

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚE ALE NATURII

**Consortiul: Universitatea de Stat din Moldova, Institutul de Dezvoltare a Societății Informaționale,
Universitatea de Stat „Bogdan Petriceicu Hasdeu” din Cahul**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: [612.33 + 591.13]:579.864(043)

BOGDAN VICTORIA

**ROLUL FIZIOLOGIC AL ENTEROCOCILOR
INTESTINALI ÎN MENTINEREA SĂNĂTĂȚII
TUBULUI DIGESTIV**

165.01. Fiziologia omului și animalelor

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Chișinău, 2024

Teza a fost elaborată în cadrul Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie al Universității de Stat din Moldova, Școala Doctorală Științe ale Naturii.

Conducători științifici:

TIMOȘCO Maria	doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova
VRABIE Valeria	doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, Universitatea de Stat din Moldova
Componența Comisiei de Doctorat:	
BALAN Ion	doctor habilitat în științe biologice, conferențiar universitar, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova – <i>președinte</i>
VRABIE Valeria	doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, Universitatea de Stat din Moldova – <i>conducător de doctorat</i>
CIOCHINĂ Valentina	doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova – <i>referent</i>
BURDUNIUC Olga	doctor habilitat în științe medicale, conferențiar cercetător, Agenția Națională pentru Sănătate Publică – <i>referent</i>
BOGDAN-GOLUBI Nina	doctor în științe biologice, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Universitatea Tehnică a Moldovei – <i>referent</i>

Susținerea va avea loc la 03 octombrie 2024, ora 14⁰⁰ în cadrul Ședinței Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat din cadrul Școlii Doctorale Științe ale Naturii, USM. Sediul – Universitatea de Stat din Moldova (<http://www.usm.md>), str. M. Kogălniceanu, 65 A, blocul 3, sala 332, MD-2009, Chișinău, Republica Moldova.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Națională a Republicii Moldova, Biblioteca Științifică Centrală „Andrei Lupan” (Institut), Biblioteca Centrală a Universității de Stat din Moldova (MD 2009, mun. Chișinău, str. Alexei Mateevici 60), pe pagina web a ANACEC (<http://www.anacec.md>) și pe pagina web a USM (<http://www.usm.md>).

Rezumatul a fost expediat la „29” august 2024.

Președintele Comisiei de Doctorat

doctor habilitat în științe biologice,
conferențiar universitar



BALAN Ion

Conducător științific

doctor în științe biologice,
conferențiar cercetător,



VRABIE Valeria

Autor:



BOGDAN Victoria

© Bogdan Victoria, 2024

Cuprins

Reperetele conceptuale ale cercetării	4
Conținutul tezei	6
1. Semnificația microbiotei intestinale în funcționalitatea și sănătatea organismului. Rolul fiziologic și potențialul probiotic al enterococilor	6
2. Materiale și metode de cercetare	7
3. Incidența, nivelul cantitativ și rolul fiziologic al enterococilor în tubul digestiv uman și animal	7
4. Prospekțiunea noilor tulpini de enterococi în calitate de probiotice	19
Concluzii generale și recomandări	24
Bibliografie	26
Lista publicațiilor autorului la tema tezei	28
Adnotare (în română)	31
Adnotare (în engleză)	32
Adnotare (în rusă)	33

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei abordate. Sănătatea tractului gastrointestinal (TGI) și funcționalitatea eficientă a acestuia sunt factori importanți ce determină sănătatea întregului organism. Cercetările din ultimele decenii au reafirmat semnificația microbiotei TGI în fiziologia și sănătatea organismului. La începutul secolului XXI, ediția „SCIENCE” a pronosticat că „cercetarea microbiomului uman va deveni noul subiect fierbinte la nivel mondial” (Lederberg J., 2000), fiind inițiate proiecte majore de cercetare precum „US Human Microbiome Project (HMP)” (HMPC, 2012) și „European Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT)” (Qin J. et al., 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).

Microbiota intestinală în sine reprezintă un consorțiu bacterian, care se stabilește individual pentru fiecare organism, este relativ stabilă în funcție de vârstă și care a coevoluat odată cu specia (fie umană sau animală), dezvoltând pe tot acest parcurs mecanisme de coexistență benefică pentru participanții la simbioză (comensalism). Beneficiile aduse de bacteriile intestinale depind de modul în care acestea se adaptează la anumite condiții ale tubului digestiv, de modalitatea de comunicare internă dintre bacterii și de mecanismele ce dictează interrelațiile dintre bacterii cu gazda, iar fiecare dintre speciile de bacterii în parte are rolul său în asigurarea funcționalității și sănătății TGI (Albenberg L.G., Wu G.D., 2014; Kim C.S., Claud E.C., 2019; Khaledi M. et al., 2024).

Enterococii, în pofida faptului că, reprezintă un grup destul de controversat de bacterii, nu numai din aspectul gradului de patogenitate a lor, dar, până nu demult, și din punct de vedere sistematic, sunt bacterii indispensabile ale microbiotei indigene intestinale, reprezintă unii din primii colonizatori ai tubului digestiv imediat după naștere, care participă în modularea sistemului imun la oameni și animale și au proprietatea de a crea relații simbiotice cu alte bacterii și cu organismul-gazdă (Schleifer K.H., Kilpper-Bälz R., 1984; Sanders M.E. et al., 2010). Datorită unor așa proprietăți precum producerea de bacteriocine (enterocine), capacitatea adezivă sporită și activitatea antagonistă înaltă față de patogeni, 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; Wu Y. et al., 2022; Im E.J. et al., 2023). Acest lucru a fost stabilit și în cercetările realizate în cadrul Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie privind rolul fiziologic al tractului digestiv și respectiv al microflorei intestinale și nemijlocit semnificația pe care o au bacteriile comensale (Timoșco M. și al., 2010; 2011), studii care se încadrează și 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. др. 2010; 2011 a, b; 2016; Timoșco M. și al., 2010; 2011).

În acest context, focusarea studiilor pe comportamentul „neinfecțios” al enterococilor ar permite de a elucidă importanța 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.

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 intestinali în tubul digestiv uman și animal în funcție de statutul fiziologic al organismului;
- Studiarea acțiunii factorului alimentar asupra conținutului enterococilor intestinali în comparație cu alte grupe de bacterii și evidențierea rolului acestora în menținerea echilibrului microbial intestinal benefic;
- Izolarea, identificarea și selectarea celor mai avantajoase tulpini de enterococi intestinali cu potențial sanogen și elucidarea proprietăților probiotice ale acestora;
- Prospectivarea 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 microbial 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 microbial 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 deduce despre echilibrul microbial 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 componentei 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 în baza gradului de compatibilitate a lor cu bacteriile obligative intestinale, a acțiunii asupra microflorei intestinale și indicilor rezistenței naturale a organismului, argumentează includerea tulpinilor enterococice testate în componența

compozițiilor probiotice microbiene, 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; metode de evaluare a viabilității și de cuantificare a tulpinilor (speciilor) cultivate de bacterii și metode de prelucrare statistică a rezultatelor.

CONȚINUTUL TEZEI

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

În capitolul 1 „**Semnificația microbiotei intestinale în funcționalitatea și sănătatea organismului. Rolul fiziologic și potențialul probiotic al enterococilor**” este descrisă analiza literaturii de specialitate privind importanța 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.

Capitolul 2 „**Materiale și metode de cercetare**” expune metodele și schemele de cercetare privind investigarea incidenței bacteriilor de enterococi în diferite obiecte biologice cu statut fiziologic diferit, 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). Investigarea enterococilor în conformitate cu scopul și obiectivele cercetării a fost efectuată în comparație cu alte grupe de bacterii intestinale – bifidobacterii, lactobacterii și *E. coli*, care au semnificație în asigurarea sănătății tubului digestiv.

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). 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 ($\lg 10$) la 1 g de conținut intestinal sau 1 ml de suspensie (Гармашева И.Л., 2011).

În capitol sunt expuse schemele experimentelor pe diverse animale (de laborator și agricole), ce au permis de a elucidă modificările bacteriocenozei intestinale în funcție de acțiunea factorului alimentar și de a releva beneficiile tulpinilor izolate de enterococi în calitate de probiotice. Eficacitatea tulpinilor cercetate de enterococi și potențialul probiotic al acestora a fost testată în baza acțiunii compozițiilor microbiene (în care au fost incluși enterococii), asupra statusul microbial intestinal și a unor indici fiziologici la animale de laborator și agricole.

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 a Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova.

Cel de-al treilea capitol „**Incidența, nivelul cantitativ și rolul fiziologic al enterococilor în tubul digestiv uman și animal**” include rezultatele cercetărilor privind modificările valorii numerice a enterococilor la om și diferite specii de animale în dependență de mediul de trai, statutul fiziologic al organismului-gazdă – vârsta, starea de sănătate a tubului digestiv și la acțiunea factorului alimentar.

A fost determinată cota-parte a enterococilor din grupa bacteriilor acidolactice (lactobacili) – *Enterococcus*, *Lactococcus* și *Streptococcus* la subiecți umani de diferită vârstă, fiind stabilită incidența mai mică a lor, comparativ cu cea a streptococilor, și mai mare decât a lactococilor în primii ani de viață, precum și un conținut mai mare a lor, comparativ cu cele două grupe de bacterii în perioada vârstei adulte, ceea ce denotă despre răspândirea largă a acestor microorganisme.

Nivelul cantitativ al enterococilor diferă și la diverse grupe de animale – animale de companie, animale de laborator, animale de fermă și animale sălbatice (ținute în captivitate). În mediu, valori mai mari ale acestor bacterii au fost depistate la animalele de companie – câine și pisică, care depășesc 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. Corelarea joasă 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 animale ca rezultat al contactului restrâns al acestora cu oamenii și partajării unor medii comune de trai, ceea ce poate duce la transferul încrucișat al acestor bacterii, inclusiv și a formelor patogene (Nilsson O., 2012; Wu S., 2022). În funcție de mediul de trai a fost stabilit un nivel mai mare al enterococilor la păsările investigate din mediul rural comparativ cu mediul urban. La păsările din mediul urban se atestă o corelație mai pozitivă dintre enterococi, bifidobacterii și lactobacterii în menținerea efectivului numeric al escherichiilor 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, ceea ce denotă că în mediul rural contactul cu alte animale domestice, precum și cu omul determină modificarea microflorei intestinale cu dominanța bacteriilor patogene.

Un alt obiectiv al cercetărilor a vizat evidențierea **nivelului cantitativ al enterococilor în dependență de vârstă și starea sănătății tubului digestiv** la subiecții umani în primul an de viață și cu vârstă cuprinsă între 1 și 80 de ani, și la animale agricole juvenile.

Investigarea nivelului de enterococi la subiecții umani sănătoși și cu disfuncții intestinale în primul an de viață ar permite de a evidenția perioadele când se stabilește nivelul „sanogen” al enterococilor, precum și a celor „critice” pentru aceste bacterii în cazurile de disbioză. În acest scop a fost studiată incidența (indicii numerici) ai enterococilor la copiii sănătoși (lotul I) și cu disfuncții intestinale (lotul II) pe perioade de vârstă de până la un an (Tabelul 1.).

Tabelul 1. 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).

În primul an de viață la subiecții umani (copii) sănătoși (lotul I), conținutul enterococilor este 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.

La subiecții cu disfuncții intestinale (lotul II), se observă o majorare cu 6%-37% a nivelului cantitativ al enterococilor. Cea mai mare diferență dintre subiecții sănătoși și cu disfuncții intestinale 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.

Pentru a elucidă „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) (Tabelul 2). Analiza variației conținutului enterococilor la subiecții umani sănătoși de diferită vârstă, relevă: în perioada 1-16 ani nivelul enterococilor nu este stabil și variază de la 3 la 4 ani și de la 10 ani la 14 ani; la vârsta de 20-50 de ani nivelul celulelor microbiene este relativ stabil, iar în perioada de 60-80 de ani nivelul enterococilor este într-o ascensiune constantă (Tabelul 2.).

Tabelul 2. 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		
		Lotul I	Lotul II	Lotul 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***
Adulți până la 50 de ani	16	6,00±0,16	7,54±0,14***	7,64±0,25***
	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***
Adulți după 50 de ani	50	7,90±0,11	8,49±0,17*	9,60±0,22***
	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≤0,05 (statistic semnificativ); ** – p≤0,01 (statistic distinct semnificativ); *** – p≤0,001 (statistic foarte semnificativ).

În cazul de dismicrobism intestinal (lotul II) la copii au fost atestate schimbări neesențiale ale indicilor cantitativi ai enterococilor intestinali, fiind documentată majorarea de cca 1,2-1,4 ori, comparativ cu subiecții sănătoși. Cele mai drastice schimbări au fost atestate la subiecții cu dereglările sub formă de diaree (lotul III) la care s-a stabilit o creștere de 1,3-1,7 ori a valorii numerice a acestor microorganisme. Cea mai mare diferență se observă la copiii cu disfuncții intestinale diareice (lotul III), în special la vârsta de 4 ani, fiind constatată majorarea cu 66,3% față de subiecții sănătoși (Tabelul 2). La adulții cu vârsta de după 50 de ani valoarea numerică a enterococilor s-a majorat de 1,0 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 2). Astfel, rezultatele obținute denotă despre sensibilitatea mare a enterococilor intestinali la modificările mediului intestinal la copii, în special în primii 4 ani de viață, iar la subiecții umani de vârstă înaintată modificările conținutului de enterococi, 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.

Analiza rezultatelor obținute la animale de fermă: pui, purcei și viței au arătat că odată cu majorarea vârstei, efectivul numeric al enterococilor crește la animalele sănătoase. În cazul dereglării sănătății tubului digestiv nivelul acestor bacterii, în comparație cu animalele sănătoase,

scade la pui și purcei și crește la viței. Aceste modificări pot fi cauzate iarăși de specificul fiziologic al tubului digestiv (stabilit filogenetic), precum și de modul de nutriție și condițiile de întreținere controlată (Tabelul 3).

Tabelul 3. 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: * – $p \leq 0,05$ (statistic semnificativ); ** – $p \leq 0,01$ (statistic distinct semnificativ); *** – $p \leq 0,001$ (statistic foarte semnificativ).

Datele obținute ne 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).

În conformitate cu obiectivul „**Influența rației alimentare asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali și evidențierea rolului acestora în menținerea echilibrului microbial intestinal benefic**” au fost realizate 2 serii de experimente.

În **prima serie de experimente** a fost testată influența rației alimentare de diferită valoare nutritivă asupra incidenței enterococilor intestinali. Valoarea nutritivă a rațiilor a fost stabilită în funcție de cota-parte a principalilor nutrienți din rație, fiind astfel administrate trei rații alimentare, respectiv cu exces de proteine, lipide și carbohidrați. Sursa de proteine a constituit – carnea de pui și albușul de ou; de lipide – untura de porc; de glucide – pâinea. Acțiunea rațiilor a fost monitorizată în dinamică: după 5, 10, 15 zile de administrare și după 7 zile de revenire la alimentația standard. Analiza enterococilor la acțiunea rațiilor alimentare a fost realizată în comparație cu conținutul bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli*, pentru a avea o imagine mai amplă a modului în care factorul alimentar influențează microbiota intestinală. Evidența a fost efectuată pentru fiecare animal în parte, care a fost ținut separat în cuști, conform normelor stabilite.

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 1 A.).

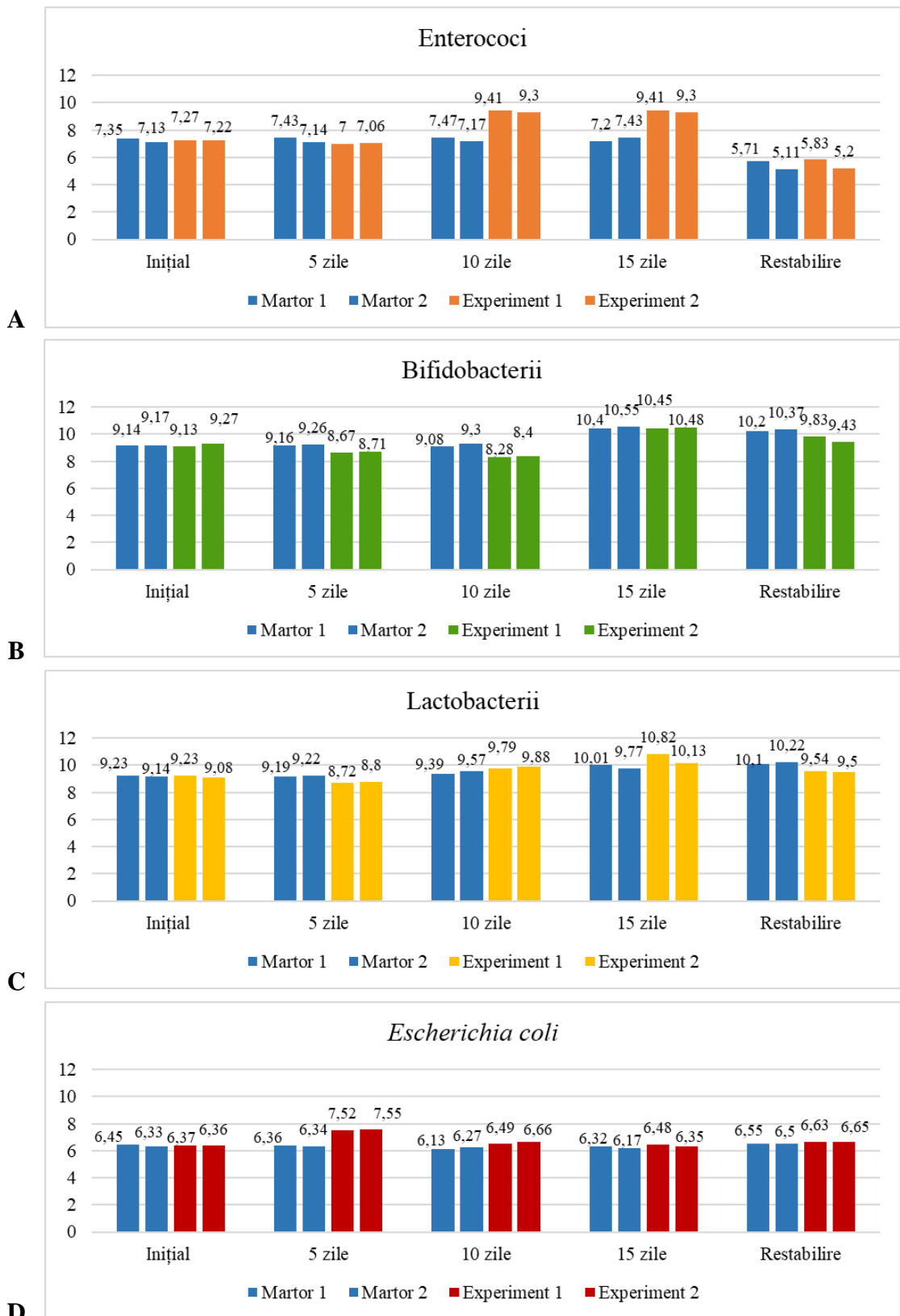


Figura 1. Conținutul de celule bacteriene de enterococi (A), bifidobacterii (B), lactobacterii (C) și *E. coli* (D) (lg la 1 g de conținut intestinal) la acțiunea în dinamică a rației cu exces de proteine

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

Astfel, rația bogată în proteine, în primele 5 zile de administrare induce modificări ale valorilor numerice ale bacteriilor investigate, prin micșorarea conținutului enterococilor cu 3,7% și respectiv cu 2,2%, care corelează cu modificările bifidobacteriilor și lactobacteriilor și majorarea nivelului *E. coli* (de cca 1,2 ori). La administrarea pe o perioadă mai lungă a dietei cu exces de proteine (10 și 15 zile) se observă majorarea evidentă a efectivului enterococilor (cu cca 29,4% și 28,8% comparativ cu datele inițiale) de rând cu cel al bacteriilor benefice și patogene.

Revenirea la regimul normal de alimentare determină, după 7 zile, restabilirea valorilor numerice ale bacteriilor investigate la nivelul datelor inițiale sau la nivelul lotului martor (Figura 1.).

Excesul de grăsimi în rația alimentară (grăsimi de origine animală) induce reducerea conținutului enterococilor din conținutul intestinal cu cca 1,8%-19,1%, concomitent cu cel al bifidobacteriilor (până la 11%) și lactobacteriilor (până la 20,6%) și majorarea conținutului de *E. coli* (până la 22%-23%), 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 (Figura 2).

Ațiunea 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 administrare a rației cu exces de carbohidrați se atestă reducerea nivelului de enterococi cu 14,6%-16,2%. Menținerea acestui regim alimentar (după 10 zile) a condiționat micșorarea cea mai mare a valorii numerice a enterococilor cu 19,7%-21,0% 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.).

Bifidobacteriile și lactobacteriile au fost, de asemenea, sensibile la introducerea excesului de glucide în hrana animalelor: conținutul acestor bacterii s-a micșorat cu 2,6%-22,2% și 7,9%-18,0% respectiv. *E. coli* a reacționat prin creșterea mai evidentă a efectivului în primele zile de administrare a rației bogate în carbohidrați, dar nu în măsura cu care au reacționat bacteriile benefice, fiind atestată majorarea cu: 10,6%-10,9% după 5 zile; 1,9%-3,9% după 10 zile și 5,5%-6,7% după 15 zile de dietă pe carbohidrați.

Revenirea la regimul alimentar normal (după 7 zile) a determinat restabilirea conținutului de enterococi, bifido- și lactobacterii și micșorarea celui de *E. coli* în conținutul intestinal la animalele experimentale la nivelul anterior administrării rației testate. 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.

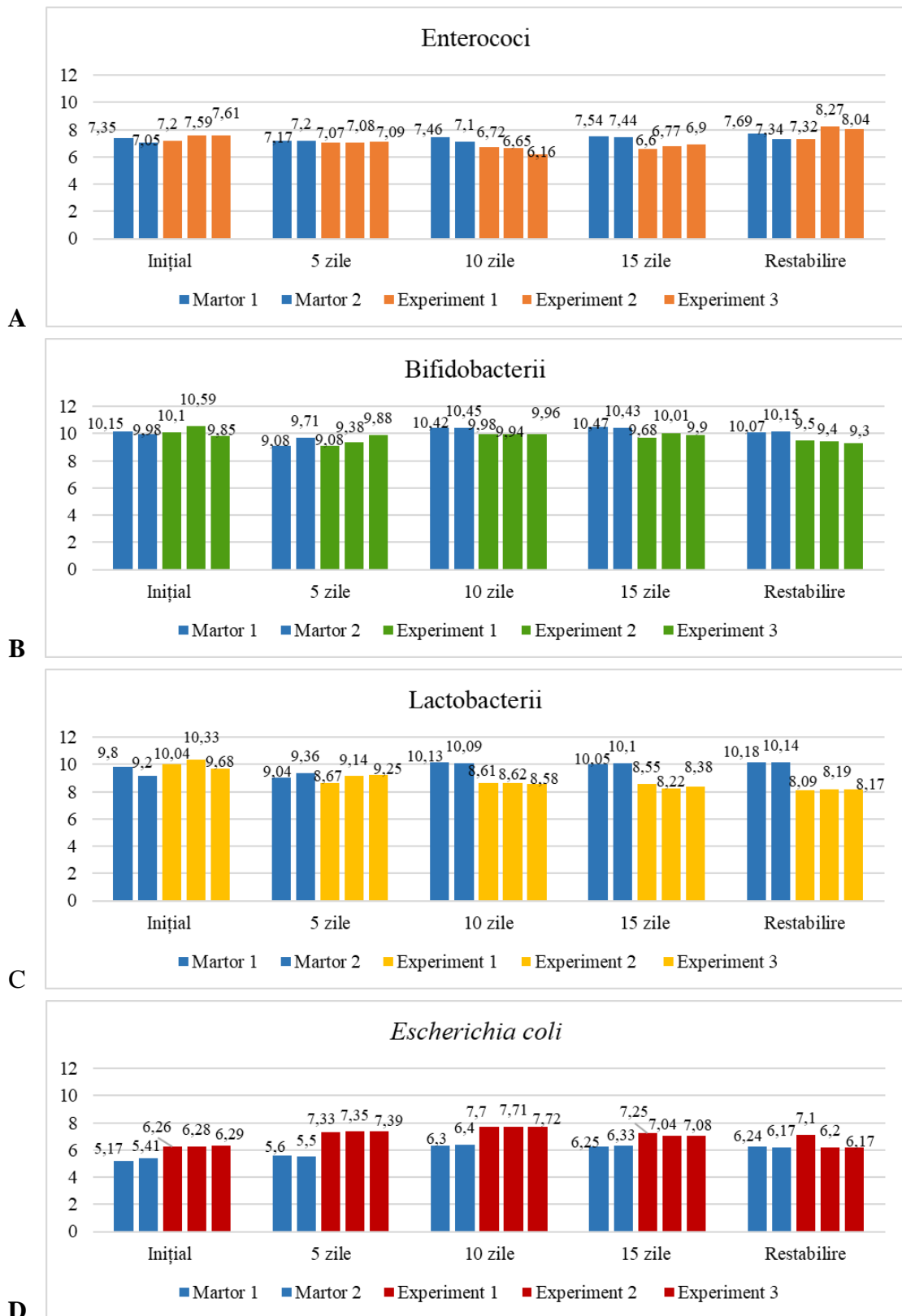


Figura 2. Conținutul de celule bacteriene de enterococi (A), bifidobacterii (B), lactobacterii (C) și *E. coli* (D) (lg la 1 g de conținut intestinal) la acțiunea în dinamică a rației cu exces de lipide

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

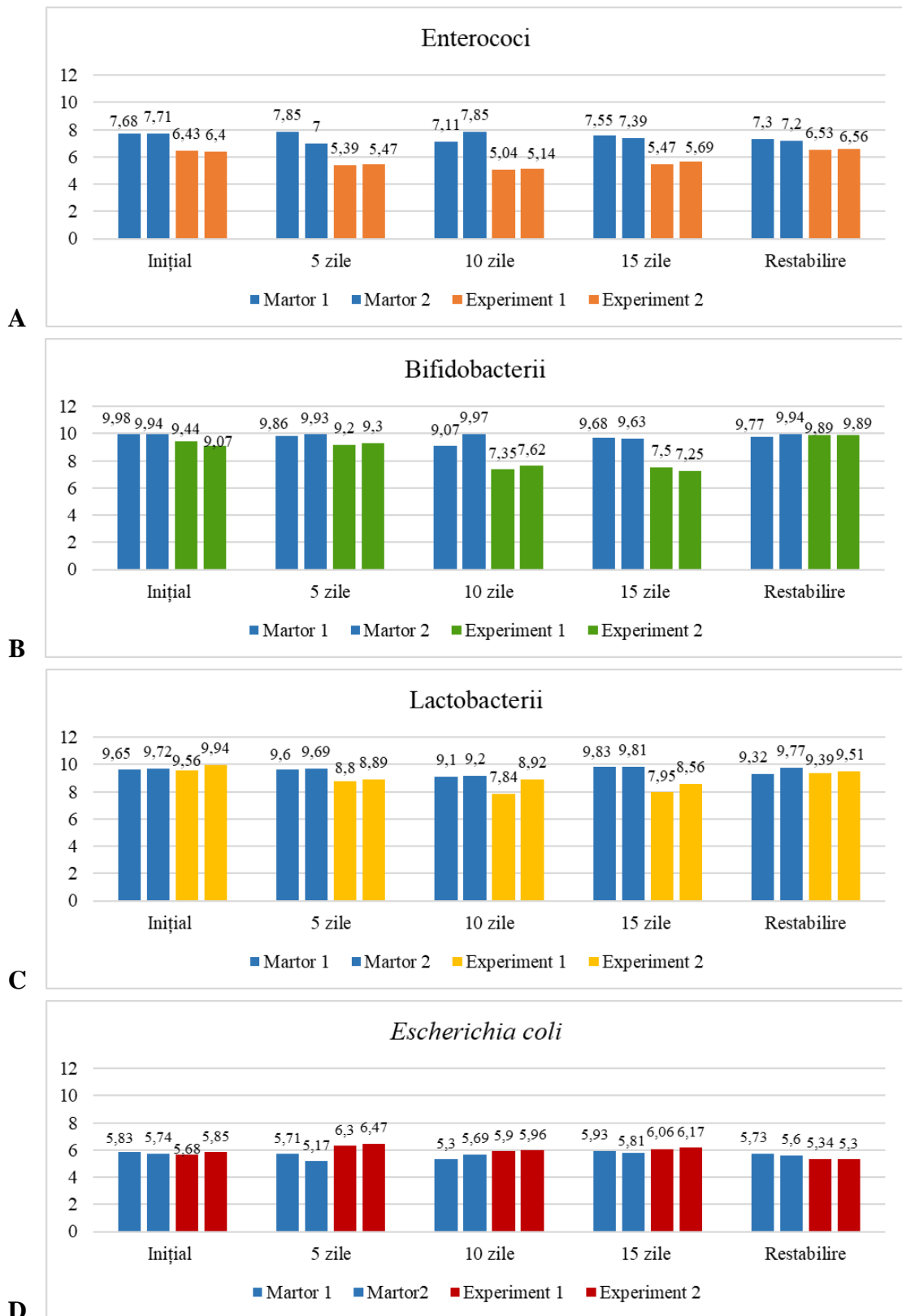


Figura 3. Conținutul de celule bacteriene de enterococi (A), bifidobacterii (B), lactobacterii (C) și *E. coli* (D) (lg la 1 g de conținut intestinal) la acțiunea în dinamică a rației cu exces de carbohidrați

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

Rezultatele obținute și analizate indică cert că consumul rațiilor în care predomină substanțial un anumit macronutrient influențează diferențiat efectivul enterococilor și, respectiv, microbiocenoza intestinală, iar excesul unora are efecte negative asupra reprezentanților microbieni intestinali, care se pot răsfrânge și asupra sănătății organismului gazdei. Modificările cantitative ale enterococilor în conținutul intestinal pe fondalul administrării rațiilor de diferită valoare nutritivă relevă caracterul de comensali al acestora, întrucât valorile numerice corelează pozitiv cu cele ale bacteriilor sanogene mediului intestinal și negativ cu microbii patogeni.

În **doua serie de experimente** a fost investigată acțiunea rațiilor alimentare cu diferită structură calorică. Inițial, șase rații alimentare (elaborate în cadrul Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie) cu diferită structură calorică au fost testate *in vitro* și ca rezultat au fost selectate patru rații, ce au avut acțiune diferită asupra indicilor numerici ai enterococilor: rația 1 (ce conține 8% proteine, 35% lipide și 57% carbohidrați), care a avut cel mai mare efect de inhibare numerică a bacteriilor; rația 4 (ce conține 11% proteine, 29% grăsimi și 60% glucide) și rația 6 (ce conține proteine – 14%, grăsimi – 25% și glucide – 61%), care 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 numărului acestor bacterii.

În scopul confirmării rezultatelor obținute *in vitro* au fost efectuate experimente *in vivo* pe șobolani albi de laborator, linia Wistar, care au fost grupați în patru loturi experimentale: în primul lot a fost administrată rația alimentară 1; în lotul II – rația 4; în lotul III – rația 5 și lotul IV – rația 6. În baza datelor obținute se observă, că în condiții *in vivo* caracterul modificărilor bacteriilor studiate diferă de cel stabilit *in vitro* (Figura 4).

Drept urmare, s-a constatat că indicii numerici finali ai microorganismelor din genul *Enterococcus* au crescut cu 69,27% în lotul I în cazul administrării rației nr. 1. La animalele din loturile experimentale II, III și IV pe parcursul administrării rațiilor testate s-a observat o creștere neesențială a cantității celulelor microbiene, respectiv cu 19,36%; 16,39% și 17,97%. 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. Acest lucru este evident la compararea indicilor numerici ai enterococilor cu cei ai bacteriilor din genul *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* și a *E. coli* (Figura 4.). Anterior administrării rațiilor alimentare (inițial) se constată un anumit raport dintre indicii numerici ai enterococilor și ai celorlalte grupe de bacterii, care este aproximativ identic în toate loturile experimentale. După administrarea rațiilor alimentare (final), corelațiile dintre grupele de bacterii investigate se schimbă, și anume: majorarea substanțială (cu 51,7% și 69,3%) a enterococilor și *E. coli*, comparativ cu bifido- și lactobacteriile în lotul I; creșterea mai mare (în medie cu 13% - 14%) a indicilor numerici ai bifidobacteriilor și lactobacteriilor și sporirea cu cca 17% a nivelului enterococilor și descreșterea nivelului de *E. coli* în loturile II, III și IV. S-a observat că rațiile alimentare cu un procent mai mare de proteină (rațiile cu nr. 4, 5 și 6) au avut cea mai benefică influență asupra indicilor numerici ai enterococilor și bacteriilor studiate în comparație (fapt stabilit și la testarea rațiilor de diferită valoare nutritivă).

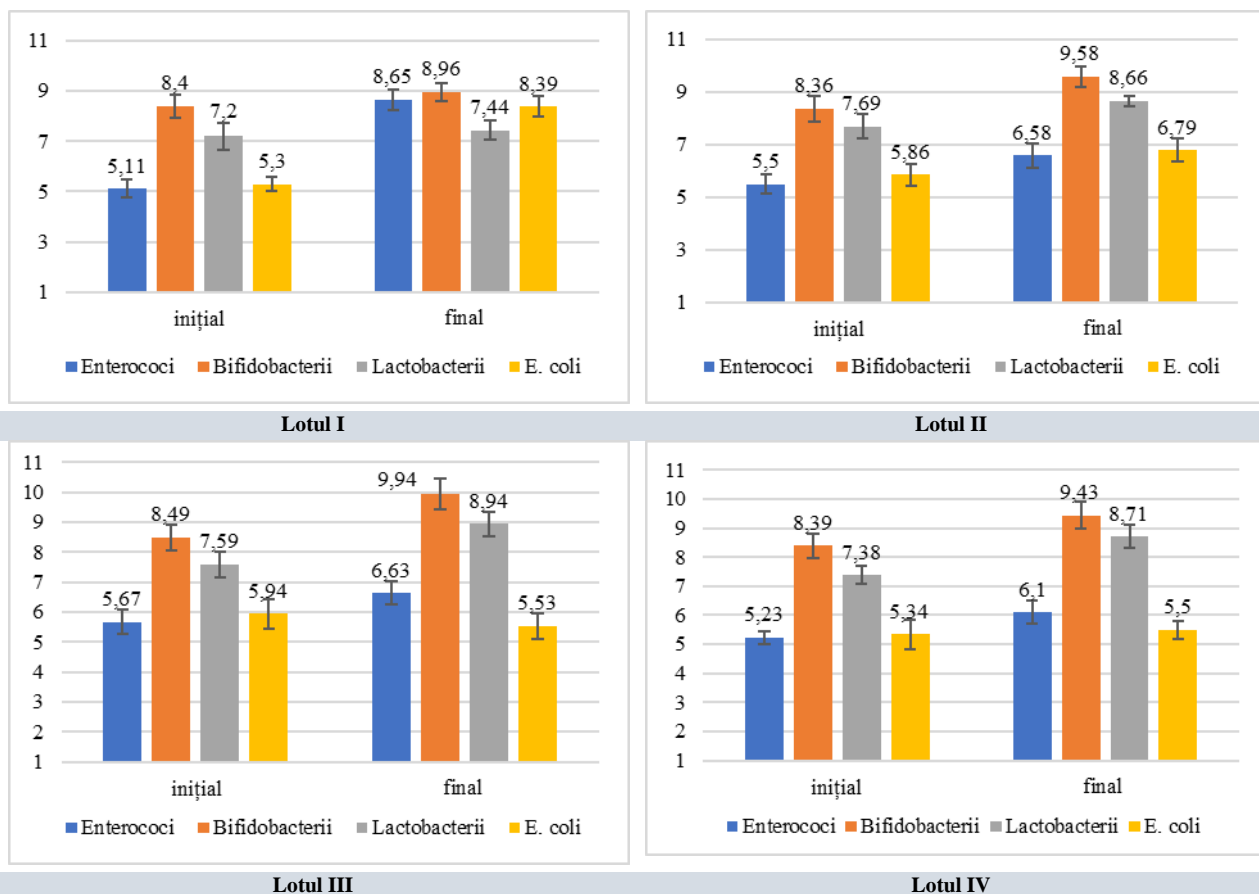


Figura 4. Modificarea indicilor numerici ai enterococilor în comparație cu alte bacterii intestinale la șobolani în funcție de administrarea rațiilor alimentare cu diversă structură calorică (lg la 1 g de conținut intestinal)

Rezultate identice au fost obținute și în experimente pe cobai, care au relatat aceeași corelație dintre valoarea numerică a enterococilor cu cea a bifidobacteriilor, lactobacteriilor și *E. coli* la administrarea rațiilor cu diferită structură calorică, fiind notată tendința de cooperare dintre enterococi cu bifidobacteriile și lactobacteriile în inhibarea multiplicării *E. coli*, în special, la animalele care au fost hrănite cu rația cu un conținut moderat de proteine, lipide și glucide.

Așadar, s-a constatat că rațiile alimentare cu diferită structură calorică manifestă acțiune diferită asupra procesului de multiplicare și dezvoltare a enterococilor intestinali, ceea ce presupune că nivelul numeric al enterococilor, precum și cel al altor bacterii intestinale poate fi reglat și menținut nu numai prin preparate microbiene cu acțiune probiotică, ci și prin utilizarea rațiilor alimentare, care manifestă acțiune prebiotică.

Valoarea numerică a enterococilor în corelație cu statutul fiziologic al organismului gazdei a fost studiată în condiții de înfometare și în corespundere cu statutul fizic (greutatea corporală) a animalelor model.

Modificarea efectivului enterococilor intestinali în condiții de inaniție (înfometare) 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 datelor a fost efectuată individual pentru fiecare animal din experiment. Drept martor, au servit animalele care au fost întreținute conform rației standard, aprobată pentru condiții de laborator (Figura 5).

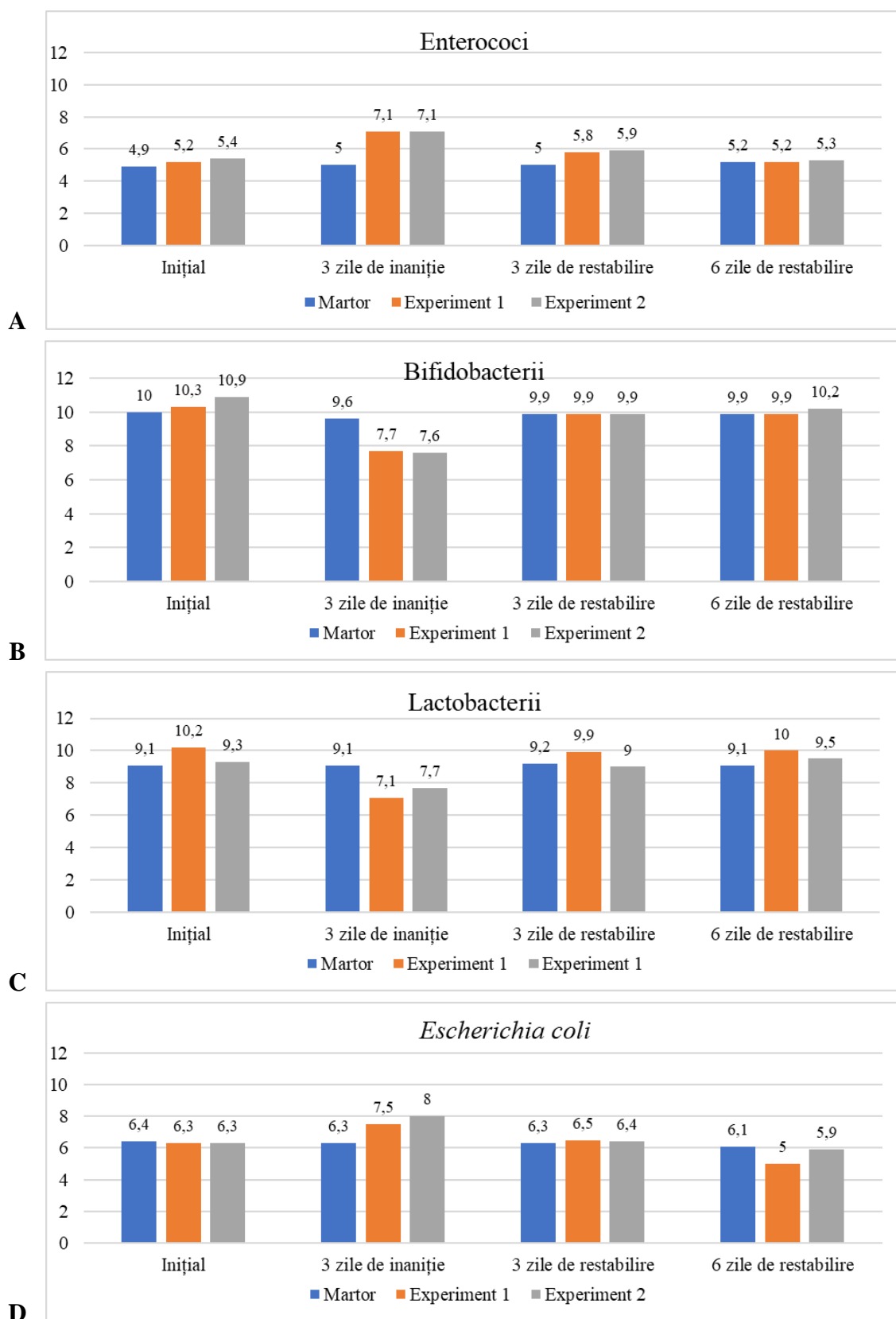


Figura 5. Modificarea cantității de celule bacteriene ale enterococilor (A), bifidobacteriilor (B), lactobacililor (C) și *E. coli* (D) (lg la 1 g de conținut intestinal) la șobolanii supuși inaniției (înfometării)

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

A fost stabilit, că lipsa totală a hranei timp de 72 de ore a determinat pe de o parte majorarea de 1,3-1,4 ori a conținutului de enterococi și de 1,2-1,3 ori a nivelului de *E. coli*, iar pe de altă parte reducerea de 1,34-1,44 ori a efectivului bifidobacteriilor și de 1,2-1,5 ori cel al lactobacteriilor. 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. Revenirea la un regim alimentar normal (3 și 6 zile) induce din nou modificări ale microbiocenozei intestinale, ceea ce indică despre restabilirea efectivului bacteriilor facultative și obligative la un nivel ce nu prezintă pericol sănătății tubului digestiv (Figura 5).

A prezentat interes elucidarea corelației dintre valoarea numerică a enterococilor, masa corporală și dietă. La animalele cu greutatea mai mică (în medie de 193,8 g) se atestă o cantitate mai mare a enterococilor (8,45 de celule microbiene (lg) la 1g de conținut intestinal), comparativ cu animalele cu masă corporală mai mare (în medie de 297,2 g), la care conținutul enterococilor este mai mic (5,75 de celule microbiene (lg) la 1g de conținut intestinal). Referitor la semnificația valorilor conținutului enterococilor la animalele cu masa corporală mai mică și mai mare se poate deduce prin compararea indicilor numerici ai enterococilor cu cei ai altor grupe de bacterii intestinale – bifidobacterii, lactobacterii și *E. coli*. Datele atestă o corelație dintre enterococi cu bifidobacteriile și lactobacteriile la grupul de animale cu greutate corporală mică. La aceste animale 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). 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. În cazul animalelor cu greutate corporală mai mare nu s-a observat o corelație dintre enterococi cu bifidobacteriile și lactobacteriile, în special, în menținerea unui nivel redus de *E. coli*, indicii numerici ai enterococilor fiind aproximativ de 1,6 ori mai mici față de bifidobacterii (5,75 vs 9,45), de 1,4 ori față de lactobacterii (5,75 vs 8,3) și de 1,2 față de *E. coli* (5,75 vs 6,68).

În scopul evidențierii corelației dintre indicii enterococilor cu cei ai masei corporale și dietă, șobolanilor albi linia Wistar, le-au fost administrate rații alimentare, special elaborate în corespundere cu principiile de corecție a greutății corporale. Pentru animalele cu greutatea corporală mai mică (lotul I) 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%, iar pentru animalele cu greutatea corporală mai mare (lotul II), rațiile elaborate au aceeași tendință de creștere a raportului procentual al proteinelor, de la 20% până la 30% și de micșorare a raportului procentual al lipidelor, de la 25% până la 21%. Cota-parte a glucidelor nu s-a modificat esențial. Animalele din lotul martor au primit rații alimentare standard destinate pentru întreținerea animalelor de laborator (Tabelul 4).

Tabelul 4. Caracteristica cantitativă a componentelor de bază a rațiilor alimentare administrate șobolanilor cu masă corporală diferită

Componentele nutritive din rațiile 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
Carbohidrați	58	58	57	57
	Lotul II (masa corporală mare)			
Proteine	20	22	25	30
Lipide	25	23	22	21
Carbohidrați	55	55	53	49

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. Rațiile alimentare special concepute pentru corecția greutății corporale, la animalele cu greutatea mică au determinat o fluctuație a nivelului de enterococi, ceea ce denotă despre influența altor factori asupra stării microbiocenozei intestinale. La animalele cu greutate mai mare, manipularea structurii nutrienților din rație, și anume, majorarea procentului de proteine și scăderea celui de lipide și carbohidrați (subgrupele 3 și 4 din lotul II) a contribuit la creșterea numărului de enterococi în conținutul intestinal al acestora (Figura 6).

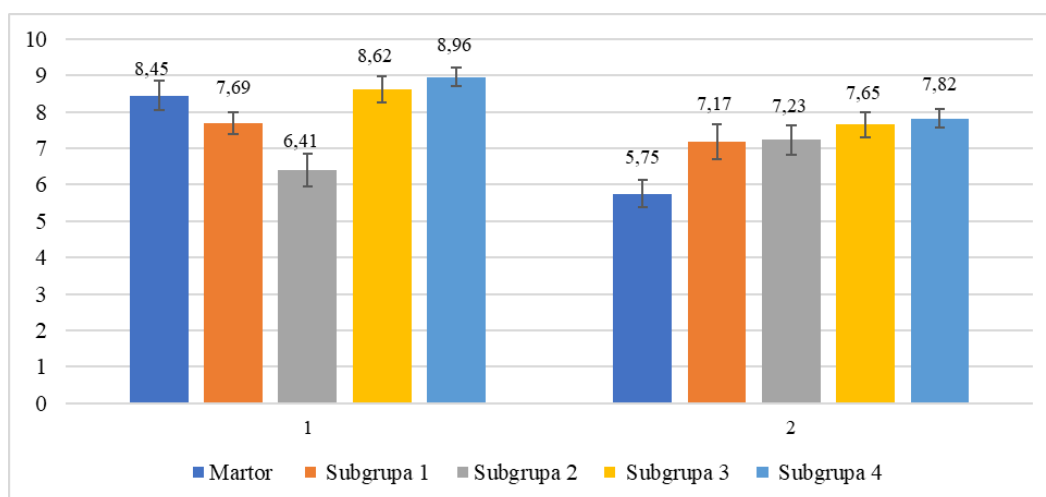


Figura 6. Cantitatea de celule microbiene de enterococi (lg la 1 g de conținut intestinal) la șobolanii cu masa corporală mai mică (1) și mai mare (2) la administrarea rațiilor cu diferit raport procentual al componentelor nutritive (subgrupele 1-4)

Datele obținute atestă că alimentația, prin diferite diete, grupuri de alimente și macronutrienți, 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.

În capitolul 4 „**Prospecțiunea noilor tulpini de enterococi în calitate de probiotice**” sunt descrise datele privind izolarea tulpinilor de enterococi și studierea capacității de adeziune și activității antagoniste față de patogeni ale acestora în vederea utilizării lor ca probiotice, compatibilitatea enterococilor cu alte bacterii specifice microbiocenozei tubului digestiv și

testarea eficienței compozițiilor noi microbiene pe bază de enterococi asupra stării microbiotei intestinale.

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) sănătoși. 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 tulpini de enterococi. De la animale sănătoase (purcei și viței) au fost izolate 407 și respectiv 120 de tulpini de bacterii coliforme, dintre care corespunzător 209 și 54 de tulpini au constituit enterococii. Tulpinile izolate de *Enterococcus*, *Lactococcus* și *Streptococcus* au fost testate după proprietatea de adeziune și activitatea antagonistă manifestată față de bacteriile patogene *in vitro*, care 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 sunt importante în definirea preparatelor probiotice.

S-a remarcat că proprietățile adezive ale monotulpinilor de enterococi au fost mai evidente, comparativ cu indicii obținuți pentru strepto- și lactococi, iar activitatea antagonistă față de patogeni fiind, de asemenea, mai mare la tulpinile de enterococi. Aceste proprietăți sunt mai evidente la tulpinile de enterococi specifice tractului digestiv uman, în comparație cu cele specifice tractului digestiv animal (Tabelul 5).

Tabelul 5. Capacitatea adezivă și activitatea antagonistă față de bacteriile patogene ale unor tulpini de enterococi, streptococi și lactococi, izolate din tractul gastrointestinal al subiecților umani (copii), vițelilor și purceilor cu statut sănătos al tubului digestiv

Numărul de monotulpini testate	Genul bacteriilor	Indicele de adeziune	Activitatea antagonistă (%) față de patogenii			
			<i>E. coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Subiecți umani (copii)						
834	301	<i>Enterococcus</i>	4,58-4,77	85,45-89,35	71,25-77,57	78,40-85,70
	297	<i>Streptococcus</i>	3,66-4,37	72,35-79,69	69,64-75,40	74,55-82,60
	236	<i>Lactococcus</i>	3,16-3,70	68,75-70,37	59,45-65,60	71,25-76,75
Viței						
120	54	<i>Enterococcus</i>	4,28-4,66	81,39-85,62	64,40-68,59	69,27-75,37
	37	<i>Streptococcus</i>	3,13-3,46	65,71-68,44	57,32-61,18	64,65-70,20
	29	<i>Lactococcus</i>	2,62-3,04	58,39-63,25	63,46-66,31	56,78-61,58
Purcei						
407	209	<i>Enterococcus</i>	4,38-4,50	82,35-86,48	66,75-70,20	70,60-77,45
	127	<i>Streptococcus</i>	3,25-3,62	67,46-69,37	62,57-68,32	66,51-71,25
	71	<i>Lactococcus</i>	2,90-3,30	62,50-66,35	58,64-63,47	60,72-65,54

Fiecare tulpină de microorganisme poate avea proprietăți distincte, iar în componența remediilor de origine bacteriană, inclusiv probiotice, sunt incluse anumite tulpini de microorganisme, care întrunesc criteriile stabilite pentru acest tip de preparate/remedii, precum și cerințele de siguranță (să fie nepatogene). Din tulpinile izolate de bacterii acidolactice au fost selectate și evidențiate anumite tulpini, care ulterior au fost testate din nou pentru capacitatea lor adezivă și activitatea antagonistă. Principiul de selectare a tulpinilor 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 preparatele probiotice), privind capacitatea de adeziune și activitatea antagonistă/antibacteriană individuale ale lor față de patogeni (Tabelul 6.).

Tabelul 6. Capacitatea de adeziune și activitatea antagonistă ale tulpinilor de bacterii acidolactice (enterococi și lactococi) specifice tractului digestiv uman și animal

Numărul tulpinii izolate	Indicele de adeziune	Activitatea antagonistă (%) față de patogenii:	
		<i>Escherichia</i>	<i>Salmonella</i>
Din conținutul intestinal de la subiecții umani			
<i>Monotulpini de enterococi</i>			
18	3,18	29,74	19,94
49	4,14	23,24	19,14
58	4,12	22,27	19,45
70	4,16	26,28	25,42
89	3,98	20,95	25,85
108	4,10	22,85	19,78
112	4,16	24,34	23,07
116	4,67	32,16	25,53
<i>Monotulpini de lactococi</i>			
25	4,27	24,60	23,09
32	4,15	24,47	19,36
46	4,10	21,96	21,45
67	4,08	21,41	20,44
82	4,11	23,87	19,76
85	4,14	25,30	23,43
93	4,12	24,01	22,37
Din conținutul intestinal de la animale			
<i>Monotulpini de enterococi</i>			
13	3,18	24,60	23,09
21	3,59	24,47	19,36
43	3,24	21,96	21,45
55	2,81	21,41	20,44
74	3,72	23,87	19,76
77	3,85	25,30	23,43
97	3,57	24,01	22,37
129	3,65	24,60	23,09
<i>Monotulpini de lactococi</i>			
37	3,45	18,13	17,02
64	3,44	17,72	15,91
101	3,12	14,35	13,56

Toate tulpinile de enterococi, izolate pentru prima dată, au arătat un anumit potențial ce ar permite utilizarea lor ca probiotice, exprimat prin capacitatea sporită de adeziune și proprietate înaltă de combatere a patogenilor (activitate antagonistă). 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 includerea ulterioară în componența unor compoziții cu efect probiotic.

În baza proprietăților descrise au fost elaborate compoziții bacteriene, ce conțineau tulpini de enterococi și bacterii din genurile *Bifidobacterium* și *Lactobacillus* și testate în comparație cu alte preparate microbiene comercializate. Testarea a fost efectuată în baza

modificării indicilor cantitativi ai unor reprezentanți microbieni intestinali cu acțiune sanogenă și patogenă (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Proteus*) din conținutul intestinal la șoarecii albi de laborator în rezultatul administrării preparatelor cunoscute și compozițiilor elaborate (Tabelul 7.).

Tabelul 7. Indicii cantitativi ai unor bacterii intestinale (la șoareci albi) la administrarea diferitor preparate microbiene

Loturile experimentale, preparatul administrat	Grupele de microorganisme evaluate	Numărul de celule microbiene per 1 g de conținut intestinal, logaritm zecimal (lg)		Deosebirea (%), comparativ cu:	
		<i>la început</i>	<i>la sfârșit</i>	datele inițiale	martor
I Martor	<i>Bifidobacterium</i>	7,20±0,12	7,82±0,10*	+8,61	
	<i>Lactobacillus</i>	6,11±0,11	6,77±0,11**	+10,80	
	<i>Escherichia</i>	8,53±0,11	9,49±0,12***	+11,25	
	<i>Proteus</i>	3,04±0,10	4,14±0,08***	+26,18	
	<i>Enterococcus</i>	6,49±0,12	7,23±0,13**	+11,40	
II Bifidobacterin	<i>Bifidobacterium</i>	7,17±0,08	9,41±0,07***	+31,24	+20,64
	<i>Lactobacillus</i>	6,88±0,12	7,72±0,09***	+12,20	+14,30
	<i>Escherichia</i>	8,84±0,13	7,46±0,12***	-15,61	-21,39
	<i>Proteus</i>	3,11±0,09	2,07±0,10***	-33,44	-50,00
	<i>Enterococcus</i>	6,77±0,11	7,90±0,14***	+19,99	+9,26
III Lacidofil	<i>Bifidobacterium</i>	7,53±0,11	8,04±0,13*	+8,05	+2,81
	<i>Lactobacillus</i>	6,32±0,12	8,32±0,10***	+31,64	+22,89
	<i>Escherichia</i>	8,96±0,10	7,54±0,14***	-15,84	-20,54
	<i>Proteus</i>	3,00±0,13	1,23±0,12***	-59,00	-70,28
	<i>Enterococcus</i>	6,84±0,15	7,04±0,13	+2,92	+2,62
IV Biform	<i>Bifidobacterium</i>	7,23±0,13	9,20±0,12***	+18,03	+17,64
	<i>Lactobacillus</i>	6,63±0,11	7,70±0,13***	+16,13	+13,73
	<i>Escherichia</i>	8,68±0,12	6,82±0,10***	-21,42	-28,13
	<i>Proteus</i>	3,07±0,11	1,17±0,10***	-61,88	-71,73
	<i>Enterococcus</i>	6,54±0,14	8,62±0,10***	+31,80	+19,22
V Compoziție nouă experimentală, ce conține tulpinile selectate de enterococi	<i>Bifidobacterium</i>	7,60±0,10	9,47±0,13***	+24,60	+21,09
	<i>Lactobacillus</i>	6,50±0,11	8,65±0,09***	+33,07	+27,76
	<i>Escherichia</i>	8,46±0,12	5,79±0,11***	-28,25	-38,98
	<i>Proteus</i>	3,17±0,08	0***	-100,0	-100,0
	<i>Enterococcus</i>	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).

Compoziția elaborată pentru prima dată pe baza tulpinilor de microorganisme din genul *Enterococcus* (ce au manifestat cele mai bune rezultate privind capacitatea de adeziune și activitatea antagonistă) și cele din genurile *Bifidobacterium* și *Lactobacillus* a avut cel mai benefic efect asupra microbiocenozei intestinale exprimat prin majorarea indicilor numerici ai bacteriilor obligative. Compoziția microbială nouă s-a dovedit de a avea o acțiune mai mare de inhibare a bacteriilor patogene (*Escherichia* și *Proteus*). Sporirea efectivului de enterococi, în acest caz, nu poate fi asociată cu anumite disfuncții intestinale, deoarece corelează cu valorile ridicate ale bifidobacteriilor și lactobacililor și cele diminuate ale escherichiilor și proteilor (Tabelul 7.).

Un alt aspect important ce reflectă proprietățile speciilor și tulpinilor de bacterii care pot fi utilizate în calitate de probiotice reprezintă gradul de compatibilitate dintre bacteriile intestinale. Astfel, un obiectiv al cercetărilor, ce vizează determinarea și identificarea tulpinilor

de enterococi cu proprietăți 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. 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*), 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 ca agenți patogeni nosocomiali.

În experimente pe cobai au fost testate compoziții microbiene nou elaborate 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. În acest scop, animalele au fost divizate, după cum urmează: în lotul I (martor) animalele nu au primit nici un 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. Toate preparatele au fost administrate oral, pe fondul dismicrobismului intestinal (caracterizat prin nivelul mai mic de bifidobacterii și lactobacili și nivelul ridicat de *Escherichia* și *Proteus*) (Tabelul 8.).

Tabelul 8. Indicii cantitativi ai microorganismelor intestinale la cobai la administrarea compozițiilor microbiene nou elaborate

Lotul animalelor	Genurile de bacterii	Numărul de celule microbiene la 1g de conținut intestinal, logaritmi zecimali (lg)		Deosebirea, %	
		Inițial	Final	de inițial	de martor
I	<i>Bifidobacterium</i>	4,34±0,14	4,50±0,13	+3,68	
	<i>Lactobacillus</i>	4,17±0,15	4,59±0,14	+10,07	
	<i>Escherichia</i>	8,83±0,16	8,88±0,15	+0,56	
	<i>Proteus</i>	5,11±0,15	5,23±0,14	+2,34	
	<i>Enterococcus</i>	8,74±0,14	8,92±0,13	+2,05	
II	<i>Bifidobacterium</i>	4,47±0,12	8,36±0,11***	+87,02	+85,77
	<i>Lactobacillus</i>	4,32±0,15	8,64±0,08***	+100,00	+88,23
	<i>Escherichia</i>	8,81±0,13	5,73±0,15***	34,96	35,47
	<i>Proteus</i>	5,04±0,11	1,17±0,07***	76,78	77,62
	<i>Enterococcus</i>	8,80±0,16	6,49±0,13***	26,25	27,24
III	<i>Bifidobacterium</i>	4,53±0,15	9,04±0,09***	+99,55	+100,88
	<i>Lactobacillus</i>	4,43±0,13	9,17±0,07***	+100,00	+99,78
	<i>Escherichia</i>	8,90±0,16	5,32±0,14***	40,22	40,09
	<i>Proteus</i>	5,20±0,12	1,07±0,08***	79,42	98,08
	<i>Enterococcus</i>	8,77±0,14	6,41±0,11***	26,90	28,13

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

S-a stabilit că compoziția microbiană testată ce conținea enterococi (lotul III) a determinat sporirea 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 și a avut cea mai mare acțiune de inhibare a *Escherichia*

(cu cca 40%) și *Proteus* (cu 79% față de datele inițiale și cu 98% față de martor). Nivelul enterococilor s-a micșorat la animalele din lotul III, fiind atestat aproximativ același grad de inhibare ca și în lotul II (cu cca de 26%-28%) (Tabelul 8.).

Aceste modificări ale efectivului de bacterii obligative și facultative denotă despre acțiunea benefică a compozițiilor microbiene experimentate și demonstrează oportunitatea includerii în componența remediilor cu acțiune probiotică (sanogenă) nu numai a bacteriilor obligative (*Bifidobacterium* și *Lactobacillus*), dar și a unor comensali, cum ar fi enterococii și lactococii, care fiind parte a asociațiilor microbiene testate au contribuit la eliminarea dismicrobismului și stabilirea eubiozei intestinale.

Eficacitatea compozițiilor microbiene pe baza monoculturii și asociațiilor de microorganisme, ce conțin tulpini de enterococi, a fost dovedită și pe animalele agricole tinere (viței și porci) în condiții de fermă industrială. A fost demonstrat efectul benefic al lor în prevenirea gastroenteritei bacteriene, ce are acțiune asupra creșterii rezistenței naturale a animalelor și productivității lor.

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 „coalitii” 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 porci), 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 vițelilor și porcelor, 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 porcelor și vițelilor 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.

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. 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).
2. BERGEY, D.H., HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1994. 976 p. ISBN 9780683006032.
3. 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]
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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](https://doi.org/10.1186/s13213-023-01744-5). ISSN 1590-4261.
8. 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.

9. 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.
10. LEDERBERG, J. Infectious history. In: *Science*. 2000, nr. 288(5464), pp. 287-93. doi: 10.1126/science.288.5464.287.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. БАННИКОВА, Л.А. *Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности*. М., Пищ. пром-ть, 1975, 256 с.
20. БОГДАНОВ, В. Молочнокислая микрофлора молока и ее источники. В: *Труды ВНИМИ*, 1959, выпуск 20, 70 с.
21. ГАРМАШЕВА, И.Л., КОВАЛЕНКО, Н.К. Биологическая активность и безопасность энтерококков. В: *Мікробіологічний журнал*. 2011, nr. 4(73), pp.77-84. ISSN 1028-0987.
22. 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 Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2011b, nr. 2(314), pp. 4-15. ISSN 1857-064X.

23. 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.

LISTA PUBLICAŢIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI

2. Articole în reviste ştiinţifice

2.1. în reviste din bazele de date Web of Science şi SCOPUS

1. **BOGDAN, V.**, VRABIE, V., CIOCHINĂ, V. The influence of the food ration on the process of multiplication and development of the intestinal enterococcus component. *Scientific Papers. Series D. Animal Science*. Vol. LXIV, Nr. 1, 2021, pp. 121-128. ISSN 2285-5750. ISSN CD-ROM 2285-5769. ISSN Online 2393-2260. ISSN-L 2285-5750.
2. **BOGDAN, V.**, VRABIE, V. The influence of new microbial associations on the some functional parameters of calves and piglets. *Scientific Papers. Series D. Animal Science*. Vol. LXIV, Nr. 2, 2021, pp. 95-102. ISSN 2285-5750. ISSN CD-ROM 2285-5769. ISSN Online 2393-2260. ISSN-L 2285-5750.
3. **BOGDAN, V.**, VRABIE, V., CIOCHINĂ, V. Adhesion and antagonists properties of enterococcus monocultures and the opportunity of their use as probiotics. *Scientific Papers. Series D. Animal Science*. Vol. LXV, Nr.1, 2022, pp. 127-132. ISSN 2285-5750. ISSN CD-ROM 2285-5769. ISSN Online 2393-2260. ISSN-L 2285-5750.

2.2. în reviste din alte baze de date acceptate de către ANACEC (cu indicarea bazei de date)

4. **BOGDAN, V.**, VRABIE, V. The effectiveness of new associations of useful bacteria as probiotics for birds. *Oltenia. Studii si comunicari. Stiintele Naturii*. 2021, Vol. 37, Nr. 2, pp. 107-112. ISSN 1454-6914 (Zoological Record/WoS).
5. **BOGDAN, V.**, VRABIE, V. The peculiarities of the bird's digestive tract colonization by some representatives of the intestinal microbiota. *Oltenia. Studii si comunicari. Stiintele Naturii*. 2022, Vol. 38, Nr.2, pp. 111-118. ISSN 1454-6914 (Zoological Record/WoS).
6. 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. În: *Oltenia. Studii si comunicari. Stiintele Naturii*. 2023, Vol 39, Nr.2, pp. 139-146. ISSN 1454-6914 (Zoological Record/WoS).

2.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil (Categorie B)

7. TIMOȘCO, M., **BOGDAN, V.**, VELCIU, A. Lactobacilii – microorganisme intestinale determinante ale stării sănătății organismului. În: *Buletin de Perinatologie*. 2016, nr. 4(72), pp. 41-45. ISSN 1810-5289.
8. **BOGDAN, V.** Incidența streptococilor intestinali și rolul lor în sănătatea organismului. În: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2016, nr. 3(330), pp. 59-64. ISSN 1857-064X.
9. TIMOȘCO, M., **BOGDAN, V.**, VELCIU, A. Utilitatea unor genuri de bacterii intestinale și semnificația lor în sănătatea organismului. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Ştiinţe Reale și ale Naturii*. 2016, nr. 6(96), pp. 52-57. ISSN 1814-3237.

10. **BOGDAN, V., TIMOȘCO, M.** Viziuni contemporane privind unele aspecte fiziologice importante pentru tubul digestiv. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2019, nr. 1(337), pp. 35-42. ISSN 1857-064X.
11. **BOGDAN, V.** Sănătatea organismului în funcție de nivelul streptococilor intestinali. În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2019, nr. 4(82), pp. 280-284. ISSN 1729-8687.

3. Articole în culegeri științifice

3.2. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

12. **BOGDAN, V., TIMOȘCO, M.** Diversitatea streptococilor intestinali în tubul digestiv al copii de diversă vârstă. In: *Materialele Conferinței științifice a doctoranzilor (cu participare internațională): „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”*, Ediția VII, 15 iunie 2018, Chișinău. Chișinău: Tipogr. „Biotehdesign”, 2018, Ediția 7, Vol.1, pp. 136-142. ISBN 978-9975-108-45-4.

3.4. în lucrările conferințelor științifice naționale

13. **BOGDAN, V., TIMOȘCO, M.** Compatibilitatea streptococilor intestinali cu alți reprezentanți ai microcenozei tubului digestive. În: *Materialele Conferinței științifice a doctoranzilor: „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”*, Ediția VIII, 10 iunie 2019, Chișinău. Chișinău: Tipogr. „Biotehdesign”, 2019, Ediția 8, Vol.1, pp. 61-66. ISBN 978-9975-108-66-9.
14. **BOGDAN, V., VRABIE, V.** Efectul probiotic al biomasei de *Enterococcus faecium* asupra echilibrului microflorei intestinale. În: *Materialele Conferinței științifice naționale a doctoranzilor dedicată aniversării a 75-a a USM: „Metodologii contemporane de cercetare și evaluare”*, 22-23 aprilie 2021, Chișinău. Chișinău: CEP USM, 2021, pp. 21-25. ISBN 978-9975-159-16-6.

4. Teze în culegeri științifice

4.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

15. **БОГДАН, В.К., СТРУТИНСКИЙ, Ф.А., ЧОКИНЭ, М.С., ПОЛЯКОВА, Л.Д., ФИЛОНОВ, А.В.** Колонизация саногенными микроорганизмами пищеварительного тракта поросят-сосунов при выращивании на промышленных комплексах. In: *Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates: Abstracts of the 2st International Scientific and Practical Internet Conference*. Dnipro, 2021, P.1., pp. 209-211.

4.2. în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

16. **BOGDAN, V., TIMOȘCO, M., CODREANU, S.** Streptococi specific to the digestive tract and opportunities for their inclusion in probiotics. In: *The International Scientific Conference on Microbial Biotechnology dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutions and the 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova*, 12-13 octombrie 2016, Chișinău. Chișinău: Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, 2016, Ediția 3, p. 95.
17. **BOGDAN, V., TIMOȘCO, M.** Utility of some species of intestinal streptococi for the organism. In: *The International Scientific Conference on Microbial Biotechnology*. 11-12 octombrie 2018. Chișinău: Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, 2018, Ediția 4, p. 63. ISBN 978-9975-3178-8-7.

18. **BOGDAN, V.**, VRABIE, V. Microbiological studies of *Enterococcus faecium* biomass for the elimination of the adverse effects of antibiotherapy and the restoration of the microbial balance. In: *Yesterday's heritage – implications for the development of tomorrow's sustainable society*: International scientific conference, 11-12 februarie, 2021, Ediția 3, Chișinău, pp. 40-41. Iași-Chișinău, 2021. pp. 40-41. ISSN 2558 – 894X.
19. **BOGDAN, V.** The role of individual members of the family Streptococcaceae in the health of the organism under different types of nutrition. In: The 5th International Scientific Conference on Microbial Biotechnology. 12-13 october 2022, Ediția 5, Chișinău: Artpoligraf, p. 76. ISBN: 978-9975-3555-6-8. ISBN (pdf): 978-9975-3555-7-5

4.3. în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională

20. **BOGDAN, V.** Human and animal digestive tube - specific ecological niche for streptococci. In: *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community*: Abstract book for national conference with international participation, Ed. 1, 21-22 octombrie 2019, Chișinău: Tipogr. „Biotehdesign”, 2019, p. 87.
21. **BOGDAN, V.** Specific streptococci of the digestive tract and their suitability for inclusion in probiotic preparations. In: *Life sciences in the dialogue of generations: Connections between universities, academia and business community*: Abstract book of The National Conference with International Participation. 29-30 September, 2022, Chisinau. Chișinău: Editura USM, 2022, p. 83. ISBN 978-9975-159-80-7.
22. LEORDA, A., **BOGDAN, V.**, CIOCHINĂ, M. Impactul compozițiilor prebiotice cu efect hipoglicemiant asupra microbiotei intestinale la șobolani. În: *Integrare prin cercetare și inovare*: Culegerea de rezumate ale Conferinței științifice naționale cu participare internațională dedicată zilei internaționale a științei pentru pace și dezvoltare. Seria științe ale naturii și exacte, 10-11 noiembrie, 2022, Chișinău. Chișinău: CEP USM, p. 73-75. ISBN 978-9975-62-469-5.

ADNOTARE

BOGDAN Victoria „Rolul fiziologic al enterococilor intestinal în menținerea sănătății tubului digestiv”, teză de doctor în științe biologice, 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 și 36 de tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 22 de lucrări științifice.

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

Scopul lucrării a constat în 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 intestinali în tubul digestiv uman și animal în funcție de statutul fiziologic al organismului; studierea acțiunii factorului alimentar asupra conținutului enterococilor intestinali și evidențierea rolului acestora în menținerea echilibrului microbial 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 microbial 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 deduce despre echilibrul microbial 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 patogenilor 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 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 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.

ANNOTATION

BOGDAN Victoria „The physiological role of intestinal enterococci in maintaining the health of the digestive tract”, doctoral thesis in biological sciences, Chişinău, 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 denotes about 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 Sanocrotology, Moldova State University.

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 выявлении 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 кишечника 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.

BOGDAN Victoria

**ROLUL FIZIOLOGIC AL ENTEROCOCILOR
INTESTINALI ÎN MENTINEREA SĂNĂTĂȚII TUBULUI
DIGESTIV**

165.01 – Fiziologia omului și animalelor

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 30.07.2024
Hârtie ofset. Tipar ofset.
Coli de tipar: 2.0

Formatul hârtiei: 60×84 1/16
Tiraj: 35 exemplare
Comanda nr. 02-08/24

„Tipocart-Print” S.R.L.
Str. A. Pușkin, 22, of. 523, Chișinău, MD-2012