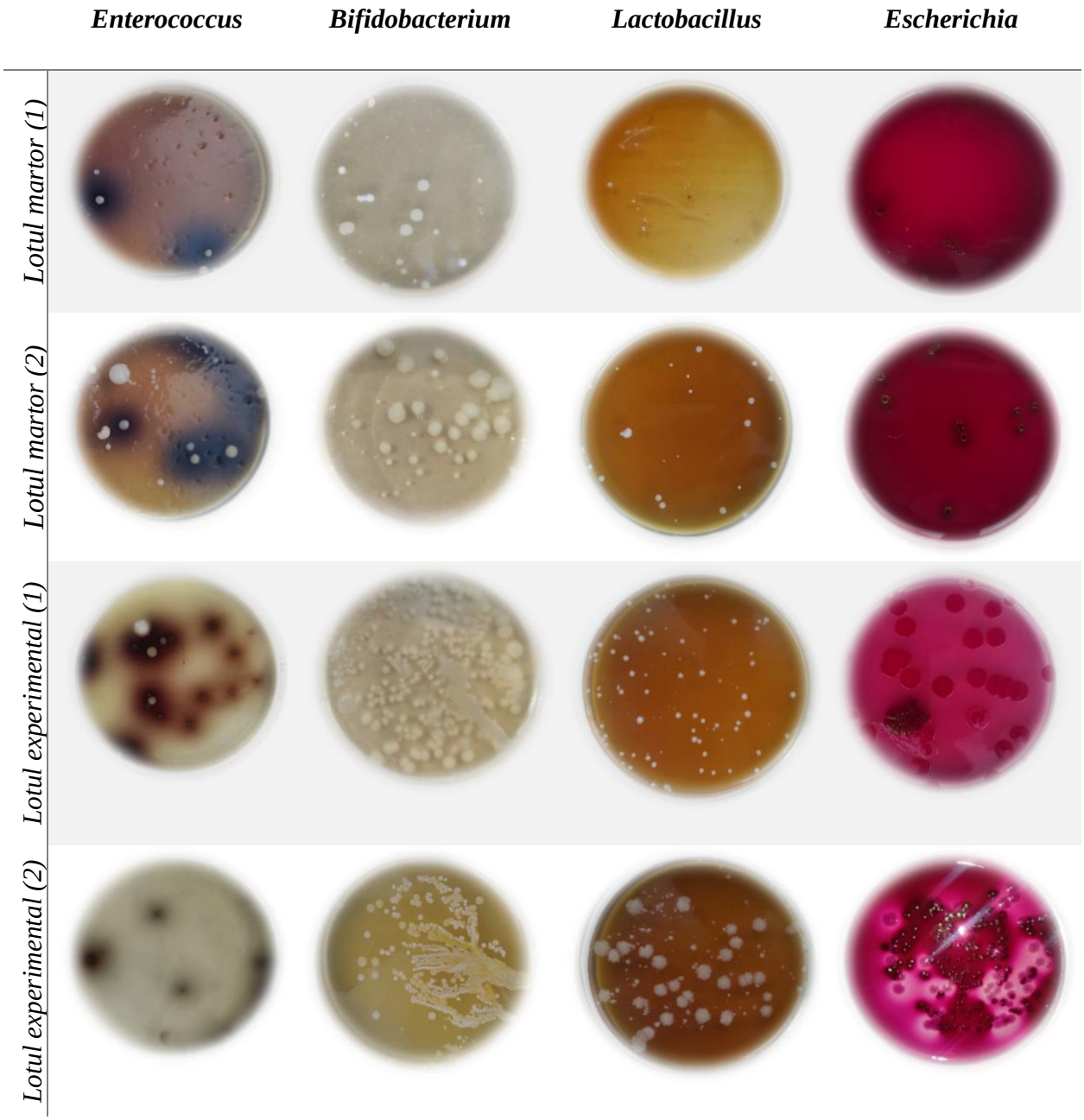


Figura A2.4. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de proteine peste 15 zile de experiment

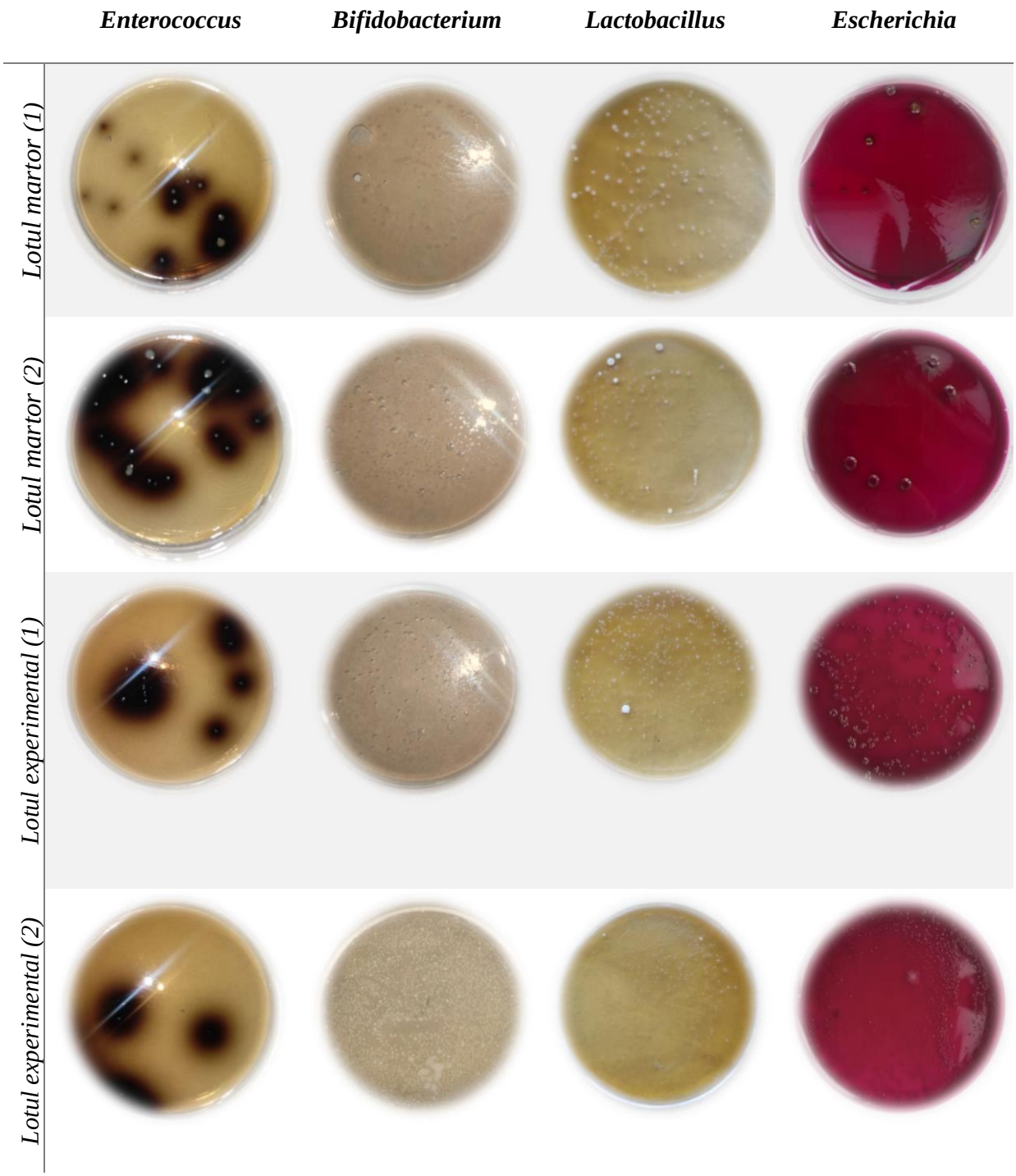


Figura A2.5. Microflora specifică a șobolanilor testați la rația alimentară cu exces de proteine, restabilire

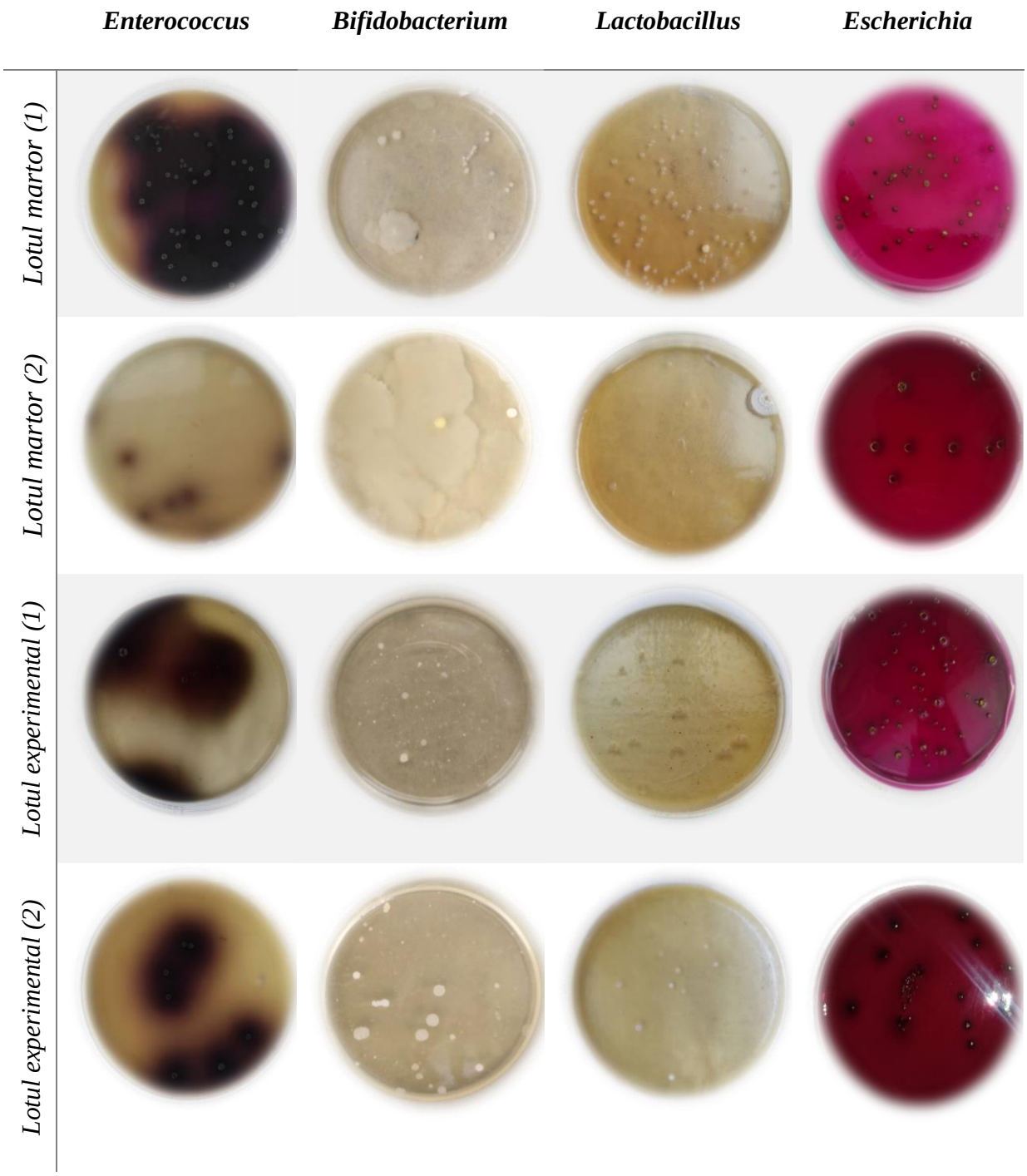


Figura A2.6. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de lipide (inițial)

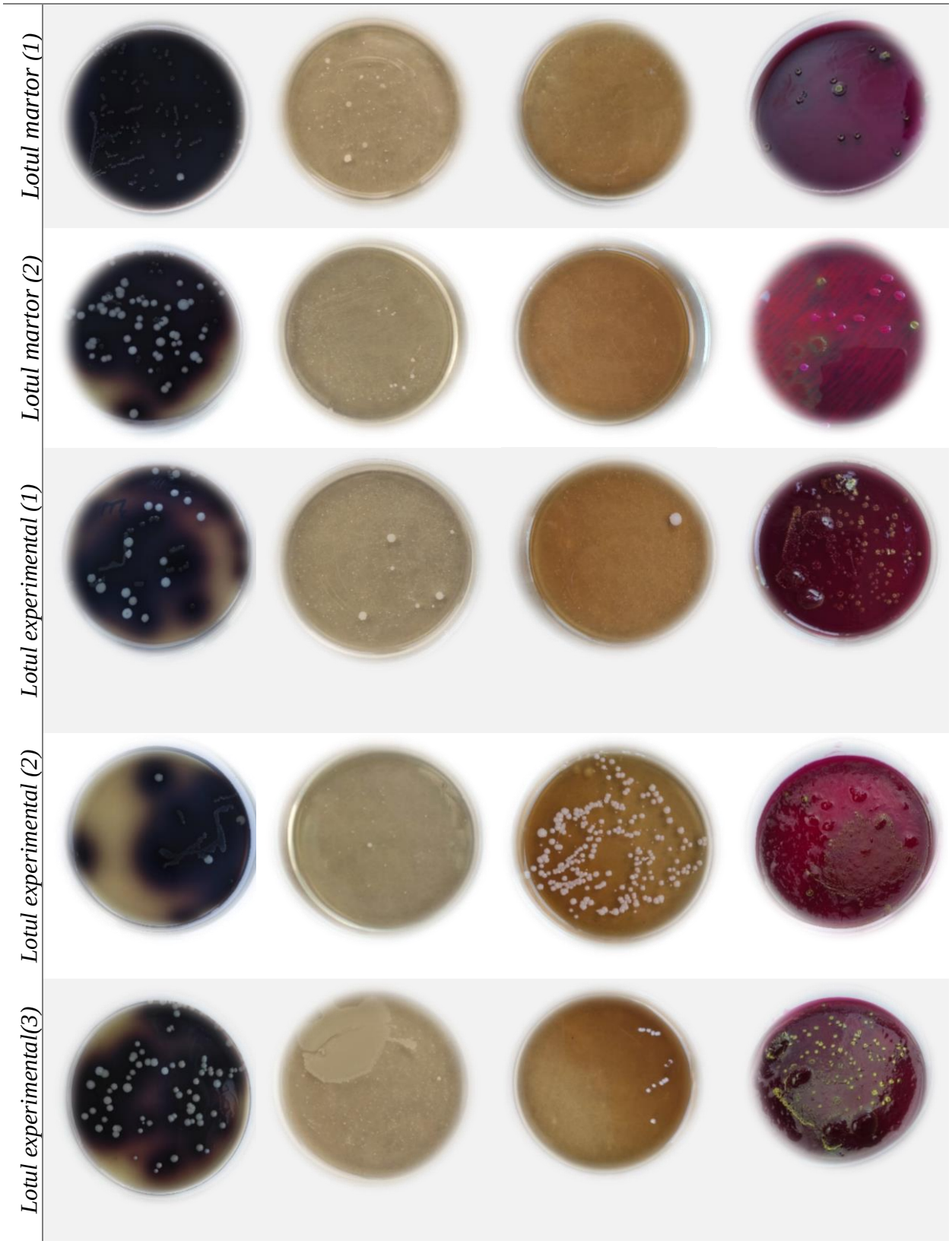


Figura A2.7. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de lipide peste 5 zile de experiment

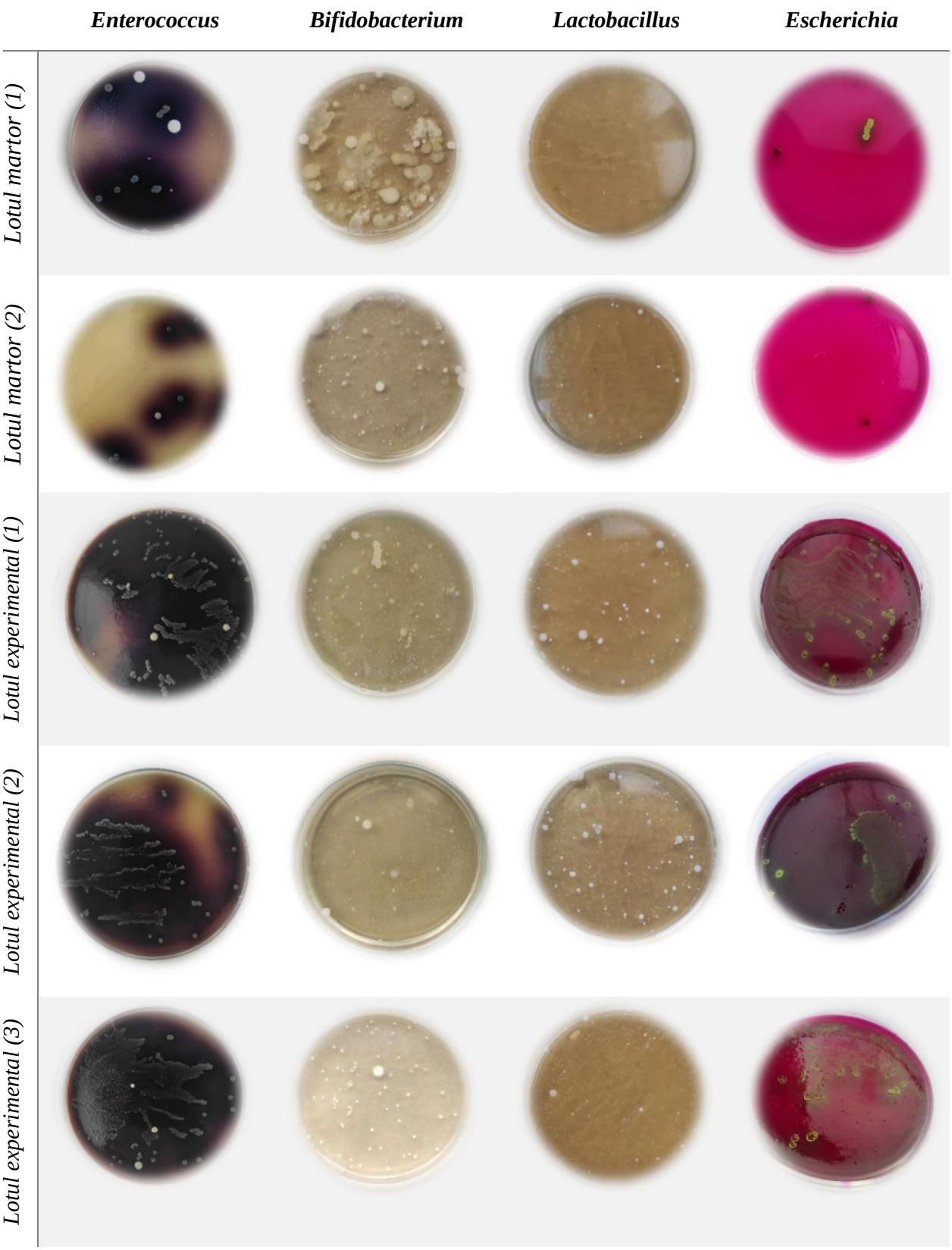


Figura A2.8. Microflora specifică a șobolanilor testați la rația alimentară cu exces de lipide peste 10 zile de experiment

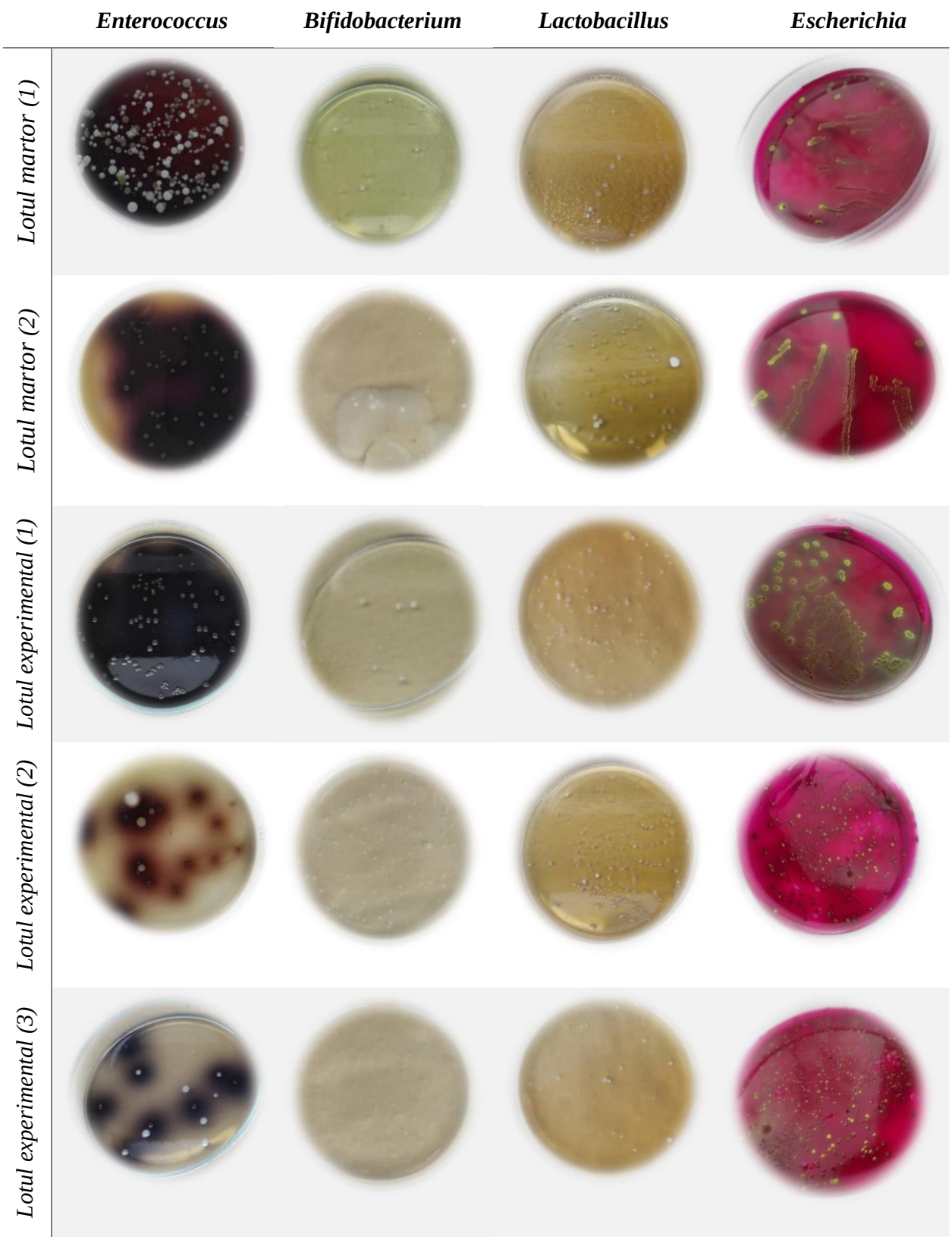


Figura A2.9. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de lipide peste 15 zile de experiment

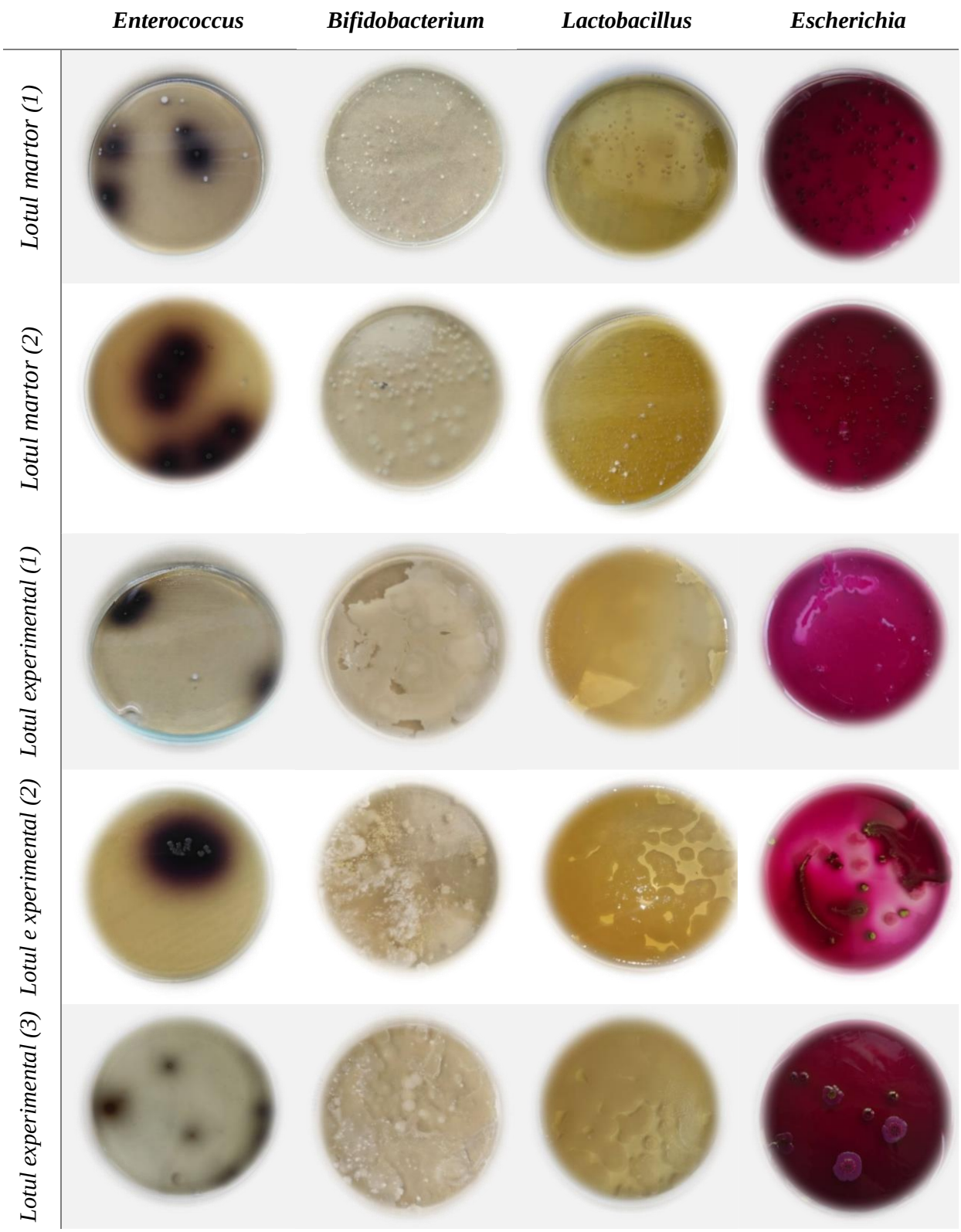


Figura A2.10. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de lipide (restabilire)

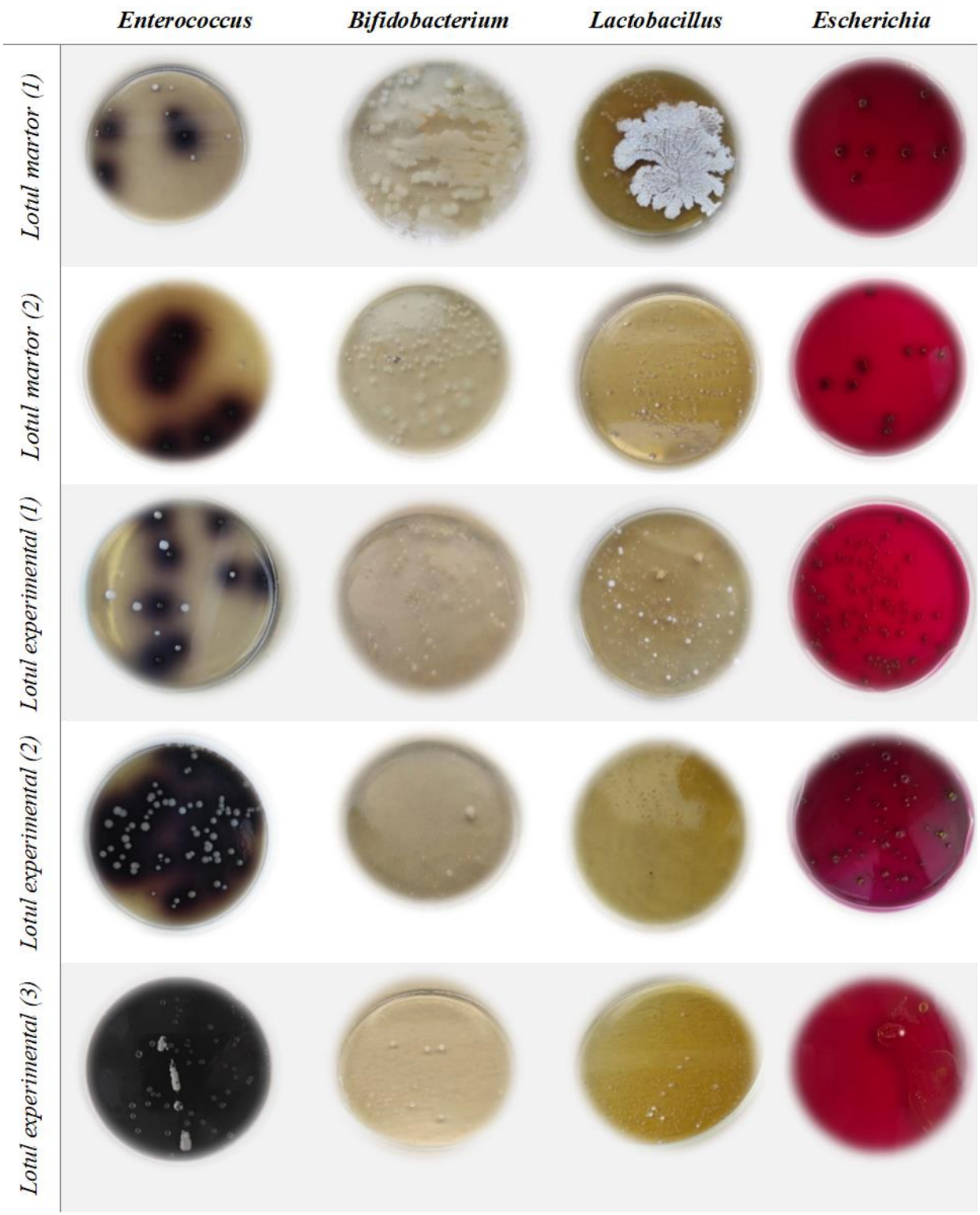


Figura A2.11. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de glucide (inițial)

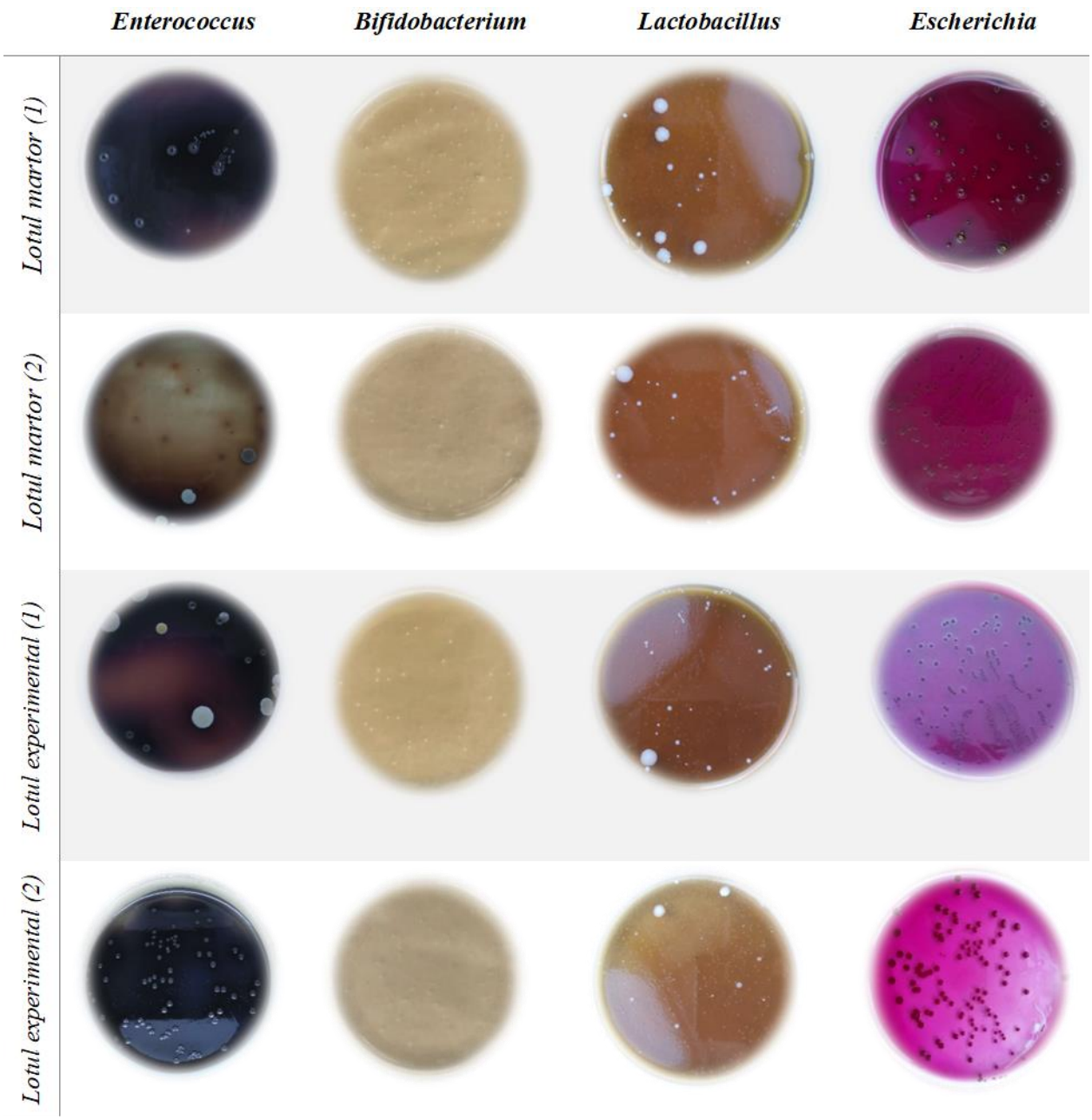


Figura A2.12. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de glucide peste 5 zile de experiment

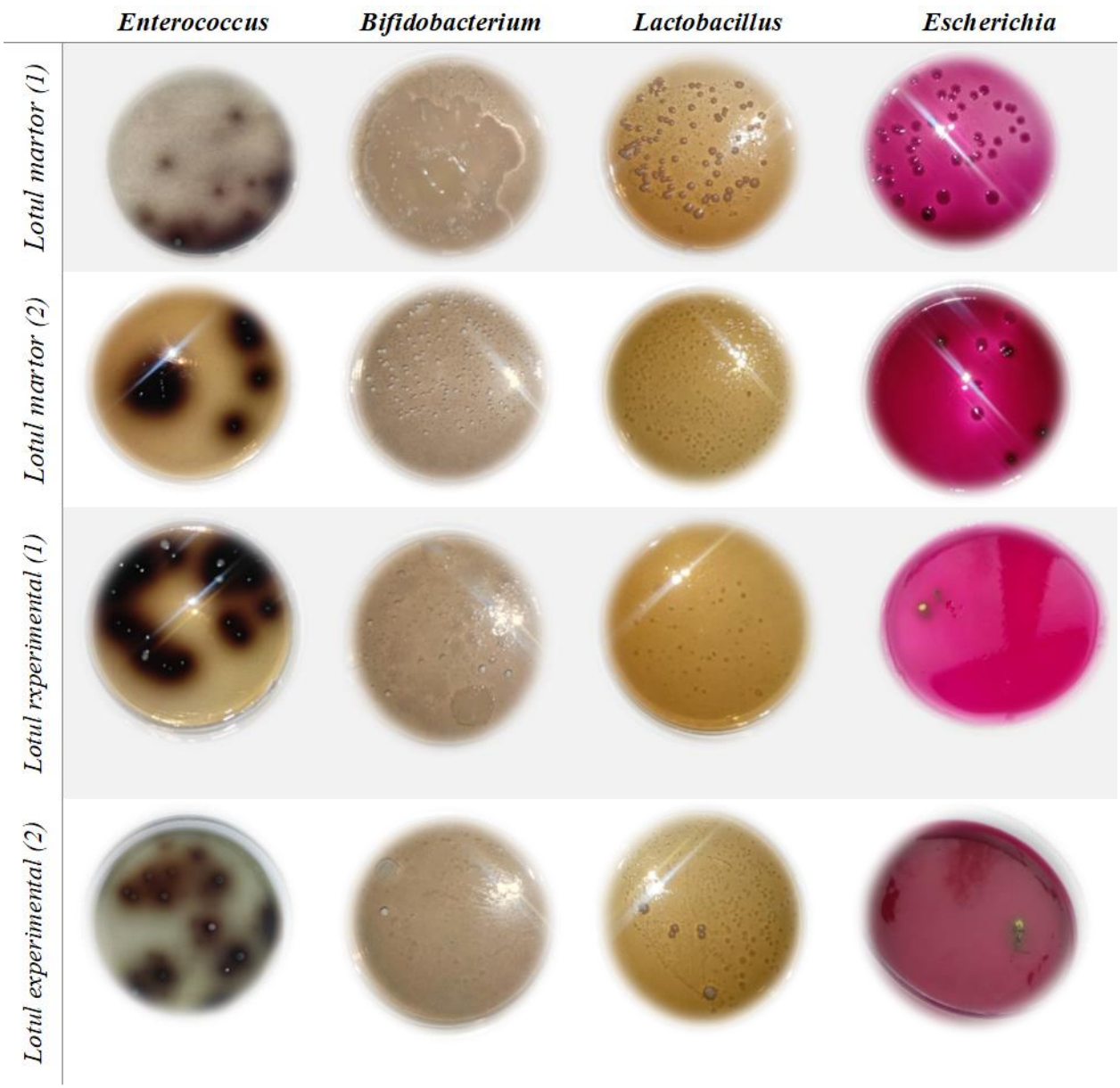


Figura A2.13. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de glucide peste 10 zile de experiment

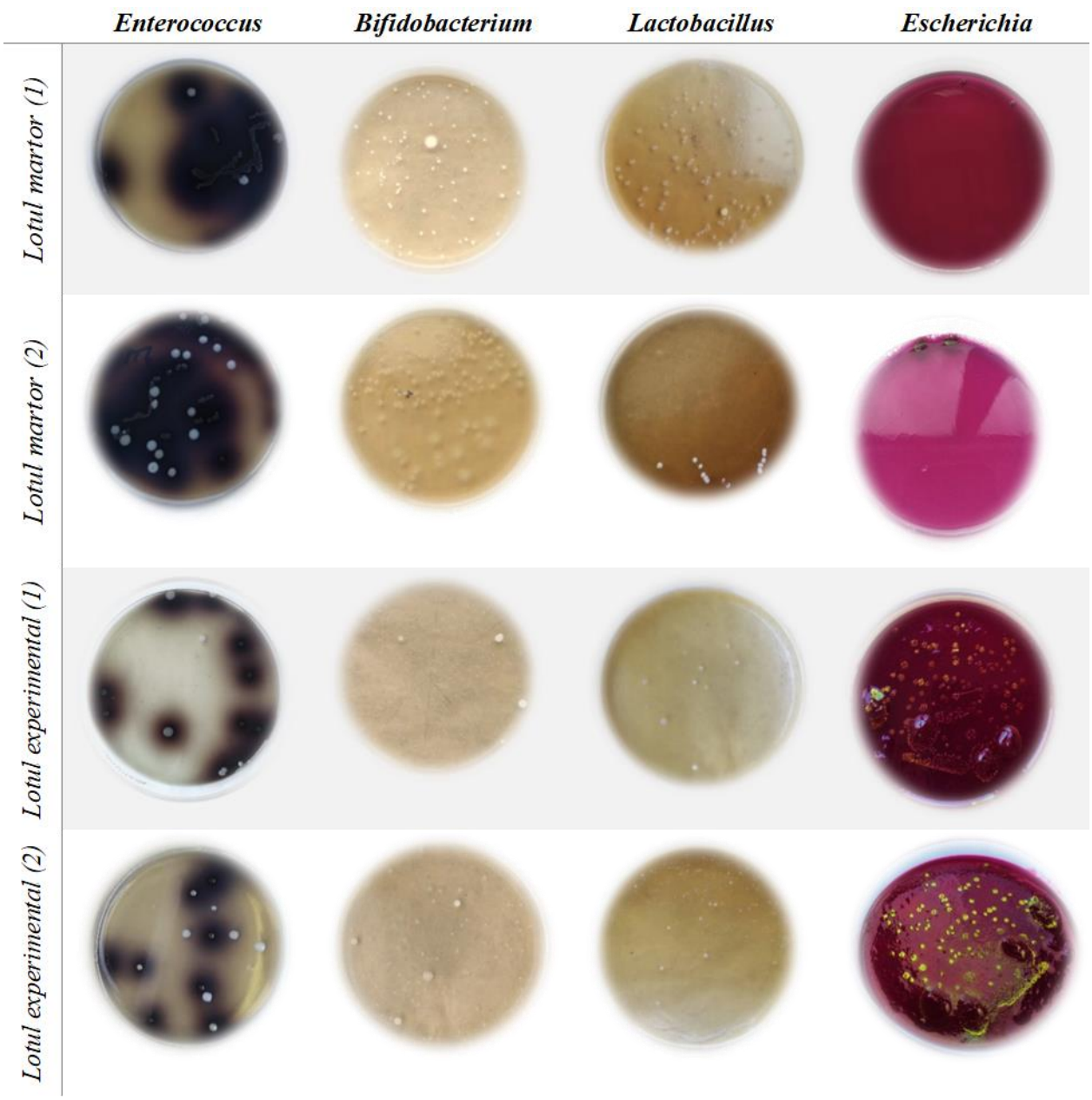


Figura A2.14. Microflora specifică a șobolanilor testați cu rație alimentară cu exces de glucide peste 15 zile de experiment

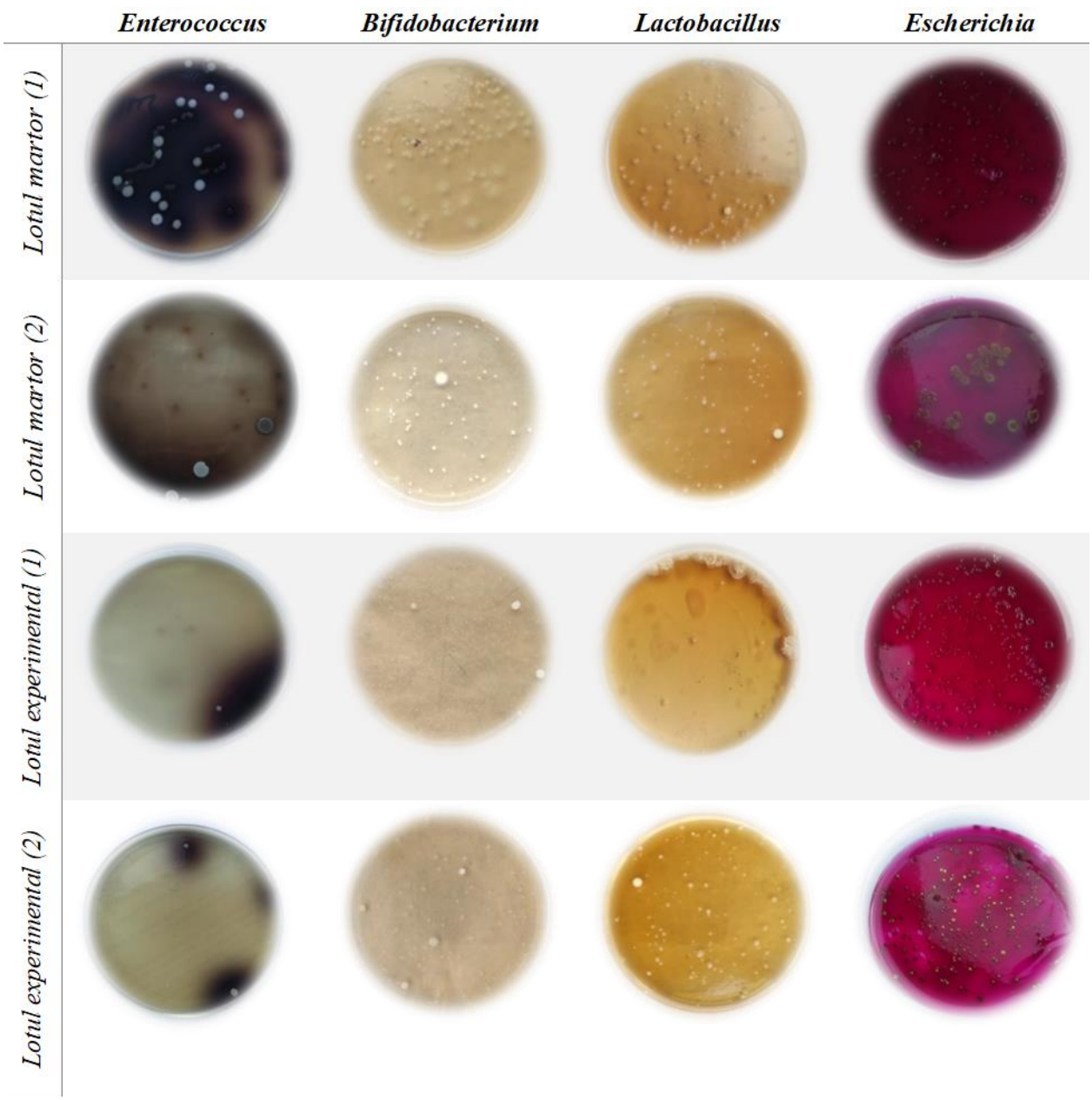


Figura A2.15. Microflora specifică a șobolanilor testați la rație alimentară cu exces de glucide (restabilire)

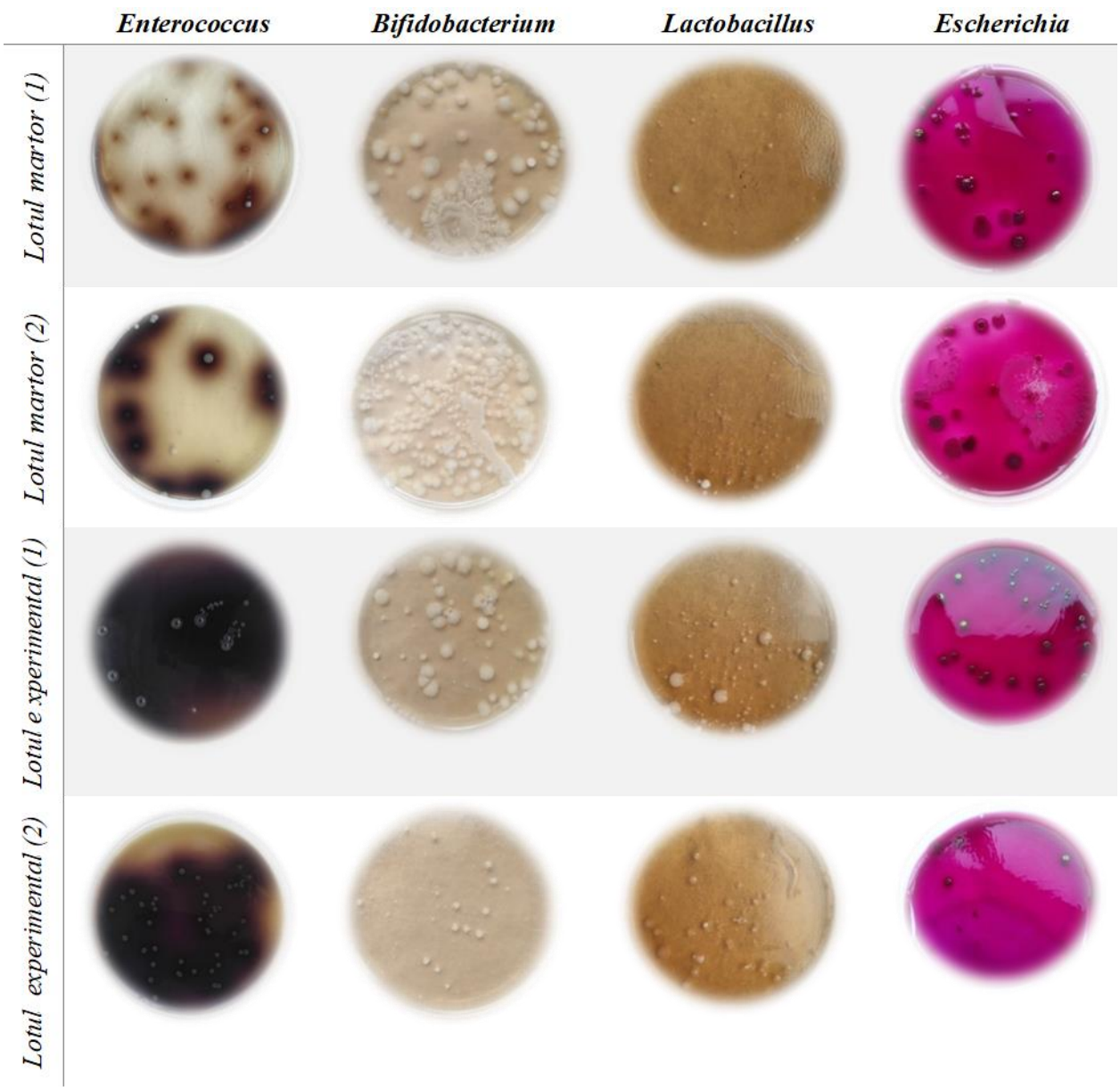


Figura A2.16. Microflora specifică a șobolanilor tesatați la inaniție (inițial)

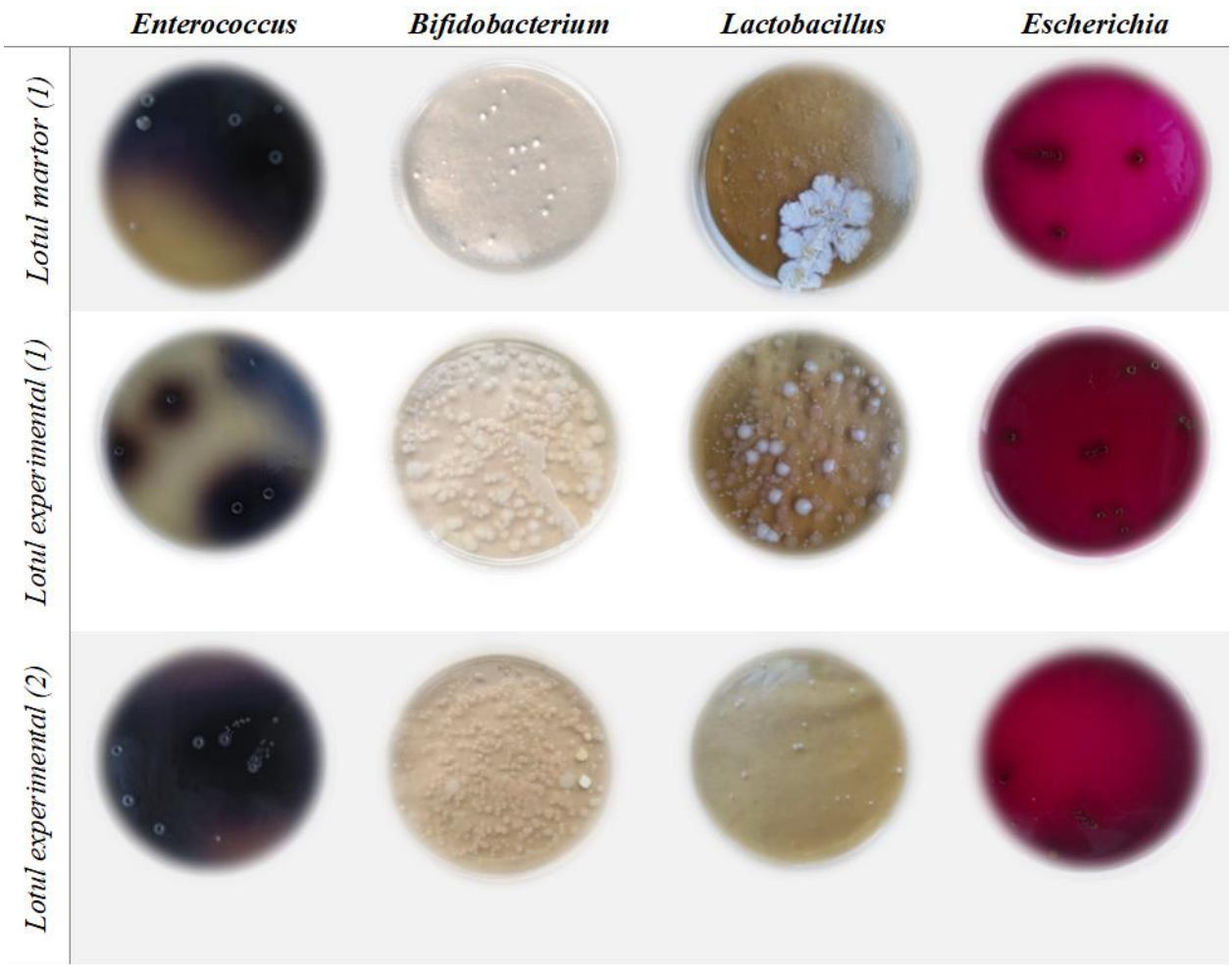


Figura A2.17. Microflora specifică a șobolanilor tesatați la inaniție, peste 3 zile

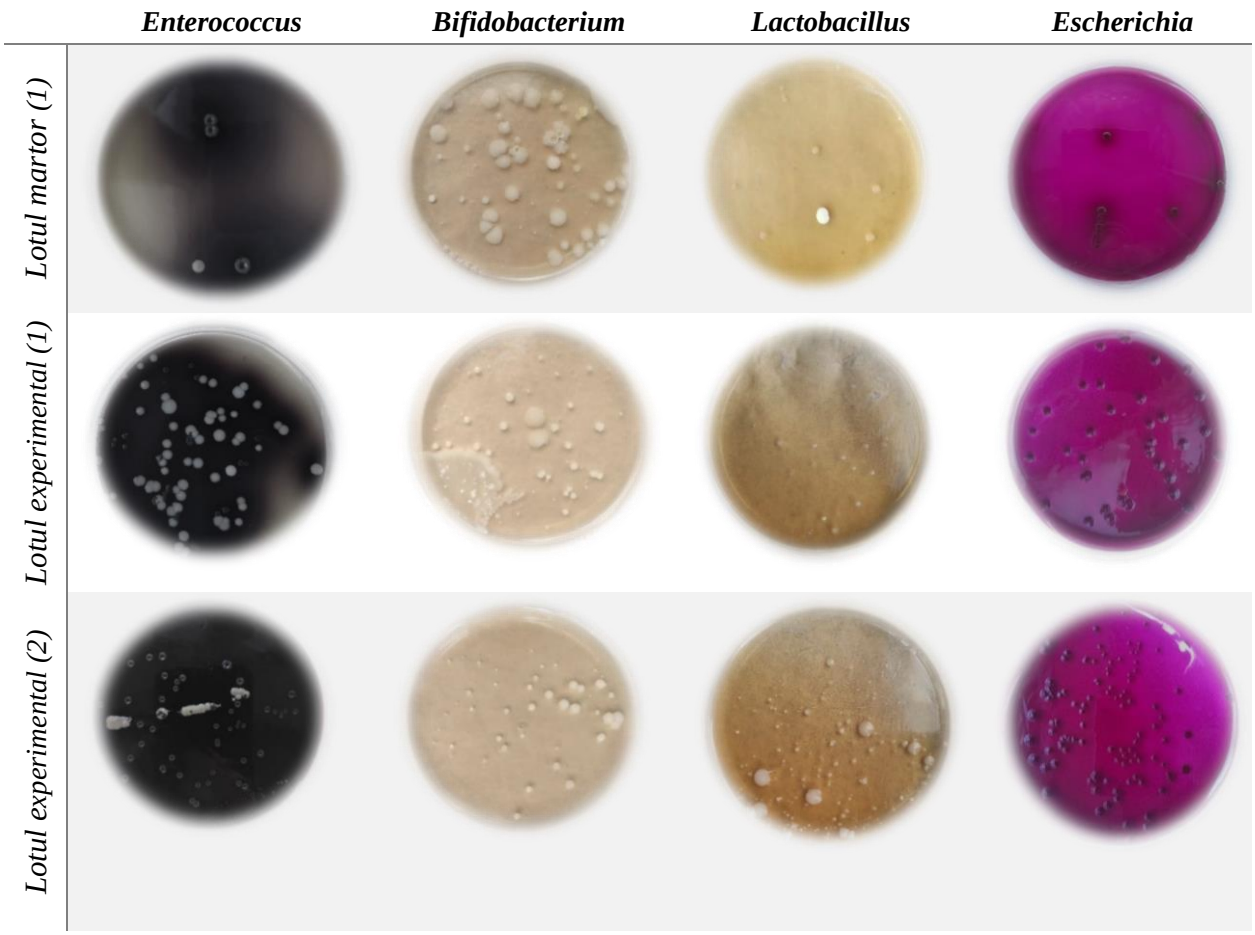


Figura A2.18. Microflora specifică a șobolanilor tesatați la inaniție, după 3 zile de restabilire

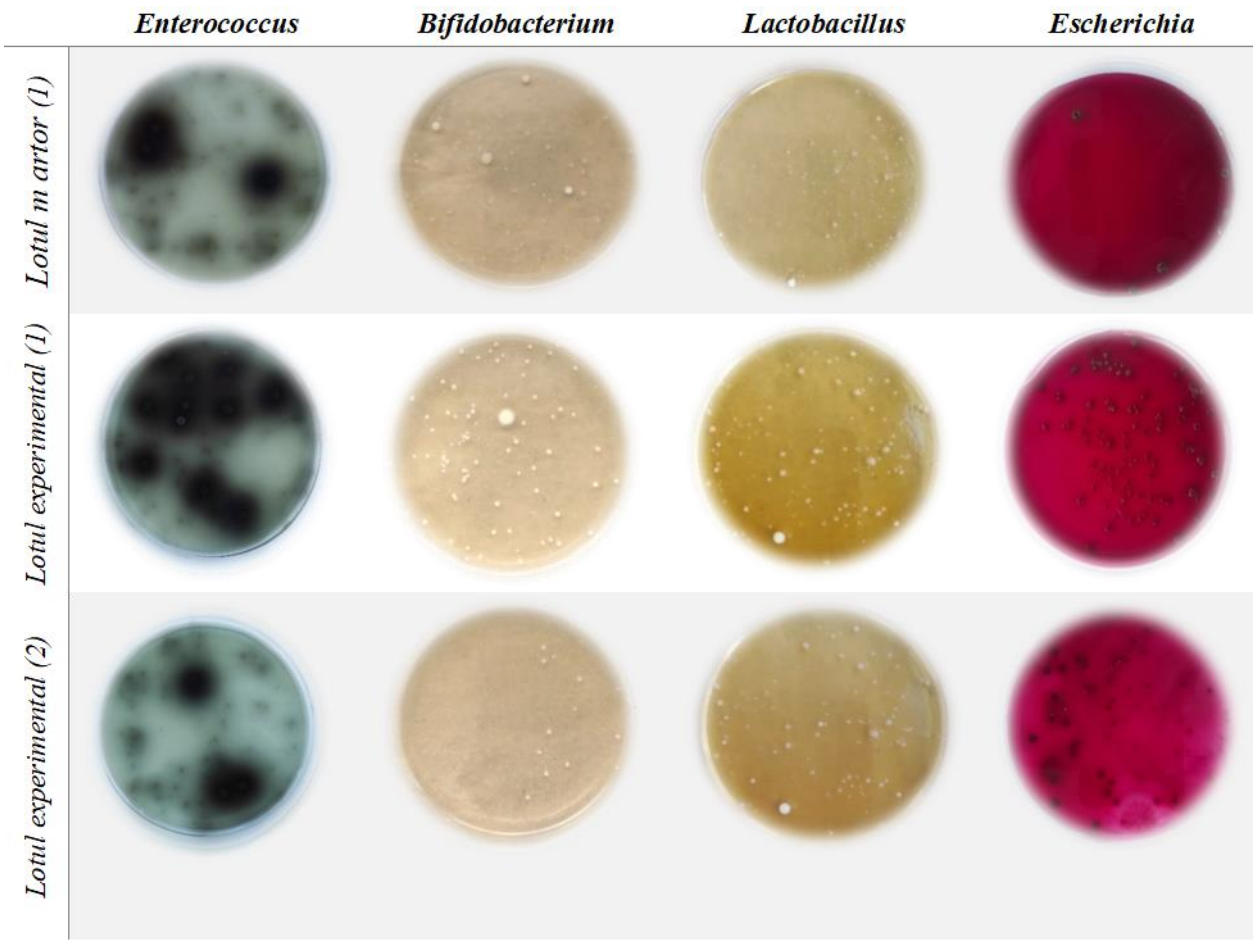
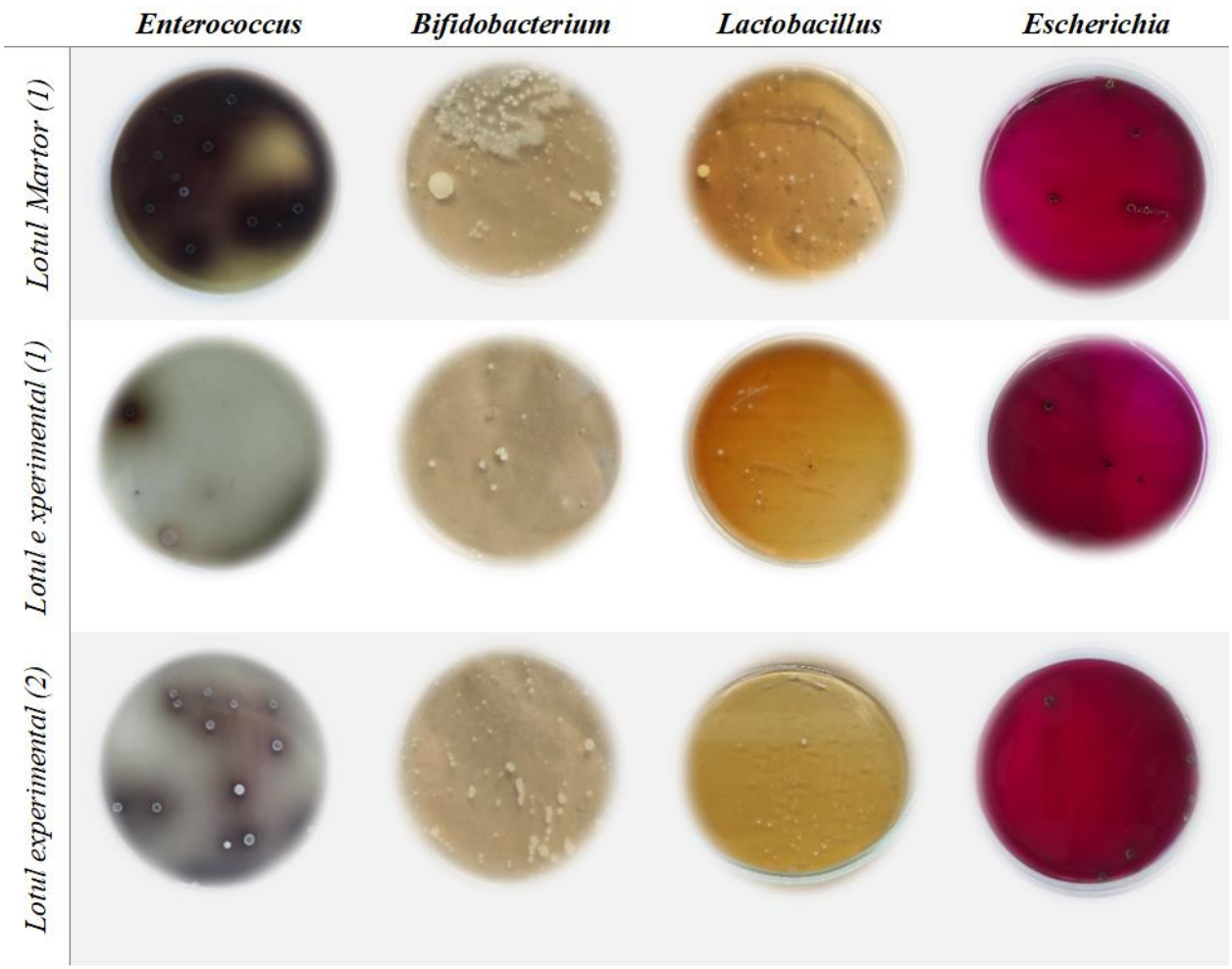


Figura A2.19. Microflora specifică a șobolanilor tesatați la inaniție după 6 zile de restabilire



ANEXA 3

Tabelul A 3.1. Masa corporală a șobolanilor întreținuți cu rații alimentare de diferită valoarea nutritivă, (g)

Lotul de animale	Rația alimentară preponderent bogată în proteine	Rația alimentară preponderent bogată în lipide	Rația alimentară preponderent bogată în glicide
	Masa corporală a șobolanilor testați, g		
	Initial		
Martor 1	104	152	174
Martor 2	80	132	158
Experiment 1	96	204	168
Experiment 2	72	192	200
Experiment 3	-	212	-
Peste 5 zile			
Martor 1	116	160	178
Martor 2	92	138	162
Experiment 1	124	210	170
Experiment 2	99	190	216
Experiment 3	-	218	-
Peste 10 zile			
Martor 1	124	160	182
Martor 2	100	138	166
Experiment 1	146	212	172
Experiment 2	120	186	232
Experiment 3	-	210	-
Peste 15 zile			
Martor 1	130	164	186
Martor 2	106	142	164
Experiment 1	158	220	172
Experiment 2	132	190	234
Experiment 3	-	224	-
Restabilirea 7 zile			
Martor 1	138	170	190
Martor 2	114	140	170
Experiment 1	167	222	172
Experiment 2	143	194	238
Experiment 3	-	228	-

ANEXA 4.

Tabelul A 4.1. Caracteristica fermentativă a microorganismelor sub formă de coci din conținutul intestinal a copiilor de diversă vârstă

Monotulpinile izolate de la copiii de 1 an						
Nr.	genul	Gelatina	Amidon	Hipuratul	Esculina	Arginina
1.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
2.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
3.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
4.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
5.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
6.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
7.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
8.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
9.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
10.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
11.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
12.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
13.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
14.						
15.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
16.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
17.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
18.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
19.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
20.						
21.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
22.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
23.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
24.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
25.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
26.						
27.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
28.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
29.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
30.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
31.						
32.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
33.						
34.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
35.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
36.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
37.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
38.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
39.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
40.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
41.						
42.						
43.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
44.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
45.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
46.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-

47.						
48.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
49.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
50.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
51.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
52.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
53.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
54.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
55.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
56.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
57.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
58.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
59.						
60.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
61.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
62.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
63.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
64.						
65.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
66.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
67.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
68.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
69.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
70.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
71.						
72.						
73.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
74.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
75.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
76.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
77.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
78.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
79.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
80.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
81.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
82.						
83.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
84.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
85.						
86.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
87.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
88.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
89.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
90.						
91.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
92.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
Monotulpinile izolate de la copii de 2 ani						
93.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
94.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
95.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
96.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
97.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-

98.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
99.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
100.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
101.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
102.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
103.						
104.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
105.						
106.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
107.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
108.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
109.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
110.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
111.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
112.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
113.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
114.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
115.						
116.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
117.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
118.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
119.						
120.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
121.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
122.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
123.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
124.						
125.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
126.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
127.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
128.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
129.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
130.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
131.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
132.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
133.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
134.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
135.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
136.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
137.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
138.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
139.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
140.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
141.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
142.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
143.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
144.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
145.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
146.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
147.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
148.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
149.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
150.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+

151.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
152.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
153.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
154.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
155.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
156.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
157.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
158.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
159.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
160.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
161.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
162.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
163.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
164.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
165.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
166.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
167.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
168.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
169.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
170.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
171.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
172.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
173.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
174.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
175.						
176.						
177.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
178.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
179.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
180.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
181.						
182.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
183.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
184.						
185.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
186.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
187.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
95 de monotulpini izolate de la copii de 3 ani						
188.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
189.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
190.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
191.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
192.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
193.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
194.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
195.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
196.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
197.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
198.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
199.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
200.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
201.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
202.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

203.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
204.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
205.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
206.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
207.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
208.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
209.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
210.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
211.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
212.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
213.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
214.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
215.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
216.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
217.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
218.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
219.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
220.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
221.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
222.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
223.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
224.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
225.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
226.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
227.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
228.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
229.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
230.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
231.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
232.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
233.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
234.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
235.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
236.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
237.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
238.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
239.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
240.	*Streptococcus*	-	+	-	-	-
241.	*Enterococcus*	-	-	±	±	+
242.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
243.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
244.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
245.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
246.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
247.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
248.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
249.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
250.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
251.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
252.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
253.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
254.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
255.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-

256.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
257.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
258.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
259.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
260.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
261.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
262.	*Poziţiile 262-299 reprezintă tulpini de bifidobacterii şi lactobacili*					
	De la copii de 5 ani au fost izolote 110 de tulpini					
300.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
301.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
302.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
303.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
304.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
305.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
306.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
307.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
308.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
309.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
310.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
311.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
312.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
313.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
314.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
315.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
316.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
317.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
318.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
319.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
320.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
321.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
322.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
323.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
324.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
325.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
326.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
327.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
328.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
329.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
330.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
331.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
332.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
333.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
334.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
335.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
336.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
337.						
338.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
339.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
340.	-	-	±	±	+	-
341.						
342.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
343.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
344.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

345.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
346.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
347.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
348.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
349.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
350.						
351.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
352.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
353.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
354.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
355.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
356.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
357.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
358.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
359.						
360.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
361.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
362.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
363.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
364.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
365.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
366.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
367.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
368.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
369.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
370.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
371.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
372.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
373.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
374.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
375.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
376.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
377.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
378.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
379.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
380.						
381.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
382.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
383.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
384.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
385.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
386.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
387.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
388.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
389.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
390.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
391.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
392.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
393.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
394.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
395.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
396.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
397.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

398.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
399.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
400.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
401.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
402.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
403.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
404.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
405.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
406.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
407.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
408.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
409.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
410.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
411.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
412.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
413.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
414.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
415.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
De la copii de 7 ani s-au izolat 112 de tulpini						
416.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
417.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
418.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
419.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
420.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
421.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
422.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
423.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
424.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
425.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
426.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
427.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
428.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
429.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
430.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
431.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
432.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
433.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
434.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
435.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
436.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
437.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
438.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
439.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
440.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
441.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
442.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
443.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
444.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
445.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
446.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
447.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
448.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
449.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

450.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
451.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
452.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
453.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
454.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
455.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
456.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
457.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
458.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
459.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
460.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
461.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
462.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
463.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
464.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
465.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
466.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
467.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
468.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
469.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
470.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
471.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
472.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
473.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
474.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
475.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
476.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
477.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
478.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
479.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
480.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
481.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
482.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
483.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
484.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
485.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
486.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
487.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
488.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
489.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
490.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
491.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
492.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
493.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
494.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
495.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
496.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
497.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
498.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
499.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
500.						
501.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
502.						

503.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
504.						
505.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
506.						
507.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
508.						
509.						
510.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
511.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
512.						
513.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
514.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
515.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
516.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
517.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
518.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
519.						
520.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
521.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
522.						
523.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
524.						
525.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
526.						
527.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
528.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
529.						
530.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
531.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
532.						
533.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
534.						
535.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
536.						
537.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
538.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
539.						
540.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
541.						
542.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
543.						
544.						
545.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
De la copii 10 ani s-au izolat 114 de tulpini						
546.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
547.						
548.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
549.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
550.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
551.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
552.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
553.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
554.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

555.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
556.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
557.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
558.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
559.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
560.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
561.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
562.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
563.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
564.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
565.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
566.						
567.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
568.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
569.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
570.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
571.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
572.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
573.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
574.						
575.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
576.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
577.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
578.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
579.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
580.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
581.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
582.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
583.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
584.						
585.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
586.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
587.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
588.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
589.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
590.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
591.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
592.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
593.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
594.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
595.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
596.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
597.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
598.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
599.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
600.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
601.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
602.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
603.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
604.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
605.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
606.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
607.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

608.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
609.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
610.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
611.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
612.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
613.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
614.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
615.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
616.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
617.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
618.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
619.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
620.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
621.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
622.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
623.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
624.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
625.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
626.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
627.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
628.						
629.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
630.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
631.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
632.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
633.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
634.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
635.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
636.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
637.	-	-	±	±	+	-
638.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
639.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
640.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
641.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
642.						
643.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
644.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
645.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
646.						
647.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
648.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
649.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
650.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
651.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
652.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
653.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
654.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
655.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
656.						
657.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
658.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
659.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
660.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

661.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
662.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
663.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
664.						
665.						
666.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
667.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
668.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
669.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
670.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
De la copii de 12 ani s-au izolat 121 de tulpini						
671.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
672.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
673.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
674.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
675.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
676.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
677.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
678.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
679.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
680.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
681.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
682.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
683.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
684.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
685.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
686.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
687.						
688.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
689.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
690.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
691.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
692.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
693.						
694.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
695.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
696.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
697.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
698.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
699.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
700.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
701.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
702.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
703.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
704.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
705.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
706.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
707.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
708.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
709.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
710.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
711.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
712.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+

713.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
714.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
715.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
716.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
717.						
718.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
719.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
720.						
721.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
722.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
723.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
724.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
725.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
726.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
727.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
728.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
729.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
730.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
731.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
732.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
733.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
734.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
735.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
736.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
737.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
738.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
739.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
740.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
741.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
742.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
743.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
744.						
745.						
746.						
747.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
748.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
749.						
750.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
751.						
752.						
753.						
754.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
755.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
756.						
757.						
758.						
759.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
760.						
761.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
762.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
763.						
764.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
765.						

766.						
767.						
768.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
769.						
770.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
771.						
772.						
773.						
774.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
775.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
776.						
777.						
778.						
779.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
780.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
781.						
782.						
783.						
784.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
785.						
786.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
787.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
788.						
789.						
790.						
791.						
792.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
793.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
794.						
795.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
796.						
797.						
798.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
799.						
800.						
De la copii de 16 ani s-au izolat 124 de tulpini						
801.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
802.						
803.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
804.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
805.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
806.						
807.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
808.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
809.	*Streptococcus*	-	+	-	-	-
810.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
811.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
812.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
813.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
814.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
815.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
816.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
817.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+

818.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
819.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
820.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
821.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
822.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
823.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
824.						
825.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
826.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
827.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
828.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
829.						
830.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
831.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
832.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
833.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
834.						
835.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
836.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
837.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
838.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
839.	*Streptococcus*	-	+	-	-	-
840.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
841.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
842.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
843.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
844.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
845.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
846.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
847.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
848.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
849.						
850.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
851.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
852.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
853.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
854.						
855.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
856.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
857.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
858.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
859.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
860.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
861.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
862.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
863.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
864.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
865.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
866.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
867.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
868.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
869.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
870.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+

871.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
872.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
873.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
874.						
875.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
876.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
877.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
878.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
879.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
880.						
881.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
882.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
883.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
884.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
885.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
886.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
887.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
888.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
889.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
890.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
891.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
892.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
893.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
894.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
895.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
896.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
897.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
898.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
899.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
900.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
901.						
902.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
903.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
904.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
905.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
906.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
907.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
908.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
909.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
910.						
911.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
912.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
913.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
914.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
915.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
916.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
917.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
918.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
919.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
920.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
921.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
922.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
923.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

924.						
925.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
926.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
927.						
928.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
929.						
930.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
931.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
932.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
933.						
934.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
935.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
936.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
937.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
938.						
939.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
940.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-

Tabelul A4.2. Caracteristica fermentativă a microorganismelor sub formă de coci din conținutul intestinal al purceilor de diversă vârstă.

	Genul	Substanțele cercetate				
		Gelatina	Amidon	Hipuratul	Esculina	Arginina
1.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
2.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
3.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
4.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
5.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
6.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
7.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
8.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
9.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
10.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
11.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
12.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
13.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
14.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
15.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
16.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
17.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
18.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
19.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
20.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
21.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
22.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
23.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
24.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
25.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
26.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
27.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
28.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
29.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
30.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
31.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
32.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
33.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
34.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
35.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
36.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
37.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
38.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
39.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
40.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
41.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
42.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
43.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
44.						
45.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
46.						
47.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
48.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

49.						
50.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
51.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
52.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
53.						
54.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
55.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
56.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
57.						
58.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
59.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
60.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
61.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
62.	*Enterococcus*	±	+	+	+	+
63.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
64.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
65.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
66.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
67.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
68.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
69.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
70.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
71.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
72.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
73.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
74.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
75.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
76.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
77.						
78.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
79.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
80.						
81.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
82.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
83.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
84.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
85.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
86.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
87.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
88.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
89.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
90.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
91.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
92.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
93.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
94.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
95.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
96.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
97.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
98.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
99.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
100.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
101.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+

102.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
103.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
104.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
105.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
106.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
107.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
108.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
109.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
110.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
111.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
112.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
113.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
114.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
115.						
116.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
117.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
118.						
119.						
120.						
121.						
122.						
123.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
124.						
125.						
126.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
127.						
128.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
129.						
130.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
131.						
132.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
133.						
134.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
135.						
136.						
137.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
138.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
139.						
140.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
141.						
142.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
143.						
144.						
145.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
146.						
147.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
148.						
149.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
150.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
151.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
152.						
153.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
154.						

155.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
156.						
157.						
158.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
159.						
160.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
161.						
162.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
163.						
164.						
165.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
166.						
167.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
168.						
169.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
170.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
171.						
172.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
173.						
174.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
175.						
176.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
177.						
178.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
179.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
180.						
181.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
182.						
183.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
184.						
185.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
186.						
187.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
188.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
189.						
190.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
191.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
192.						
193.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
194.						
195.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
196.						
197.						
198.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
199.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

Tabelul A4.3. Caracteristica fermentativă a microorganismelor sub formă de coci din conținutul intestinal a vițeilor de diversă vârstă.

	Genul	Substanțele cercetate				
		Gelatina	Amidon	Hipuratul	Esculina	Arginina
1.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
2.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
3.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
4.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
5.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
6.						
7.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
8.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
9.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
10.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
11.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
12.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
13.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
14.						
15.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
16.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
17.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
18.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
19.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
20.						
21.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
22.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
23.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
24.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
25.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
26.						
27.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
28.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
29.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
30.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
31.						
32.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
33.						
34.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
35.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
36.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
37.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
38.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
39.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
40.						
41.						
42.						
43.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

44.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
45.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
46.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
47.						
48.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
49.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
50.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
51.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
52.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
53.	*Streptococcus*	-	-	±		+
54.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
55.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
56.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
57.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
58.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
59.						
60.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
61.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
62.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
63.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
64.						
65.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
66.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
67.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
68.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
69.	*Streptococcus*	-	-	±	±	±
70.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
71.						
72.						
73.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
74.						
75.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
76.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
77.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
78.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
79.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
80.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
81.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
82.						
83.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
84.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
85.						
86.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
87.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
88.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
89.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
90.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
91.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
92.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
93.	*Lactococcus*	-	±	-	-	-
94.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
95.						
96.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

97.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
98.						
99.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
100.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
101.						
102.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
103.						
104.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
105.						
106.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
107.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
108.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
109.						
110.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
111.						
112.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
113.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
114.						
115.						
116.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
117.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
118.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
119.						
120.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
121.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
122.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
123.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
124.						
125.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
126.						
127.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
128.						
129.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
130.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
131.						
132.						
133.						
134.						
135.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
136.	*Lactococcus*	-	+	-	-	-
137.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
138.						
139.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
140.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
141.						
142.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
143.						
144.						
145.						
146.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
147.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
148.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
149.						

150.	*Streptococcus*	-	-	±	±	+
151.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
152.						
153.						
154.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
155.						
156.						
157.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
158.						
159.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
160.						
161.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
162.						
163.						
164.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
165.						
166.						
167.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
168.						
169.						
170.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
171.						
172.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+
173.						
174.						
175.	*Enterococcus*	-	-	-	+	+

Notă: Interpretarea rezultatelor a fost bazată pe reacția de colorare la hidroliza substanțelor cercetate:
Gelatina:
(+) - mediu lichid in jurul tulpinei de microorganisme identificate
(-) – mediu solid in jurul tulpinei de microorganisme identificate
Amidonul: pe mediul din jurul tulpinei de microorganime se adaugă soluție de iod
(+) – culoarea mediului ramâne neschimbată
(-) – va forma un complex de culoare albastră
Hipuratul
(+) – Albastru
(-) – incolor, cafeniu deschis
Esculina
(+) – negru, cafeniu închis
(-) – incolor, cafeniu deschis
Arginina
(+) – roșu, violet-roșu
(-) – galben, oranj deschis

Spațiile libere din tabel indică că tulpinile lipsă sunt bacterii acidolactice, ce aparțin genurilor *Bifidobaterium* și *Lactobacillus.*

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata, declar pe răspundere personală, că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez, că în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Bogdan Victoria

Semnătura

Data 29.08.2024

CV-ul candidatului

Nume și prenume: BOGDAN Victoria



Cetățenie: Republica Moldova

Studii:

2000-2004 Universitatea Tehnică a Moldovei, Facultatea Tehnologie și Management în Industria Alimentară, specialitatea – Tehnologia păstrării și prelucrării cerealelor.

2017-2021 Școala Doctorală „Științe Biologice, Geonomice, Chimice și Tehnologice", specialitatea – *Fiziologia omului și animalelor*.

Stagii (instituție, perioada):

Domenii de interes științific: microbiologie, fiziologia omului și animalelor.

Participări în proiecte științifice naționale și internaționale:

2020-2023 Proiect din cadrul Programului de stat (2020-2023) cu cifrul 20.80009.7007.25 „Metode și procedee de menținere și conservare a biodiversității în funcție de integritatea gametogenezei și variabilitatea alimentară" (finanțator ANCD).

2020-2021 Proiect cu cifrul 20.70086.05/COV „Produse inovative pentru combaterea și atenuarea impactului pandemiei cu virusul SARS-CoV-2" din cadrul Ofertei de soluții de cercetare-inovare privind combaterea și atenuarea impactului pandemiei COVID-19, (finanțator ANCD);

2015-2019 Proiect de cercetări științifice aplicative cu cifrul 15.817.04.01A „Alimentația în raport cu tipurile constituţiei. Impactul alimentaţiei asupra sanogenităţii gameţilor masculini" (finanțator CSȘDT al AȘM, ANCD);

2009-2010 Proiect cu cifrul 09.816.09.07A „Elaborarea şi testarea noilor remedii medicamentoase pentru menţinerea coordonată a bacteriocenozei intestinale la nivel sanogen" (2009-2010) din cadrul Programului de Stat „Elaborarea și implementarea noilor preparate farmaceutice în baza utilizării materiei prime locale" (finanțator CȘSDT al AȘM).

Participări la manifestări științifice (naționale și internaționale):

2016 The International Scientific Conference on Microbial Biotechnology dedicated to the 70 th anniversary of foundation of first research institutions and the 55 th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova, 12-13 octombrie, Chișinău, Republica Moldova.

2018 The International Scientific Conference on Microbial Biotechnology. 11-12 octombrie, 2018 Chișinău, Republica Moldova.

2018-2022 Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare", Chișinău, Republica Moldova.

2018, 2019, 2020 Conferința științifică a doctoranzilor (cu participare internațională): „*Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători*", Chișinău, Republica Moldova.

2019, 2022 The national conference with international participation *„Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and*

business community", Chișinău, Republica Moldova.

2021 Conferința științifică națională a doctoranzilor dedicată aniversării a 75-a a USM: *„Metodologii contemporane de cercetare și evaluare"*, 22-23 aprilie 2021, Chișinău, Republica Moldova.

2021 Conferința Științifică Internațională „*Sănătatea, medicina și bioetica în societatea contemporană: studii inter- și pluridisciplinare*", 29-30 octombrie 2021, ediția a IV-a. Chișinău, Republica Moldova.

2021-2023 The scientific international conference *„The museum and scientific research*", Craiova, România.

2021 Simpozionul științific național cu participare internațională *„Biotehnologii moderne – soluții pentru provocările lumii contemporane*", 20-21 mai, Chișinău, Republica Moldova.

2022 The 5th International Scientific Conference on Microbial Biotechnology. 12-13 october 2022, Chișinău, Republica Moldova.

2021, 2022 The International Conference *„Agriculture for Life, Life for Agriculture*", București, România.

Lucrări științifice și științifico-metodice publicate:
22 de lucrări științifice, dintre care:
Articole în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS – 3;
Articole în reviste din alte baze de date acceptate de către ANACEC – 3;
Articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil – 5;
Articole în lucrările conferințelor științifice – 3;
Teze în lucrările conferințelor științifice – 8;

Premii, mențiuni, distincții, titluri onorifice etc.:
Diplomă de onoare a Ministerului Educației și Cercetării al Republicii Moldova, 2023.

Apartenență la societăți/asociații științifice naționale și internaționale:
Societatea de Microbiologie din Moldova

Cunoașterea limbilor (*cu indicarea gradului de cunoaștere*):
Română – maternă;
Rusă- bine;
Franceză – cu dicționarul;
Engleză – cu dicționarul.

Date de contact de serviciu: tel. 068963056, e-mail: victoriabogdan@gmail.com