

REZUMAT

al tezei doctorale intitulată:

IMPACTUL *BOLETUS EDULIS* ÎN MICROBIOTA INSTINALĂ UMANĂ ȘI *SALMO SALAR*, CU TRANSFERUL GENELOR DE REZISTENȚĂ LA ANTIBIOTICE ÎN *SALMO SALAR*

Doctorand: Alexandru-Stefan Barcan

Conducător științific: Prof. Univ. Dr. Emanuel Vamanu

CUVINTE-CHEIE: Ciuperci, *Boletus edulis*, Microbiontă intestinală, *Salmo Salar*,
Sisteme *in vitro*, Plasmidă, Conjugatie bacteriană

Ciupercile au fost apreciate de mult timp pentru beneficiile lor nutriționale și medicinale, polizaharidele fiind o componentă cheie a proprietăților lor de promovare a sănătății. Acești carbohidrați complecși, găsiți din abundență în ciuperci, servesc ca sursă de hrană pentru bacteriile benefice din intestinul animal. Hrănind aceste bacterii, polizaharidele din ciuperci ajută la menținerea unei microbiote sănătoase, esențiale pentru sănătatea generală, inclusiv pentru digestia îmbunătățită și funcția imunitară sporită. În plus, înțelegerea modului în care rezistența antimicrobiană (AMR) se răspândește este esențială, deoarece reprezintă o amenințare semnificativă pentru sănătatea umană și animală. Această teză doctorală explorează potențialul *Boletus edulis* (BEE), o ciupercă sălbatică cunoscută pentru proprietățile sale culinare și medicinale, de a influența microbiota intestinală atât la oameni, cât și la somonul Atlantic (*Salmo Salar*). Studiul își propune să evalueze impactul BEE asupra sănătății intestinale, proprietățile sale prebiotice și antioxidante cât și transferul genelor de rezistență antimicrobiană (AMR) utilizând sisteme avansate de simulare a intestinului artificial. Obiectivele tezei au fost următoarele: (i) realizarea unei revizuri sistematice prin consultarea celor mai recente cercetări din domeniu pentru a evalua impactul polizaharidelor din ciuperci asupra microbiotei intestinale, răspunsurilor imunitare și noile documentații în legătură cu transferului rezistenței antimicrobiene; (ii) compararea extractului de *Boletus edulis* cu alte specii de ciuperci și utilizarea unui simulator gastrointestinal avansat; (iii) testarea efectelor extractului de *Boletus edulis* asupra microbiotei intestinale umane afectate de antibiotice folosind sistemul artificial de intestin; (iv) evaluarea impactului prebiotic al diferitelor doze de extract de *Boletus edulis* asupra microbiotei intestinale a somonului Atlantic utilizând un simulator de intestin artificial; și (v) investigarea rezultatelor potențiale atunci când o bacterie care poartă un plasmid multirezistent este introdusă într-o comunitate bacteriană și supusă presiunii selective prin tratament cu antibiotice.

Pe baza acestor obiective, capitolele bibliografice inițiale prezintă o revizuire sistematică a studiilor recente din domeniul relevant, cuprinzând influența polizaharidelor din ciuperci asupra microbiotei intestinale umane și a somonului atlantic. Aceste capitole subliniază, de asemenea, importanța utilizării sistemelor artificiale de intestin pentru a evalua efectele prebiotice și probiotice asupra unei game largi de microbi care influențează sănătatea gazdei. Este evidențiată și fiabilitatea acestor sisteme *in vitro* în simularea răspândirii rezistenței antimicrobiene.

Primul capitol examinează pe larg rolul polizaharidelor din ciuperci, în special impactul acestora asupra compoziției și sănătății microbiotei intestinale atât la oameni, cât și la somon. Utilizarea sistemelor artificiale de intestin este explorată în detaliu, demonstrând eficiența acestora în identificarea efectelor prebiotice și probiotice în diverse populații microbiene. Aceste sisteme oferă perspective valoroase asupra

interacțiunilor dintre componentele alimentare și microbiota intestinală, ajutând la dezvoltarea intervențiilor de sănătate țintite.

În continuare, al doilea capitol investighează perspectivele genomice asupra mecanismelor de transfer al genelor bacteriene. Procesele tradiționale de transfer orizontal al genelor, cum ar fi conjugarea, transformarea și transducția, sunt discutate alături de mecanisme nou descoperite, cum ar fi transpoziția și vesiculația. Acest capitol elucidează modul în care bacteriile diseminează diversitatea genetică, contribuind la răspândirea rezistenței antimicrobiene. Prin integrarea acestor constatări, revizuirea subliniază rolul critic al studiilor genomice în înțelegerea și atenuarea răspândirii AMR, informând astfel cercetările viitoare și strategiile de intervenție.

Primul capitol de cercetare evaluează beneficiile antioxidante ale diferitelor extracte de ciuperci și efectele lor asupra microbiotei intestinale umane utilizând un simulator gastrointestinal avansat. Recunoscând beneficiile semnificative pentru sănătate și compușii bioactivi din ciuperci, acest studiu se concentrează pe extracția acestor compuși pentru a maximiza potențialul lor de sănătate. Ciupercile selectate includ *Boletus edulis*, *Cordyceps militaris*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus*, *Hericium erinaceus* și *Lentinula edodes*, alese pentru proprietățile lor antioxidante cunoscute, conținutul de polizaharide și beneficiile generale pentru sănătate.

Condițiile optime de extracție au fost stabilite printr-o serie de teste antioxidante, inclusiv activitatea de captare a radicalilor DPPH, inhibarea peroxidării lipidice și determinarea conținutului total de polifenoli. Experimentele au fost realizate în triplicat pentru fiabilitate. Studiul a constatat că etanolul la 100°C a îmbunătățit semnificativ inhibarea peroxidării lipidice a extractelor de *Boletus edulis*. Extracția prin fierbere a fost în general mai eficientă pentru *Cordyceps militaris*, *Hericium erinaceus* și *Ganoderma lucidum* în activitățile antioxidante, în timp ce etanolul a fost superior la temperaturi mai ridicate pentru unele specii.

Cercetarea a implicat testarea riguroasă a activităților antioxidante pentru a stabili condițiile optime de extracție pentru BEE, inclusiv activitatea de captare a radicalilor DPPH, inhibarea peroxidării lipidice și determinarea conținutului total de polifenoli. Rezultatele au relevat că extracția cu etanol la 100°C îmbunătățește semnificativ inhibarea peroxidării lipidice a BEE.

Utilizând simulatoare artificiale sofisticate de intestin, studiul a evaluat distribuția și abundența populațiilor bacteriene în modelele intestinale umane și de somon. Aceste simulatoare au replicat condițiile fizice și biochimice ale intestinului uman și al somonului, oferind perspective asupra dinamicii microbiotei influențate de BEE.

Utilizarea pe scară largă a antibioticelor prezintă preocupări semnificative pentru sănătatea publică, în principal din cauza perturbării microbiotei intestinale umane și a consecințelor negative asupra sănătății. Acest studiu și-a propus să evalueze efectele *in vitro* ale unui nou extract de *Boletus edulis* asupra microbiotei intestinale umane, în special în contextul disbiozei induse de antibiotice. Investigația s-a concentrat pe mai mulți parametri cheie: citotoxicitatea, influența BEE asupra nivelurilor de citokine (IL-6, IL-10, IL-1β, TNFα) și capacitatea sa de a modula compoziția microbiotei după tratamentul cu antibiotice.

Pentru a realiza o evaluare cuprinzătoare, studiul a implicat analize detaliate ale microbiomului și evaluări ale sintezei acizilor grași cu lanț scurt (SCFA). Concomitent, studiul a determinat conținutul total de polifenoli, capacitatea antioxidantă și compoziția specifică a polifenolilor din extractul de BEE. Rezultatele au indicat că BEE modulează eficient peisajul microbial, promovând un echilibru microbial mai sănătos și atenuând răspunsurile inflamatorii.

Studiul subliniază rolul promițător al extractului de *Boletus edulis* în restabilirea echilibrului microbiotei, reducerea inflamației și combaterea efectelor adverse ale utilizării antibioticelor. Aceste descoperiri susțin explorarea continuă a BEE ca ingredient funcțional alimentar cu potențiale beneficii pentru sănătate, în special în atenuarea disbiozei induse de antibiotice și promovarea sănătății generale a intestinului fără necesitatea suplimentelor probiotice.

Capitolul V investighează efectele extractului de *Boletus edulis*, asupra comunităților microbiene din intestinul somonului Atlantic utilizând sistemul de simulare *in vitro* SalmoSim. Având în vedere expansiunea

rapidă a sectorului de acvacultură a somonului, cu expunerea semnificativă la factori de stres abiotici și biotici, există o nevoie critică de strategii pentru a îmbunătăți eficiența conversiei furajelor, a reduce tratamentele medicale, a minimiza deșeurile și a îmbunătăți calitatea peștelui. Prebioticele, în special BEE, oferă beneficii potențiale prin stimularea creșterii bacteriilor benefice din intestin.

Trei replici biologice ale probelor de intestin de somon Atlantic au fost procesate în condiții anaerobe stricte pentru a menține integritatea microbiană. Dietele experimentale conținând 5% și 10% BEE au fost preparate, iar bioreactoarele SalmoSim au fost inoculate cu microbiota intestinală. Bioreactoarele au fost controlate cu atenție pentru temperatură, pH și fluxul de nutrienți pentru a simula mediul intestinal.

Studiul a evaluat compoziția microbiană și producția de fermentație în răspuns la suplimentarea cu BEE. Rezultatele au arătat schimbări semnificative în comunitățile microbiene, în special o creștere a speciilor benefice de *Bacillus* în grupul cu doză mică de BEE și o dominanță a genului *Vibrio* în grupul cu doză mare. De asemenea, s-a observat o creștere notabilă a producției de acetat, esențial pentru sănătatea intestinală și funcțiile metabolice, în timp ce grupurile de control au prezentat niveluri mai ridicate de butirat și 3-metilbutirat. Suplimentarea cu BEE a redus, de asemenea, nivelurile de amoniac, esențiale pentru calitatea apei și reducerea toxicității în sistemele de acvacultură.

Constatările sugerează că BEE poate modula microbiota intestinală, poate spori populațiile bacteriene benefice, poate îmbunătăți producția de acizi grași cu lanț scurt și poate reduce nivelurile de amoniac, făcându-l un supliment alimentar valoros pentru promovarea sănătății peștilor și sustenabilitatea în acvacultură. Studiile viitoare ar trebui să se concentreze pe optimizarea dozei de BEE și evaluarea impacturilor pe termen lung *in vivo* pentru a valorifica pe deplin beneficiile sale pentru aplicațiile de acvacultură.

Dezvoltarea, progresia și diseminarea rezistenței antimicrobiene sunt influențate de ecosisteme interconectate umane, animale și de mediu, prezentând riscuri severe pentru sănătatea umană. Transferul plasmidelor conjugative determină diseminarea rapidă a AMR între populațiile microbiene. Atenuarea răspândirii rezistenței la antibiotice necesită înțelegerea dinamicii transferului AMR între comunitățile microbiene, precum și rolul diferitelor taxoni microbieni ca rezervoare potențiale care promovează persistența AMR pe termen lung. În ultimul capitol de cercetare, am utilizat Hi-C, o tehnică de mare viteză, fără cultură, combinată cu qPCR, pentru a monitoriza transportul și transferul unui plasmid multirezistent într-un model de intestin *in vitro* de somon Atlantic în timpul tratamentului cu florfenicol, un antibiotic benzenesulfonil utilizat pe scară largă în acvacultura peștilor ososi.

Comunitățile microbiene din intestinul mijlociu (ceaca pilorică) a trei somoni adulți sănătoși crescuți în ferme au fost inoculate în trei bioreactoare dezvoltate pentru sistemul intestinal SalmoSim. Sistemul model a fost inoculat cu o tulpină de *Escherichia coli* ATCC 25922 care poartă plasmidul pM07-1 și tratat cu florfenicol la o concentrație de 150 mg/L în mediul de hrană pentru pești timp de cinci zile, urmat de o fază de spălare/recuperare. Secvențierea Hi-C și metagenomică a identificat numeroase evenimente de transfer, inclusiv între taxoni Gram-negativi și Gram-pozitivi și, în mod crucial, transferul și persistența pe scară largă a plasmidului în absența antibioticului. Constatările noastre evidențiază rolul florei intestinale comensale de pești teleostei ca rezervor pentru AMR, iar sistemul nostru oferă un model pentru a studia cum diferitele regimuri de tratament și intervenții pot fi implementate pentru a reduce persistența AMR.

Capitolul de concluzii generale, derivat din celelalte capitole experimentale, este suplimentat cu o serie de recomandări, atât la nivel de cercetare fundamentală, cât și în termeni de propuneri pentru continuarea anumitor aspecte aplicate.

În concluzie, această teză subliniază impactul semnificativ al extractului de *Boletus edulis* asupra microbiotei intestinale și potențialele sale aplicații în sănătatea umană și acvacultura sustenabilă. Descoperirile susțin necesitatea unor studii *in vivo* suplimentare, optimizarea dozei și explorarea efectelor mecanistice ale BEE asupra sănătății intestinale și modulației imune. În plus, studiul subliniază necesitatea unor intervenții strategice pentru a reduce răspândirea AMR în acvacultură, valorificând proprietățile naturale ale alimentelor funcționale, cum ar fi *Boletus edulis*.