



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**“*IN VITRO* ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟ
ΥΓΙΩΝ ΝΕΟΓΝΩΝ”**

Πτυχιακή εργασία

ΧΡΗΣΤΟΣ Σ.ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΣ ΑΜ.213090



Αθήνα, [2018]



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπουσα ,Αδαμαντίνη Κυριακού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Τμήμα Επιστήμης Διατροφής και Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Μαρία Κώτσου

Μέλος ΕΔΙΠ, Τμήμα Επιστήμης Διατροφής και Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Τζώρτζης Νομικός

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διατροφής και Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ο Χρήστος Σ. Σταυρόπουλος

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

.....στον Στάθη.....

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την καθηγήτρια μου Κα Κυριακού Αδαμαντίνη για την αμέριστη βοήθειά της προκειμένου να εκπονηθεί η παρούσα μελέτη αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να πειραματιστώ στα εργαστήρια Μικροβιολογίας & βιολογίας του ανθρώπου του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών. Ευχαριστώ από καρδιάς την Κα Κώτσου Μαρία για την βοήθεια της στις πειραματικές διαδικασίες καθώς επίσης και την βοήθεια της στα αποτελέσματα των στατιστικών στοιχείων που προέκυψαν.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να απευθύνω στον Κο Τζώρτζη Νομικό ,Επίκουρο Καθηγητή καθώς επίσης και σε όλο το προσωπικό των εργαστηρίων Κα Λιανέα Π & Κα Μήτσου Ε. Θα ήθελα στην συνέχεια να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την στήριξη και την συμπαράστασή τους κατά την φοίτηση μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη.....	σελ.8-9
Περίληψη στα Αγγλικά.....	σελ.10-11
Κατάλογος εικόνων.....	σελ.12
Κατάλογος πινάκων.....	σελ.13
Συντομογραφίες.....	σελ.14

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

1. Εντερικός μικροβιόκοσμος του ανθρώπου.

1.1. Συμβιωτικοί μικροοργανισμοί εντερικού μικροβιόκοσμου.....	σελ.15-16
--	-----------

1.2. Λειτουργίες του εντερικού μικροβιόκοσμου.....	σελ.17
--	--------

2. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος των νεογνών

2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο	σελ.18
---	--------

2.2.. Έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κατά την γέννηση.....	σελ.19
---	--------

3. Προβιοτικά

3. Ορισμός	σελ.20
------------------	--------

3.1.Βακτήρια του γαλακτικού οξέως.....	σελ.21
--	--------

3.2. Λακτοβάκιλλοι	σελ.22
--------------------------	--------

3.3.Επίδραση των προβιοτικών στην υγεία του ανθρώπου.....	σελ.23
---	--------

3.4. Κριτήρια επιλογής των προβιοτικών στελεχών.....	σελ.24
--	--------

3.4.1.Δοκιμασία σε όξινο pH

3.4.2.Ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα.....	σελ.25
---	--------

3.4.3.Παρουσία υδρολάσης.....	σελ.26
-------------------------------	--------

4.Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών.....	σελ.27-28
--	-----------

Σκοπός.....	σελ.29
-------------	--------

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1.

1.1.Υλικά & Μέθοδοι.....	σελ.30
1.2. Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH.....	σελ.31
1.3.Έλεγχος ανάπτυξης σε χολικά άλατα.....	σελ.32
1.4.Έλεγχος δράσης της υδρολότητας (BSH).....	σελ.33

Κεφάλαιο 2.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

2.1.Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH των στελεχών	
2.2.Έλεγχος αύξησης παρουσίας χολικών αλάτων.....	σελ.34

Κεφάλαιο 3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1.Έλεγχος ανθεκτικότητας σε όξινο pH.....	σελ. 35
Επίδραση σε όξινο pH των στελεχών C39,C50 2γ.....	σελ.36
Επίδραση σε όξινο pH του στελέχους Anlb 51.....	σελ.37
3.2.Έλεγχος ανάπτυξης παρουσίας χολικών αλάτων.....	σελ. 38
Επίδραση παρουσίας χολικών αλάτων των στελεχών C39,C50 2γ.....	σελ. 39
Επίδραση παρουσίας χολικών αλάτων των στελεχών Anlb 51.....	σελ. 40
3.3.Έλεγχος δράσης της υδρολότητας (BSH) των χολικών αλάτων.....	σελ.41

Κεφάλαιο 4.

Συζήτηση.....	σελ. 42
---------------	---------

Κεφάλαιο 5.

Συμπεράσματα.....	σελ.43
Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	σελ.44

Περίληψη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Ο εντερικός μικροβιόκοσμος του ανθρώπου αποτελείται από μεγάλη ποικιλία κυττάρων. Η αποίκηση του εντερικού βλεννογόνου από μικροοργανισμούς γίνεται από την στιγμή της γέννησης του ανθρώπου. Ο τρόπος γέννησης του νεογνού αλλά και οι διατροφικές συνήθειες του θα παίζουν δραματικό ρόλο στην ποικιλία, την ποσότητα αλλά και την ποιότητα των μικροοργανισμών που τελικά θα εγκατασταθούν εκεί. Προβιοτικά ορίζονται μικροβιακά στελέχη που πιθανόν προέρχονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο του ανθρώπου και τα οποία όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες μπορούν να καταστούν ωφέλιμα για τον άνθρωπο. Τα σημαντικότερα κριτήρια αξιολόγησης ενός στελέχους ως προβιοτικό είναι η δυνατότητα επιβίωσης στο γαστρεντερικό σωλήνα, η ανθεκτικότητα σε όξινο pH, η αύξηση παρουσία χολικών αλάτων, ευαισθησία σε αντιβιοτικά, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι τροφογενών παθογόνων αλλά και επιπλέον βιολογικές δράσεις που μπορεί να είναι ευεργετικές για τον ξενιστή.

ΣΚΟΠΟΣ: Η παρούσα μελέτη ασχολείται με τον *in vitro* έλεγχο για πιθανή προβιοτική δράση τριών στελεχών λακτοβακίλλων C50 2γ, C39 και Anlb51 που απομονώθηκαν από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών και ανήκουν στη Συλλογή του ΕΒΒΙΦΑΜ. Ελέγχεται η ανθεκτικότητα των στελεχών σε όξινο pH, η αύξησή τους παρουσία χολικών αλάτων, αλλά και η παρουσία του ενζύμου υδρολάση των χολικών.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ: Καλλιεργήθηκαν σε αναερόβιες συνθήκες 3 στελέχη του *Lactobacillus spp* (C50 2γ, C39, AnLb51) τα οποία έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών, έχουν εξεταστεί μερικώς για προβιοτικές ιδιότητες και ανήκουν στη συλλογή του ΕΒΒΙΦΑΜ. Τα μικροβιακά στελέχη εξετάστηκαν αρχικά ως προς την ανθεκτικότητα που είχαν σε όξινο περιβάλλον (χαμηλό pH), στην ανάπτυξή τους παρουσία χολικών αλάτων, πραγματοποιήθηκε δοκιμή ως προς την παρουσία και δράση της υδρολάσης των χολικών (Bile salt hydrolase). Για την δοκιμασία ανθεκτικότητας στο pH έγινε επώαση των στελεχών για 1,5 και 3 ώρες σε συνθήκες pH 2 και 3. Για την δοκιμασία της ικανότητας αύξησης παρουσία χολικών αλάτων έγινε επώαση των στελεχών σε θρεπτικό μέσο MRS Broth που περιείχε Oxgall 0.3 % για 24 ώρες. Για την δοκιμασία της δράσης υδρολάσης έγινε επώαση των στελεχών σε θρεπτικό υλικό που περιείχε MRS agar με 0.5 % (w/v) sodium taurodeoxycholate για 72 ώρες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Ως προς την αντοχή στο pH όλα τα στελέχη εμφανίστηκαν ανθεκτικά στο pH 3 με εξαίρεση του στελέχους C39 στο οποίο παρότι ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται σημαντικά μετά από την 1,5 και 3 ώρες, διατηρείται όμως σε υψηλά επίπεδα. Κανένα δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα στο pH 2. Από τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη, ικανότητα αύξησης παρουσία χολικών αλάτων εμφάνισαν τα C50 2γ, C39 ενώ το AnLb51 δεν εμφάνισε σημαντική αύξηση. Ως προς την δράση υδρολότητας των χολικών αλάτων μόνο το στέλεχος C39 εμφάνισε δράση υδρολότητας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Από τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη τα C39 και C50 2γ μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία χολικών, ενώ όλα τα στελέχη εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον (pH 3) με εξαίρεση του στελέχους C39 στο οποίο παρότι ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται σημαντικά μετά από την 1,5 και 3 ώρες, διατηρείται όμως σε υψηλά επίπεδα. Το στέλεχος C39 επίσης εμφάνισε δράση του ενζύμου υδρολότητα των χολικών.

Λέξεις κλειδιά: Λακτοβάκιλλοι, προβιοτικά, εντερικός μικροβιόκοσμος, υδρολότητα χολικών

ABSTRACT

INTRODUCTION: The human gut microbiota consists of a wide variety of microbial cells. The colonization of the intestinal mucosa by microorganisms starts from the birth. The way of birth of the newborn but also its dietary habits will play part to the variety, quantity, as well as to the quality of microorganisms which eventually will be settled there. Probiotics are defined as microbial strains derived from the human intestinal microbiota and when these are administered in efficient quantities can be beneficial to humans. The most important criteria in order to evaluate a strain as probiotic is to check the capability of surviving in the gastro-intestinal tract, its resistance to acidic pH, growth in presence of bile salts, antibiotic susceptibility, antimicrobial properties in foodborne pathogens and additional biological effects that may result beneficial to the host.

PURPOSE: The present study aims to test in vitro the probiotic properties of three lactobacillus strains, C50 2c, C39 and Anlb51 isolated from the intestinal microbiota of healthy newborns and belonging to the EBBIFAM Collection. The strains resistance to acidic pH, their growth in the presence of bile salts and the presence of bile hydrolase enzyme, are tested.

MATERIALS AND METHODS: Three strains of Lactobacillus spp (C50 2γ, C39, AnLb51) isolated from the intestinal microbiota of healthy newborns, belonging to the EBBIFAM collection, have been cultivated in anaerobic conditions and partially tested for probiotic properties. The microbial strains have been initially tested for the resistance in acidic environment, the growth in presence of bile salts and also for the presence of bile salt hydrolase. In order to test the resistance to pH, the strains were incubated for 1,5 and 3 hours under 2 and 3 pH conditions. For the test of growth ability in presence of bile acids the strains were incubated in nutrient solution MRS Broth enriched with Oxgall 0.3 % during 24 hours. For the test of hydrolase activity the strains were incubated in nutrient solution which contained MRS agar enriched with 0.5% (w/v) sodium taurodeoxycholate for 72 hours.

RESULTS: In terms of pH resistance, all strains were resistant to pH3, none of them showed resistance to pH2. Between all candidate strains, the ones which showed capacity of growth in presence of bile salts were C50 2c, C39, while AnLb51 did not show a significant increase. Regarding the hydrolase activity of bile acids only C39 strain showed hydrolase activity.

CONCLUSIONS: Between all candidate probiotic strains, C39 and C50 2γ can be grown in presence of biles, while all strains show resistance to acidic conditions (pH 3). C39 showed activity of bile hydrolase enzyme.

Key words: Lactobacillus, probiotics, intestinal microbiota, bile hydrolase

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1. Μικροβιακός αποικισμός του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα.....σελ.16 (Holzapfel, et al. 1998).	
Εικ.2. Χημική δομή χολικών οξέων και ο τρόπος αποσύζευξης της χοληστερόλης από την παρουσία BSH.....σελ.26 (Dashkevicz, Feighner ,1989)	
Εικ.3. Κύριοι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών.....σελ.28 (Bermudez et al. 2012)	
Εικ.4. Δοκιμή παρουσίας της BSH α) στέλεχος C39 β) στέλεχος DSM 20079.....σελ.41	

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν.1: Διαφοροποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου ανάλογα με την έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.....σελ.19	
Πίν.2: Σημαντικότερα μικροβιακά είδη που έχουν χαρακτηριστεί ως προβιοτικά.....σελ.22	
Πίν.3: Μηχανισμός δράσεις προβιοτικών.....σελ. 27	
Πίν.4: Καταμέτρηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων ($\log_{10}$ cfu/mL) μετά την παραμονή σε ακραίες τιμές pH.....σελ. 35	
Πίν.5: Καταμέτρηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων ($\log_{10}$ cfu/mL) μετά από ανάπτυξη σε υπόστρωμα με χολικά άλατα.....σελ. 38.	
Πίν.6: Τελικό προφίλ των υποψήφιων προβιοτικώνσελ. 43.	

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

LAB	Lactic Acid Bacteria
BSH	Bile Salt Hydrolase
PBS	Phosphate Buffered Saline
CFU	Colony Forming Units
ΕΒΒΙΦΑΜ	Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών
GIT	Gastro-Intestinal-tract

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ο Εντερικός μικροβιόκοσμος του ανθρώπου

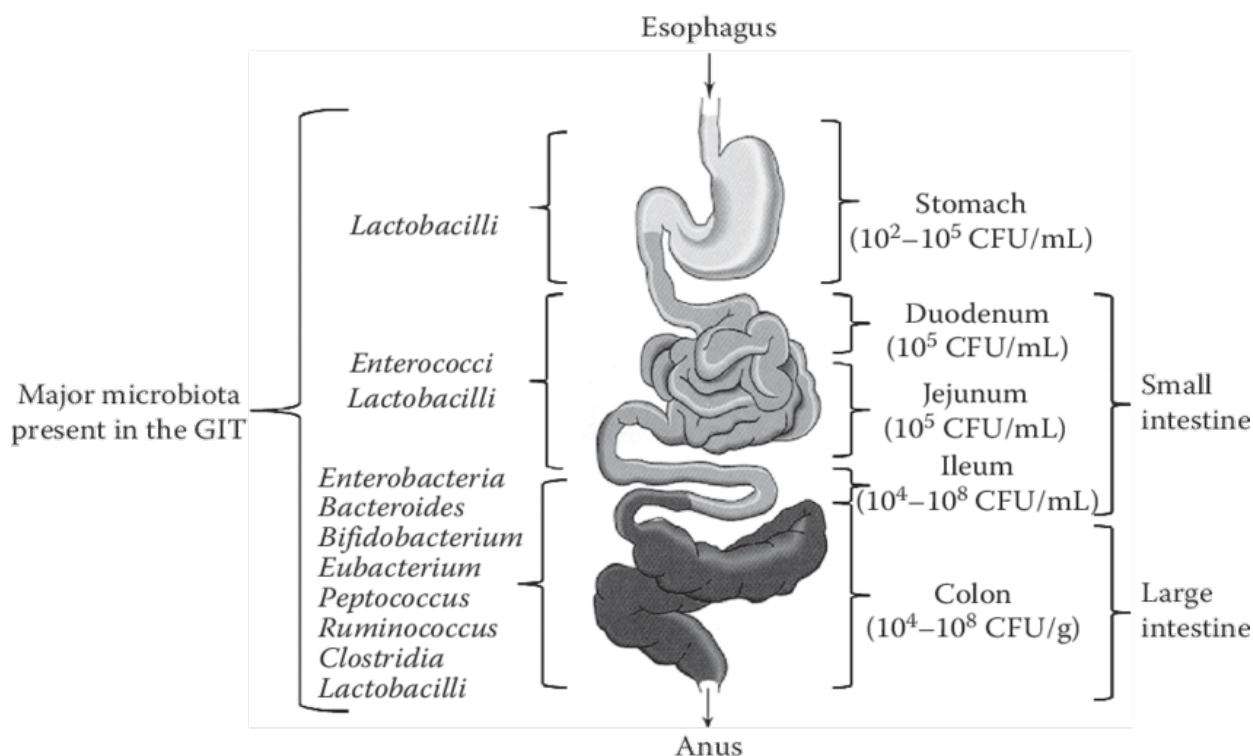
Το ανθρώπινο σώμα, που αποτελείται από περίπου 100 τρισεκατομμύρια κύτταρα, βρίσκεται σε συμβιωτική σχέση με περίπου δέκα φορές περισσότερα μικροβιακά κύτταρα από τα ανθρώπινα. Στον εντερικό σωλήνα εντοπίζεται η μεγαλύτερη σε πλήθος κυττάρων και σε βιοποικιλότητα μικροβιακή κοινότητα.

Οι σύνθετες μεταβολικές δραστηριότητες που διεξάγονται από αυτούς τους μικροοργανισμούς αντιστοιχούν με τις λειτουργίες ενός οργάνου, οδηγώντας μερικούς επιστήμονες να θεωρήσουν το σύνολο των μικροβιακών κοινοτήτων του εντέρου ως ένα «ξεχασμένο» όργανο (O'Hara and Shanahan, 2006). Το σύνολο αυτών των μικροοργανισμών που ενδημούν στον εντερικό σωλήνα ονομάζεται εντερικός μικροβιόκοσμος.

1.1.Συμβιωτικοί μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου

Ο ανθρώπινος οργανισμός συμβιώνει με σύνθετες μικροβιακές κοινότητες καθ'όλη την διάρκεια της εξέλιξης. Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών έχει συμβάλλει αποφασιστικά στην διερεύνηση αυτών των κοινοτήτων. (Dethlefsen, et al. 2007)

Περισσότεροι από 100 τρισεκατομμύρια μικροοργανισμοί καλύπτουν το ανθρώπινο ενήλικο παχύ έντερο με περισσότερα από 1000 είδη που καταλαμβάνουν αυτή την περιοχή να είναι σε θέση να επιβιώσουν υπό αναερόβιες συνθήκες. Η συντριπτική πλειοψηφία αυτών των μικροοργανισμών είναι βακτήρια ενώ εντοπίζονται όλες οι μορφές κυτταρικής ζωής, αρχαία και ευκαρυωτικά αλλά και μη κυτταρικής μορφής όπως οι ιοί. (Ley, et al. 2006)(Yatsunenko et al., 2012)



Εικόνα 1. Μικροβιακός αποικισμός του πεπτικού συστήματος του ανθρώπου (Holzapfel, et al. 1998 p.p. 85-101).

Διαπιστώνεται ότι τα βακτήρια που ανιχνεύονται στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο ανήκουν κυρίως στα φύλα *Firmicutes*, *Bacterioidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* με κυρίαρχα τα *Firmicutes* και τα *Bacterioidetes*. (Abbeele et al., 2010)(Martin et al 2011).

Οι μικροοργανισμοί του εντέρου τείνουν να σχηματίσουν ένα πολύπλοκο βιοφίλμ πολλοπλών ειδών που καλύπτει ολόκληρη τη στιβάδα βλέννας με λίγα μόνο βακτηριακά είδη που φθάνουν στο εντερικό επιθήλιο. (Swidsinski et al 2005)

1.2.Λειτουργίες του εντερικού μικροβιόκοσμου

Η πλειονότητα των ανθρώπινων μικροβίων που βρίσκεται στη γαστρεντερική (GIT) οδό, εκτός από τη συμβολή στην πέψη, εκτελούν διάφορες άλλες λειτουργίες που είναι απαραίτητες για τον ανθρώπινο ξενιστή. Αυτές οι λειτουργίες περιλαμβάνουν την παραγωγή βιταμινών, την εκπαίδευση του ανοσοποιητικού συστήματος, την επικοινωνία με τα εντερικά κύτταρα αλλά και τη συμμετοχή σε σημαντικές μεταβολικές οδούς του ξενιστή. (Backhead,et al. 2005)(Cryan and Dinan,2012)(Rajilic and Stojanovic,2013)

2. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος των νεογνών

Ο μικροβιακός αποικισμός της γαστρεντερικής οδού αρχίζει αμέσως μετά τη γέννηση και πραγματοποιείται από μικρόβια που προέρχονται από τη μητέρα και το περιβάλλον (Adlerberth and Wold,2009)

Ξεκινώντας από την γέννηση ο εντερικός μικροβιόκοσμος περνά από μια σειρά διαδοχικών μεταβολών ως προς τον αριθμό αλλά και τα είδη των μικροβιακών γενών κατά το πρώτο έτος της ζωής. Η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου διαφέρει μεταξύ των μελετών ενδεχομένως λόγω διαφορών που οφείλονται σε:

- περιβαλλοντικές εκθέσεις
- πολιτικές προφύλαξης από τα αντιβιοτικά
- στη δίαιτα νηπίων και μητέρων
- στις τεχνικές καταμέτρησης και χαρακτηρισμού των μικροοργανισμών
- σε διάφορους άλλους άγνωστους παράγοντες.(Arrieta et al,2014)

2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Παρόλο που η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου στο έντερο επηρεάζεται από τη διατροφή, το φύλο, τη γεωγραφική θέση και την εθνικότητα (Yatsunenko et al. 2012)(Koenig, et al. 2011) ο τρόπος γέννησης φαίνεται να είναι από τους πιο κρίσιμους και σημαντικούς παράγοντες κατά την απόκτηση της πρωταρχικών μικροβιακών ειδών.(Dominguez et al 2010)(Dominguez, et al 2011)

Τα βρέφη που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό αποκτούν μια βακτηριακή σύνθεση που ομοιάζει με αυτή του μικροβιόκοσμου από τον κόλπο της μητέρας, με κυρίαρχα τα βακτήρια από τα γένη των *Lactobacillus*, *Prevotella* ή *Sneathia* . Αντίθετα, τα βρέφη που γεννιούνται με καισαρική τομή αποκτούν βακτήρια που μοιάζουν με αυτά που υπάρχουν στο δέρμα, όπως τα γένη *Staphylococcus*, *Corynebacterium* . Αυτά τα βακτήρια δεν προέρχονται από τη μητέρα αλλά από το περιβάλλον του νοσοκομείου, με το οποίο τα βρέφη έχουν έρθει σε επαφή (Dominguez et al 2010). Οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις αυτής της διαφοράς στην έκθεση για το παιδί δεν έχουν ακόμη προσδιορισθεί.

Ορισμένες πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι ο αποικισμός μπορεί να ξεκινήσει ακόμα νωρίτερα. Ενώ αρχικά ήταν αποδεκτό ότι ο εντερικός σωλήνας των βρεφών είναι στείρος από μικροοργανισμούς μέχρι την γέννηση τους φαίνεται ότι αυτό έχει αμφισβητηθεί πλέον.(Arrieta et al 2014)

2.2. Έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κατά την γέννηση

Πίνακας 1

Διαφοροποιήσεις του εντερικού μικροβιόκοσμου ανάλογα με την έκθεση του σε περιβαλλοντικούς παράγοντες

Intestinal Microbiome Flora Related to Various Perinatal Exposures	
Exposure	Intestinal Flora
Vaginal delivery	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Prevotella</i>
Cesarean section	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Propionibacterium</i>
Breast milk	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Clostridia</i>
Formula	<i>Bacteroides</i> , <i>Clostridia</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>

(Martin et al., 2011).

Αναφέρεται παρουσία βακτηρίων στον πλακούντα, την αμνιακή κοιλότητα, τον ομφάλιο λώρο και το μηκόνιο τα οποία έχουν ανιχνευθεί μόνο με ευαίσθητες μοριακές τεχνικές ενώ φαίνεται ότι η δυναμική και πολύπλοκη διαδικασία του αποικισμού των μικροοργανισμών μπορεί να έχει ήδη ξεκινήσει στο ζωντανό έμβρυο από την μήτρα. (Jimenez et al 2005)

3.Προβιοτικά-Ορισμός

Τα προβιοτικά ορίζονται από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας και από το συμβούλιο εμπειρογνομόνων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας ως "Οι ζωντανοί μικροοργανισμοί που, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, παρέχουν όφελος στην υγεία του ξενιστή"(FAO/WHO,2002)

Η λέξη "προβιοτικό" έρχεται από την ελληνική, και σημαίνει "για ζωή". Πιθανότατα, ο Ferdinand Vergin ο οποίος πρότεινε τη λέξη «προβιοτικό» το 1954, στο άρθρο του με τίτλο «Anti-und Probiotika» σύγκρινε τις βλαβερές συνέπειες των αντιβιοτικών και άλλων αντιβακτηριακών παραγόντων στην εντερική μικροχλωρίδα με τα ευεργετικά αποτελέσματα άλλων βακτηρίων (Markowiak and Ślizewska,2017).

Λίγο καιρό αργότερα, το 1965, οι Lilly και Stillwell περιέγραψαν τα προβιοτικά ως μικροοργανισμούς που διεγείρουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών(Lilly,Stillwell,1965).Ο ορισμός των προβιοτικών έχει τροποποιηθεί και έχει αλλάξει πολλές φορές. Για να τονιστεί η μικροβιακή τους προέλευση, Ο Fuller (1989) δήλωσε ότι τα προβιοτικά πρέπει να είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί και πρέπει να ασκούν ευεργετική επίδραση στον ξενιστή (Fuller,R,1989)

Ο ορισμός που διατυπώθηκε το 2002 από τον FAO (Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών) και από την ομάδα εμπειρογνομόνων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), δηλώνει ότι τα προβιοτικά είναι «ζωντανά στελέχη» τα οποία όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, παρέχουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή »(FAO/WHO,2002)

3.1.Lactic acid bacteria (Βακτήρια του γαλακτικού οξέως)

Ο πρώτος εκπρόσωπος του γένους *Lactobacillus* που απομονώθηκε από την γαστρεντερική οδό ήταν μέλος της τάξης *Lactobacillales* και ονομάστηκε αρχικά *Bacillus acidophilus* (Moro,1900).

Στην ίδια τάξη (*Lactobacillales*) ή βακτήρια του γαλακτικού οξέως ή Lactic Acid Bacteria (LAB) ανήκουν επίσης και άλλα στελέχη που απομονώνονται από την γαστρεντερική οδό και ανήκουν στα γένη *Streptococcus* και *Enterococcus* (Sherman,1938)

Απομονώσεις από τα γένη *Leuconostoc* και *Weissella* θεωρήθηκαν ως παροδικά μέλη του εντερικού μικροβιόκοσμου. (Hong et al,2011)

Τα LAB περιλαμβάνουν Gram+ βακτήρια, που δεν σχηματίζουν σπόρια, μη πτητικά, αναερόβια, σε σχήμα βακίλλων ή κόκκων, τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ ως το κύριο μεταβολικό τελικό προϊόν ζύμωσης των υδατανθράκων. Τα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus* είναι σημαντικά μέλη αυτής της ομάδας.

3.2.Λακτοβάκιλλοι

Οι λακτοβάκιλλοι είναι βακτήρια που απομονώνονται από διάφορες πηγές (τρόφιμα, φρούτα και λαχανικά, εντερικός σωλήνας ανθρώπων και ζώων) και έχουν λάβει ιδιαίτερη επιστημονική προσοχή (Tannock,2004), κυρίως λόγω των ισχυρισμών υγείας που πρότεινε ο Metchnikoff στις αρχές του XIX αιώνα (Metchnikoff,1908) αλλά και της μετέπειτα εφαρμογής τους ως προβιοτικών. (Keighley et al,1978)(Ott et al 2004). Έχουν μεγάλη ποικιλία μεγεθών, από μεγάλους και λεπτούς βακίλλους έως κοντούς κοκκοβακίλλους.

Η βέλτιστη ανάπτυξη των λακτοβακίλλων επιτυγχάνεται σε pH 5,5 έως 5,8 και απαιτεί ένα περίπλοκο θρεπτικό περιβάλλον, πλούσιο σε αμινοξέα, πεπτίδια, νουκλεοτιδικές βάσεις, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, λιπαρά οξέα και υδατάνθρακες .(Shokryazdan et al. 2017)

Πίνακας 2

Σημαντικότερα μικροβιακά είδη που έχουν χαρακτηριστεί ως προβιοτικά

Names of micro-organisms used as Probiotics				
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>	Others
Sps	Sps	Sps	Sps	
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. boulardii</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei</i> (<i>rhamnosus</i>)	<i>B. breve</i>	<i>S. salivarius subsp</i>		<i>Escherichia coli</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>			<i>Enterococcus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>			<i>Propionibacteri</i> <i>um</i>
				<i>freudenreichii</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>			
<i>L. lactis</i>	<i>B. adolescentis</i>			
<i>L. paracasei</i>				
<i>L. plantarum</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. salivarius</i>				
<i>L. bulgaricus</i>				

(Gupta, Garg 2009)

3.3.Επίδραση των προβιοτικών στην υγεία του ανθρώπου

Τα αποτελέσματα κλινικών μελετών επιβεβαιώνουν τη θετική επίδραση των προβιοτικών σε διάφορες γαστρεντερικές παθήσεις όπως:

- σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου,
- γαστρεντερικές διαταραχές,
- εξάλειψη του παθογόνου *Helicobacter pylori*
- φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (ελκώδης κολίτιδα και νόσος Crohn)
- διάρροια διαφορετικών αιτιολογιών (μετά από κατανάλωση αντιβιοτικών, ιογενούς αιτίας κ.α.)

Επίσης σημαντικός αριθμός κλινικών μελετών δείχνει ότι η κατανάλωση προβιοτικών στελεχών προληπτικά μπορεί να προφυλάσσει βρέφη και παιδιά από αλλεργικές ασθένειες (ατοπική δερματίτιδα). Τα τελευταία χρόνια διεξάγεται σημαντική ερευνητική δραστηριότητα με θετικά αποτελέσματα, για την επίδραση των προβιοτικών σε μεταβολικές νόσους, όπως η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο διαβήτης τύπου 2 καθώς και η μη-αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος .

Επιπλέον, θετικές επιδράσεις των προβιοτικών στην ανθρώπινη υγεία έχουν αποδειχθεί με την αύξηση της ανοσίας του σώματος (ανοσορρύθμιση).

Οι επιστημονικές αναφορές δείχνουν επίσης τα οφέλη της προφυλακτικής χρήσης των προβιοτικών σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου και παρενέργειες που σχετίζονται με τον καρκίνο. (Amara and Shibl,2015)(Bekkering, et. al. 2013)(Lee,2014)

3.4.Κριτήρια επιλογής των προβιοτικών στελεχών

Ο FAO / WHO έχει προτείνει έναν κατάλογο από *in vitro* δοκιμές που αφορούν τον έλεγχο για τον χαρακτηρισμό πιθανών προβιοτικά στελεχών συμπεριλαμβανομένων των ακολούθων (FAO/WHO 2002):

- i) Αντοχή στην γαστρική οξύτητα
- ii) Ανάπτυξη παρουσία χολικών
- iii) Προσκόλληση στον εντερικό βλεννογόνο ή ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα
- iv) Αντιμικροβιακή και ανταγωνιστική δράση ενάντια σε δυνητικά παθογόνα βακτήρια

Το γαλακτικό και οξικό οξύ είναι τα κύρια μεταβολικά τελικά προϊόντα που παράγονται από τα LAB. (Holzapfel,et al. ,1995). Το οξικό οξύ θεωρείται πιο αποτελεσματικό έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων, όπως είναι και τα περισσότερα εντερικά παθογόνα (Gilliland and Walker,1990).

Εκτός από αυτά τα κύρια κριτήρια επιλογής ένα προβιοτικό στέλεχος, μπορεί να εξετασθεί εάν διαθέτει επιπλέον ιδιότητες που ωφελούν τον ξενιστή. Για παράδειγμα, η δυνατότητα απορρόφησης της χοληστερόλης .(Pereira and Gibson,2002), η αντιοξειδωτική δράση (Lin and Chang,2000), η κυτταροτοξικότητα απέναντι σε καρκινικά κύτταρα (Thirabunyanon, et al.,2009).

3.4.1. Δοκιμασία σε όξινο pH

Τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να είναι σε θέση να επιβιώσουν στο γαστρεντερικό σωλήνα. Τα βακτηριακά στελέχη στον ανθρώπινο γαστρικό χυμό είναι ακριβέστερη ένδειξη της ικανότητας των στελεχών να επιβιώσουν κατά την διέλευσή τους από το στομάχι. Η επιβίωση των προσλαμβανόμενων προβιοτικών σε διάφορα μέρη της γαστρεντερικής οδού ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος. Μερικά στελέχη θανατώνονται γρήγορα στο στομάχι, ενώ άλλα, όπως τα στελέχη των *Bifidobacteria* ή *L. acidophilus*, μπορούν να περάσουν από το έντερο σε πολύ υψηλή συγκέντρωση. (Robinson, 2002) (Salminen, and Wright, 1998a)

Τα προβιοτικά στελέχη πρέπει να επιβιώσουν μετά τη διέλευσή τους από τον στόμαχο και πριν καταλήξουν στο έντερο (Henriksson, et al., 1999).

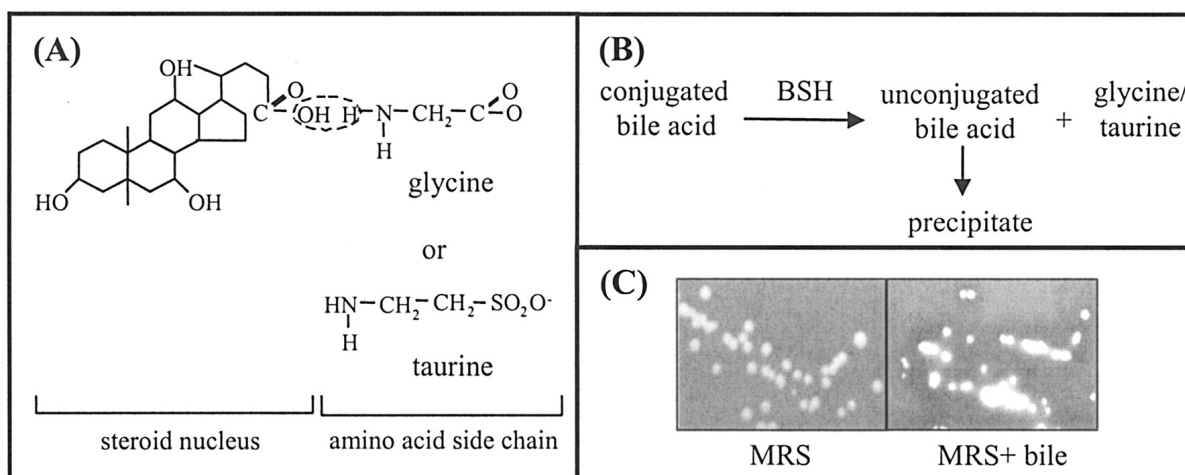
3.4.2. Ανθεκτικότητα στα χολικά

Η δοκιμασία της ανοχής στην παρουσία χολικών αλάτων είναι μια από τις πιο κρίσιμες ιδιότητες για τα προβιοτικά βακτήρια, καθώς καθορίζει την ικανότητά τους να επιβιώνουν στο λεπτό έντερο και συνεπώς την ικανότητά τους να διαδραματίζουν τον λειτουργικό τους ρόλο ως προβιοτικά. (Noriega et al, 2004)

Η ικανότητα επιβίωσης των στελεχών από την δράση των χολικών αλάτων είναι απαραίτητη δοκιμασία για την αξιολόγηση προβιοτικών βακτηρίων και συμπεριλαμβάνεται μεταξύ των κριτηρίων που χρησιμοποιούνται για την επιλογή πιθανών προβιοτικών στελεχών.

Η ευαισθησία των λακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από γαλακτοκομικά προϊόντα σε χολικά άλατα αποδείχθηκε στη δεκαετία του 1970 από την ομάδα Gilliland. (Gilliland and Speck, 1977). Επίσης, πρότειναν τη σημασία της εκτίμησης της ανοχής της χολής στην επιλογή των λακτοβακίλλων για προβιοτική χρήση. (Gilliland 1979)

3.4.3. Παρουσία της υδρολάσης

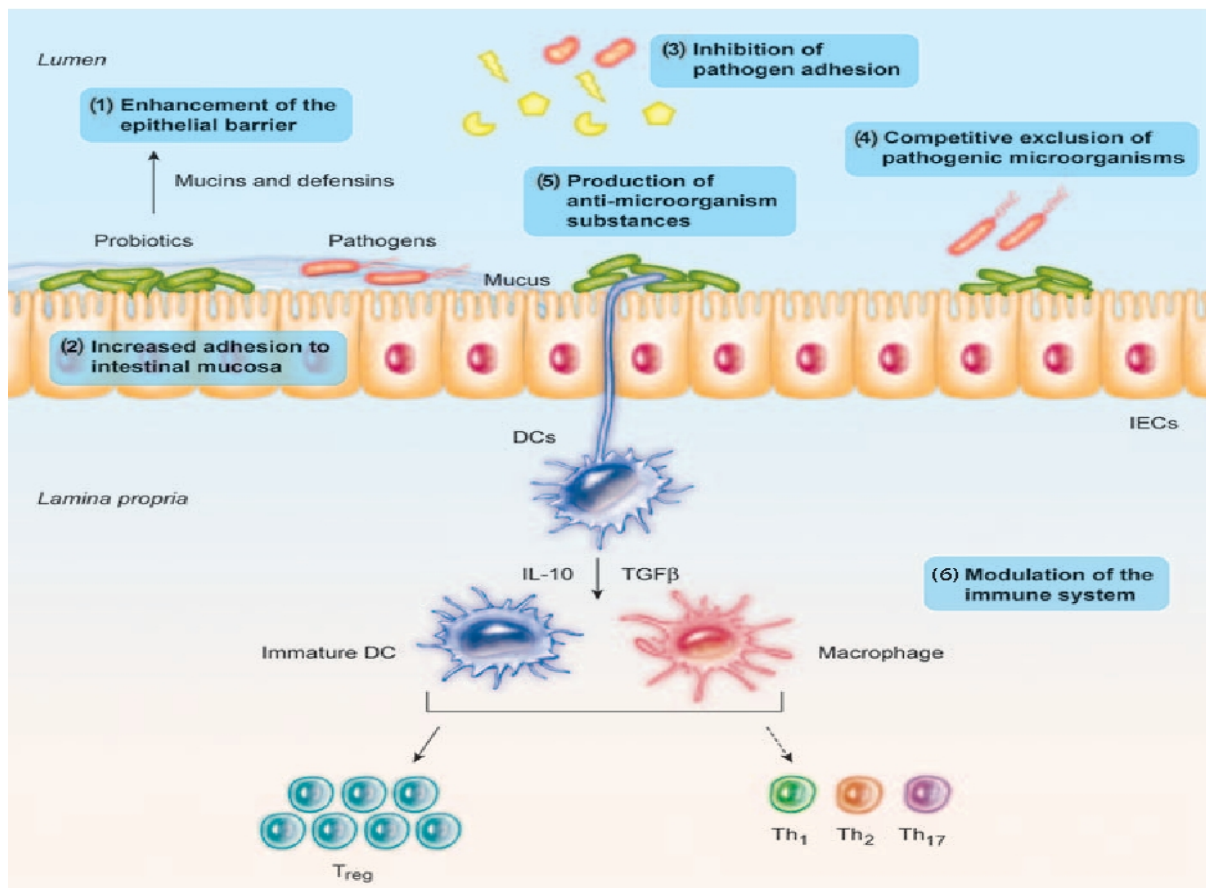


Εικ.2. (Α) Χημική δομή χολικών οξέων. Τα πρωτογενή χολικά οξέα συντίθενται στο ήπαρ από χοληστερόλη και συζευγνύεται είτε με γλυκίνη είτε με ταυρίνη πριν από την έκκριση. Η καρβοξυλομάδα του χολικού οξέος και η αμινομάδα του αμινοξέος συνδέονται με έναν αμιδικό δεσμό. (Β) Η αντίδραση καταλύεται από τα ένζυμα BSH. Τα BSHs διασπούν την πεπτιδική σύνδεση των χολικών οξέων, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση της ομάδας αμινοξέων από τον στεροειδή πυρήνα. Τα προκύπτοντα μη συζευγμένα χολικά οξέα καθιζάνουν σε χαμηλό pH. (C) Ανίχνευση της δραστηριότητας BSH Το *L. plantarum*, το οποίο αναπτύχθηκε όλη τη νύκτα σε υγρό MRS, προστέθηκε σε άγαρ MRS (Difco) (Α) ή MRS εμπλουτισμένο με 0,2% (β γλυκοδεοξυχολικό οξύ (GDCA, Sigma) (Β) και επώαστηκε αναερόβια για 48 ώρες. Το λευκό κατακρημνίζεται γύρω από τις αποικίες και η εκκαθάριση του μέσου είναι ενδεικτική της δραστηριότητας BSH (Dashkevicz 1989).

4.Μηχανισμοί δράσης προβιοτικών

Τρόπος	Διαδικασία	Μηχανισμός	Παραδείγματα
Λειτουργία φραγμού	Μειωμένη απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων Αύξηση της παραγωγής βλεννίνης	Μειωμένη παραγωγή TNP-α Αυξημένη έκφραση του MUC 2	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> <i>Lactobacillus sp</i>
Προβιοτικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες	- Μείωση του pH του εντερικού αυλού - Παραγωγή βακτηριοκινών	- με έκκριση των SCFA - Απο τα Gram+ Προβιοτικά	Τα περισσότερα από τα προβιοτικά
Προσκόλληση στο εντερικό επιθήλιο	Ανταγωνιστικά έναντι των παθογόνων παραγόντων	Άμεσα ή έμμεσα με την παραγωγή πρωτεΐνης η οποία μπλοκάρει την προσκόλληση.	
Διαμόρφωση Ανοσοποιητικού Συστήματος	Αποκλεισμός προφλεγμονωδών μορίων	Με την εξασθένηση της έκκρισης IL-8 ή την παρεμπόδιση της έκκρισης IL-8 αποικοδόμηση του αντιρυθμιστικού παράγοντα IkB	<i>Salmonella thimurium</i>
Παρεμβολή στην αναμετάδοση σημάτων	Αποκλείει την επικοινωνία μεταξύ των παθογόνων βακτηρίων.	Με την έκκριση μορίων που εμποδίζει την μετάδοση σημάτων	<i>L. acidophilus</i>

Πιν. 3 (Gogineni et al., 2013)



ΕΙΚ.3. Οι κύριοι προβιοτικοί μηχανισμοί δράσης περιλαμβάνουν ενίσχυση του επιθηλιακού φραγμού, αυξημένη προσκόλληση στον εντερικό βλεννογόνο και ταυτόχρονη αναστολή της προσκόλλησης των παθογόνων, ανταγωνιστικός αποκλεισμός παθογόνων μικροοργανισμών, παραγωγή αντί-μικροβιακών ουσιών και διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τα προβιοτικά έχουν αξιοσημείωτες δυνατότητες που αφορούν την πρόληψη της υγείας αλλά και θεραπευτικές εφαρμογές σε διάφορες γαστρεντερικές διαταραχές. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε πολλά από τα προβιοτικά οι ισχυρισμοί υγείας δεν έχουν ακόμη τεκμηριωθεί. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα που αποδεικνύει ένα συγκεκριμένο στέλεχος δεν μεταφέρεται απαραίτητα και σε άλλους προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Εξάλλου, οι μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται η προβιοτική δράση δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως. (Bermudez et al., 2012)

Σκοπός

Η παρούσα μελέτη ασχολείται με τον *in vitro* έλεγχο για πιθανή προβιοτική δράση τριών στελεχών που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus*. C50 2γ,C39 και Anlb51 τα οποία απομονώθηκαν από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών και ανήκουν στη Συλλογή του ΕΒΒΙΦΑΜ. Ελέγχεται η ανθεκτικότητα των στελεχών σε όξινο pH, η αύξησή τους παρουσία χολικών αλάτων, αλλά και η παρουσία του ενζύμου υδρολάση των χολικών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ.1

1.1.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη ανήκουν στην συλλογή του ΕΒΒΙΦΑΜ και απομονώθηκαν από δείγματα κοπράνων από υγιή νεογνά. Τα δείγματα κοπράνων συλλέχθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό αναερόβιες συνθήκες (GENbag anaer, Biomérieux®SA) και αναλύθηκαν την ίδια ημέρα. Επιλέχθηκαν τα στελέχη που ακολουθούν για τον έλεγχο πιθανών προβιοτικών ιδιοτήτων τα οποία ανήκουν στο γένος *Lactobacillus*.

- 1) C 50 2γ
- 2) Anlb51
- 3) C 39

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ενεργοποιημένες καλλιέργειες δηλαδή οι λακτοβάκιλλοι είχαν ανακαλλιεργηθεί διαδοχικά τουλάχιστον τρεις φορές μετά την αναβίωσή τους από τους 80°C πριν αυτοί χρησιμοποιηθούν στις πειραματικές διαδικασίες (σε υπόστρωμα MRS στους 37°C και σε αναερόβιες συνθήκες).

1.2. Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH

Η δοκιμασία για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των υπό μελέτη στελεχών σε χαμηλό pH, βασίστηκε στο πρωτόκολλο των (Charteris et al.,1998). Ενεργοποιημένες καλλιέργειες των λακτοβακίλλων αφού επωάστηκαν για 24 ώρες σε υγρό υπόστρωμα MRS Broth ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS και στην συνέχεια το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ποσότητα PBS κατάλληλη ώστε να έχουμε συγκεντρώσεις εμβολίου 1×10^8 - 9×10^8 cfu/ml. Σε ένα δοχείο DURAM αποστειρώνονται 100 mL saline (NaCl 0,5% w/v), και μετά την αποστείρωση προστέθηκαν και 0,3 gr/100 mL pepsin. Το διάλυμα με την pepsin χρησιμοποιήθηκε για να φτιάξουμε δύο νέα διαλύματα με pH 2 και 3 με χρήση πυκνού HCL ώστε να ομοιάζουν στον γαστρικό χυμό. Για κάθε στέλεχος έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε pH. Σε κάθε φιαλίδιο μεταφέρεται 1 mL από το διάλυμα με pH2 ή pH3, 0,3 ml από το διάλυμα saline (NaCl 0,5% w/v) και 0,2 mL από το εναιώρημα των λακτοβακίλλων στο PBS (εμβόλιο). Μόλις γίνει η μεταφορά των λακτοβακίλλων στα όξινα διαλύματα, ξεκινούν άμεσα οι διαδοχικές αραιώσεις για την καταμέτρηση των πληθυσμών, (χρόνος 0 ώρες). Τα φιαλίδια McCartney τοποθετούνται σε υδατόλουτρο (37°C), με ήπια ανάδευση (45 rpm) και σε χρόνο 1,5 ώρες και 3 ώρες γίνονται επίσης καταμετρήσεις των πληθυσμών. Οι καταμετρήσεις γίνονται μετά από διαδοχικές αραιώσεις σε buffered peptone water (0.1% bacteriological peptone και 0,85 NaCl) και εμβολιασμό σε τρυβλία MRS Agar (μέθοδος pour plate). Τα τρυβλία επωάστηκαν σε αναερόβιο θάλαμο, στους 37°C, για 48 ώρες .

1.3 Έλεγχος ανάπτυξης σε χολικά άλατα των στελεχών λακτοβακίλλων

Ο έλεγχος της ικανότητας ανάπτυξης παρουσία χολικών αλάτων των στελεχών των λακτοβακίλλων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των (Kotsou et al., 2008) .

Ενεργοποιημένες καλλιέργειες των λακτοβακίλλων αφού επώαστηκαν για 24 ώρες σε υγρές καλλιέργειες MRS Broth φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm για 5 min και στη συνέχεια το ίζημα επαναωρήθηκε σε ποσότητα MRS τέτοια ώστε να έχουμε στο εμβόλιο συγκέντρωση κυττάρων λακτοβακίλλων 1×10^8 - 9×10^8 cfu/ml

Από κάθε στέλεχος εμβολιάστηκαν σωλήνες με MRS Broth και σωλήνες με MRS Broth+ 0.3% bile (Difco Oxgall 212820), με 50 μl εμβολίου. Για κάθε στέλεχος και κάθε χειρισμό, η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές. Η εκτίμηση των ζωντανών μικροβιακών κυττάρων έγινε σε χρόνο 0 ώρες και μετά από 24 ώρες επώασης στους 37 ° C σε αναερόβιες συνθήκες. Ακολουθήθηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων σε buffered peptone water (0.1% bacteriological peptone και 0,85 NaCl) και η καταμέτρηση έγινε σε τρυβλία MRS Agar. Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας στα χολικά άλατα έγινε με σύγκριση του αριθμού των κυττάρων ενός στελέχους στις 0 και 24 ώρες παρουσία χολικών αλάτων αλλά και με σύγκριση του αριθμού των κυττάρων ενός στελέχους μετά από 24 ώρες επώασης παρουσία χολικών αλάτων ή απουσία χολικών αλάτων στο θρεπτικό υλικό (MRS).

1.4 Έλεγχος δράσης υδρολάσης των χολικών αλάτων (BSH) στα στελέχη λακτοβακίλλων

Για τον έλεγχο της δράσης της BSH ενεργοποιημένες καλλιέργειες των στελεχών εμβολιάστηκαν σε MRS Broth και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37 °C στον αναερόβιο θάλαμο. Οι καλλιέργειες στο MRS broth φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 4000 rpm και στην συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο ενώ το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ποσότητα MRS Broth ανάλογα με την ανάπτυξη του κάθε στελέχους ώστε να πετύχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση για το εμβόλιο που είναι μεταξύ 1×10^8 - 9×10^8 cfu/ml. Οι καταμετρήσεις των εμβολίων έγιναν με διαδοχικές αραιώσεις με buffered peptone water και καταμέτρηση σε τρυβλία MRS Agar που εμβολιάστηκαν με 100μl εμβολίου με την μέθοδο pour plate.

Τρυβλία MRS agar στα οποία ενσωματώθηκε 0.5 % (w/v) sodium taurodeoxycholate (Sigma Aldrich) και 0.37 g/l CaCl₂ κατά το πρωτόκολλο των de Toit et al.,1998 (Toit et al.,1998) εμβολιάστηκαν με τα υπό μελέτη στελέχη λακτοβακίλλων ως εξής: χάρτινα αποστειρωμένα δισκία διαμέτρου 6mm, εμποτίστηκαν με το εμβόλιο για ένα λεπτό και μετά τοποθετήθηκαν στο τρυβλίο.

Στη συνέχεια τα τρυβλία επώαστηκαν στον αναερόβιο θάλαμο στους 37 °C και ελέγχθηκαν για την ανάπτυξη ιζήματος στις 72 ώρες. Τα στελέχη που δημιούργησαν ζώνη ιζήματος γύρω από την περιοχή εμβολιασμού θεωρούνται θετικά για δράση BSH. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DSM 20079.

ΚΕΦ.2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

2.1. Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH των στελεχών λακτοβακίλλων.

Οι πληθυσμοί των λακτοβακίλλων μετά τις καταμετρήσεις και πριν την στατιστική επεξεργασία τους μετατράπηκαν σε $\log_{10}$ cfu/mL. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκαν γραφήματα όπου αναδεικνύουν την επίδραση του όξινου pH στα στελέχη. Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Repeated Measures ANOVA. Όπου υπήρξαν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις ανά δύο με την χρήση της δοκιμής Tukey.

2.2. Έλεγχος αύξησης παρουσία χολικών αλάτων των στελεχών λακτοβακίλλων .

Οι πληθυσμοί των λακτοβακίλλων μετά τις καταμετρήσεις και πριν την στατιστική επεξεργασία τους μετατράπηκαν σε $\log_{10}$ cfu/mL. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την μέθοδο t-test σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

ΚΕΦ.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH .

Τα στελέχη των λακτοβακίλλων εξετάστηκαν ως προς την ανθεκτικότητα τους σε pH 3 και pH 2 μετά από παραμονή στις συνθήκες αυτές για $t=1,5$ ώρες και $t=3$ ώρες. Η βιωσιμότητα των λακτοβακίλλων καταμετρήθηκε (cfu/ml) αμέσως μετά την παρέμβαση (μείωση του pH), δηλαδή σε χρόνο 0 ώρες μετά από 1,5 ώρες και 3 ώρες επώασης. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μετά την στατιστική ανάλυση. Όλα τα στελέχη εμφάνισαν καλή ανοχή σε pH 3 ως και τρεις ώρες, ίσως με την εξαίρεση του στελέχους C39 στο οποίο παρότι ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται σημαντικά μετά από την 1,5 και 3 ώρες, διατηρείται όμως σε υψηλά επίπεδα. Αντιθέτως κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα σε pH 2.

Πίνακας 4. Καταμέτρηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων ($\log_{10}$ cfu/mL) μετά από παραμονή σε ακραίες τιμές pH (pH=3, pH=2), σε $t=0$ h, $t=1,5$ h και $t=3$ h.

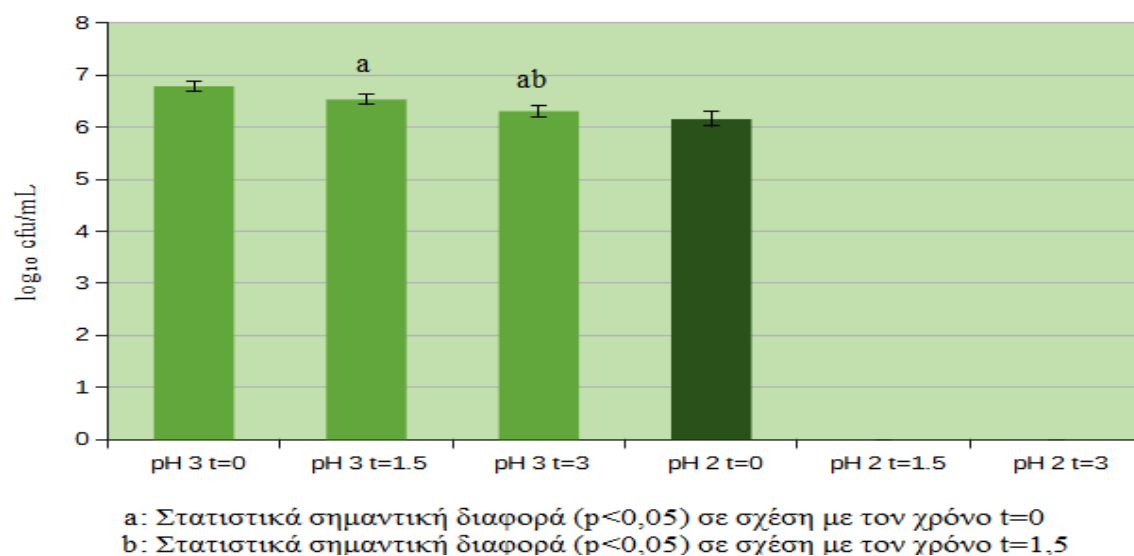
ΣΤΕΛΕΧΟΣ	pH 3			pH 2		
	t=0	t=1.5	t=3	t=0	t=1.5	t=3
C39	6.79(0,09)	6.54(0,09) ^a	6.31(0,11) ^{ab}	6,16(0,13)	<1	<1
C50 2γ	8,22(0,08)	8,16(0,08)	8,06(0,12)	7,99(0,20)	<1	<1
Anlb51	8,53(0,19)	8,51(0,09)	8,39(0,08)	8,32(0,13)	<1	<1

Οι τιμές εντός παρενθέσεως εκφράζουν την τυπική απόκλιση των μέσων ($n=3$)

^a: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) σε σχέση με τον χρόνο $t=0$

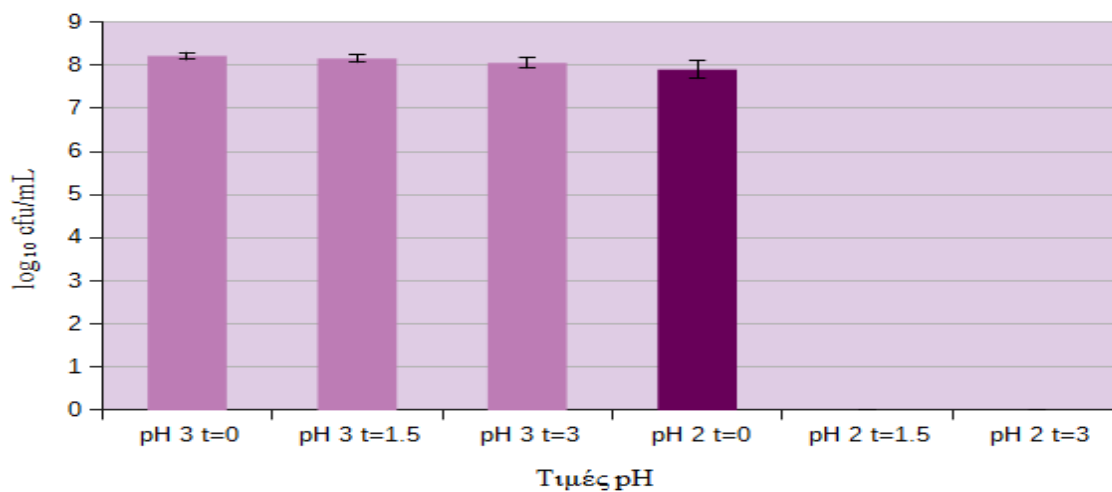
^b: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) σε σχέση με τον χρόνο $t=1,5$

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΙΝΟΥ pH ΣΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ C39



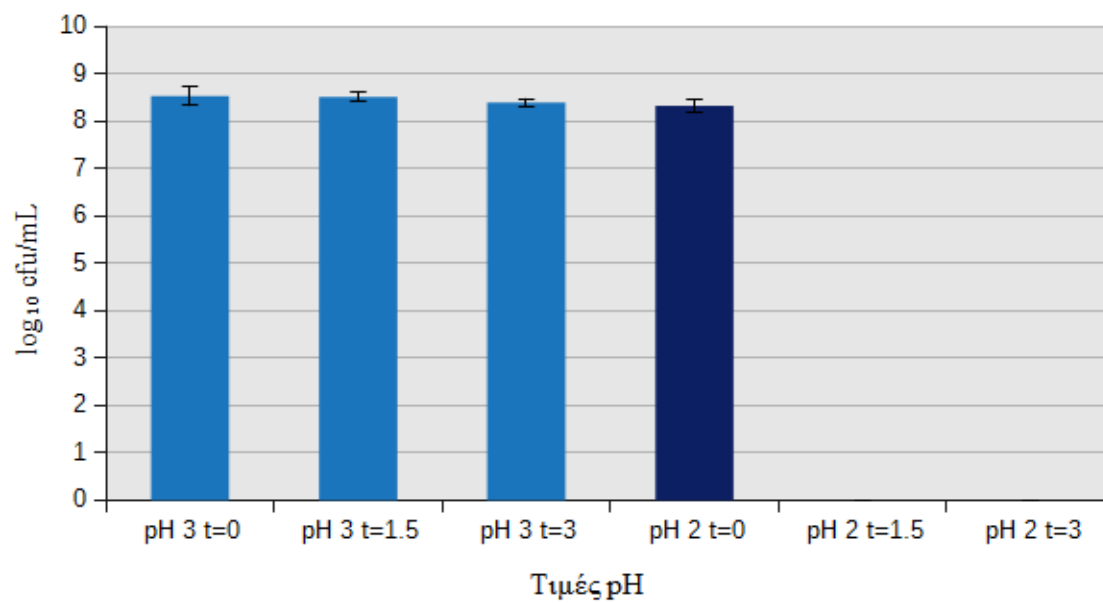
ΣΧΗΜΑ 1. Επίδραση του pH στην ανάπτυξη του στελέχους *Lactobacillus spp* C39

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΙΝΟΥ pH ΣΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ C50 2γ



ΣΧΗΜΑ 2. Επίδραση του pH στην ανάπτυξη του στελέχους *Lactobacillus spp* C50-2γ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΙΝΟΥ pH ΣΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ Anlb51



ΣΧΗΜΑ 3. Επίδραση του pH στην ανάπτυξη του στελέχους *Lactobacillus spp* Anlb51

3.2. Έλεγχος ανάπτυξης παρουσία χολικών αλάτων

Από τα στελέχη των λακτοβακίλλων που εξετάστηκαν τα C39, C50 2γ και AnLb 51 εμφανίζουν ικανότητα ανάπτυξης παρουσία χολικών αλάτων, αφού αυξάνονται σημαντικά οι πληθυσμοί τους μετά από 24 ώρες ανάπτυξης παρουσία χολικών, με τον αντίστοιχο πληθυσμό τους πριν από την επίδραση με χολικά.

Πίνακας 5. Καταμέτρηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων ($\log_{10}$ cfu/mL) μετά από ανάπτυξη σε υπόστρωμα με χολικά άλατα

	ΣΤΕΛΕΧΟΣ C39		ΣΤΕΛΕΧΟΣ C50 2γ		ΣΤΕΛΕΧΟΣ Anlb51	
	MRS	MRS+Bile	MRS	MRS+Bile	MRS	MRS+Bile
t=0	6.38(0.05)	6.47(0.16)	7.33(0.03)	6.99(0.58)	7.24(0.17)	7.52(0.19)
t=24	7.84(0.15) ^c	7.21(0.05) ^{ab}	9.10(0.03) ^c	8.31(0.04) ^{ab}	8.32(0.19) ^c	7.75(0.04) ^b

Οι τιμές εντός της παρένθεσης εκφράζουν την τυπική απόκλιση των μέσων (n=3)

^a: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) στις t=0 & t=24 μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με χολικά άλατα.

^b: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) στις 24h μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με ή χωρίς χολικά άλατα.

^c: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) σε t=0 & t=24 μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό MRS απουσία χολικών αλάτων.

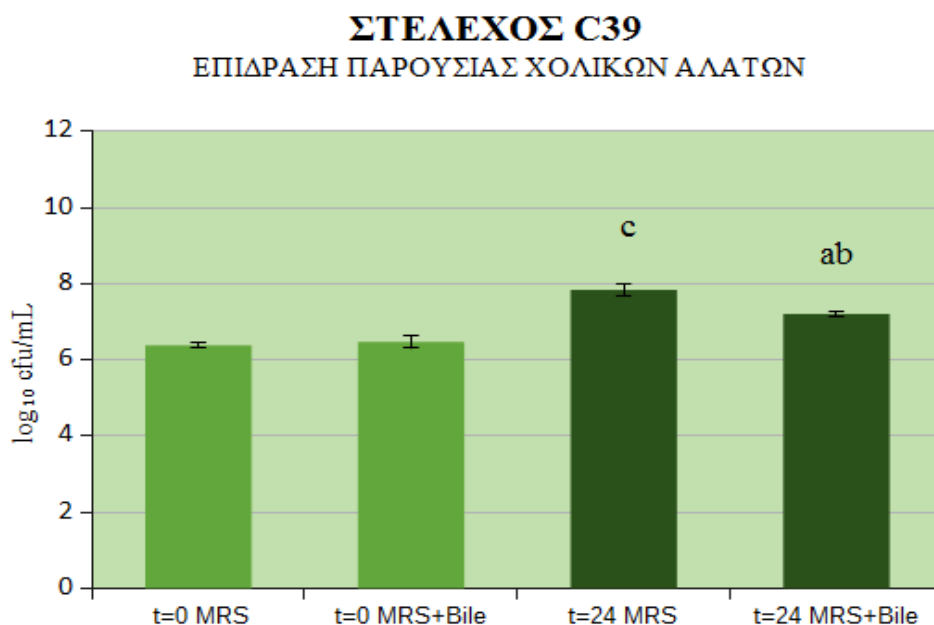
^d: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$) σε t=0 μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό MRS παρουσία ή απουσία χολικών αλάτων (έλεγχος εμβολίου).

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι το στέλεχος C39 όταν καλλιεργείται παρουσία των χολικών αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με τον χρόνο μηδέν ($p<0,05$), αλλά όχι τόσο όσο σε σχέση με την καλλιέργεια του ίδιου στελέχους απουσία των χολικών ($p<0,05$) ενώ δεν υπήρχε διαφορά στα αρχικά εμβόλια ($p=0,38$).

Αντίστοιχα συμπεράσματα προκύπτουν και από την καλλιέργεια του στελέχους C50 2γ.

Δηλαδή όταν καλλιεργείται παρουσία χολικών, αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με τον χρόνο μηδέν ($p<0,05$), αλλά όχι τόσο όσο ο μάρτυρας ($p<0,05$), ενώ δεν υπήρχε διαφορά στα αρχικά εμβόλια ($p=0,37$).

Το στέλεχος Anlb 51 όταν καλλιεργείται παρουσία των χολικών δεν αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με τον χρόνο μηδέν ($p>0,05$). Σε σχέση με τον μάρτυρα εμφανίζει σημαντικά μικρότερο αριθμό κυττάρων όταν καλλιεργείται παρουσία χολικών όπως και τα προηγούμενα στελέχη ($p<0,05$), ενώ δεν υπήρχε διαφορά στα αρχικά εμβόλια ($p=0,13$).



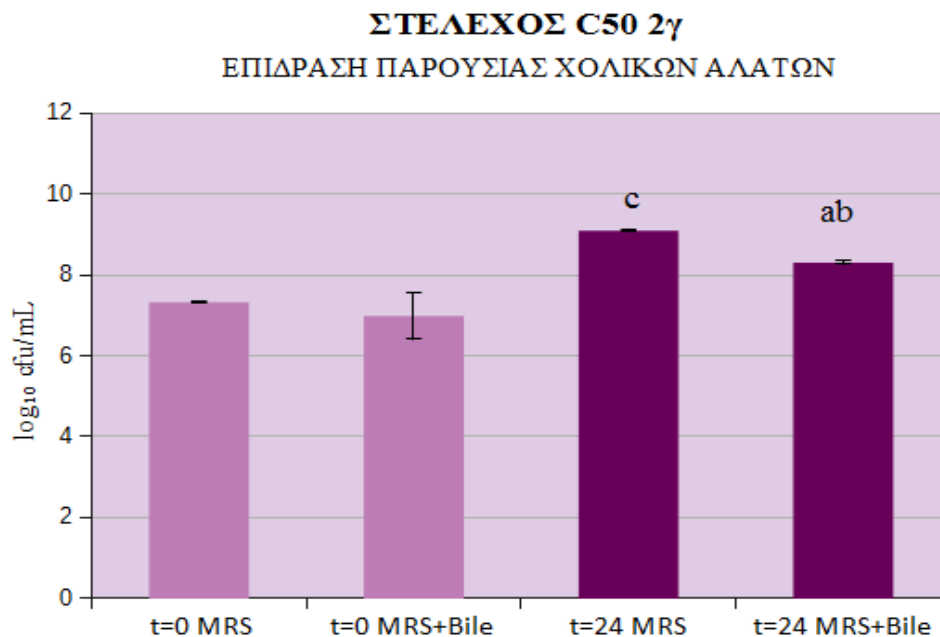
ΣΧΗΜΑ 4. Επίδραση της παρουσίας χολικών αλάτων στην ανάπτυξη του στελέχους **C39**

^a: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε σχέση με το χρόνο στις $t=0$ μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με χολικά άλατα.

^b: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) στις 24h μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με ή χωρίς χολικά άλατα.

^c: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε σχέση με το χρόνο $t=0$ μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό MRS απουσία χολικών αλάτων.

^d: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε $t=0$ μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό MRS παρουσία ή απουσία χολικών αλάτων (έλεγχος εμβολίου)



ΣΧΗΜΑ 5. Επίδραση της παρουσίας χολικών αλάτων στην ανάπτυξη του στελέχους **C50 2γ**

^a: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε σχέση με το χρόνο $t=0$ μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με χολικά άλατα.

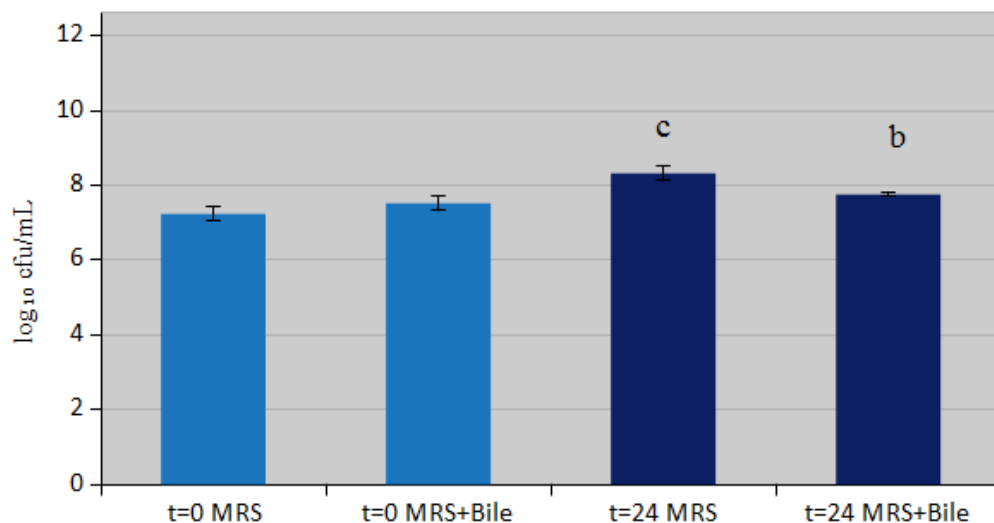
^b: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) στις 24h μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με ή χωρίς χολικά άλατα.

^c: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε σχέση με το χρόνο $t=0$ μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό MRS απουσία χολικών αλάτων.

^d: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε $t=0$ μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό MRS παρουσία ή απουσία χολικών αλάτων (έλεγχος εμβολίου)

ΣΤΕΛΕΧΟΣ Anlb51

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΧΟΛΙΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ



ΣΧΗΜΑ 6. Επίδραση της παρουσίας χολικών αλάτων στην ανάπτυξη του στελέχους Anlb51

^a: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε σχέση με το χρόνο $t=0$ μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με χολικά άλατα.

^b: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) στις 24h μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με ή χωρίς χολικά άλατα.

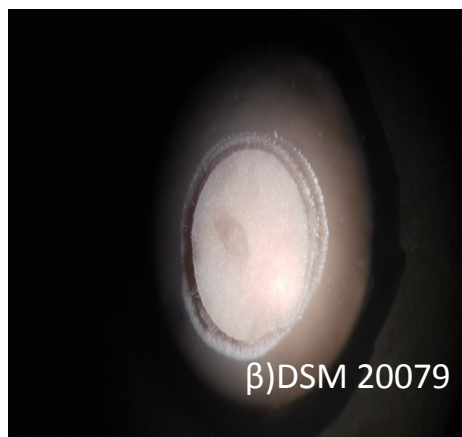
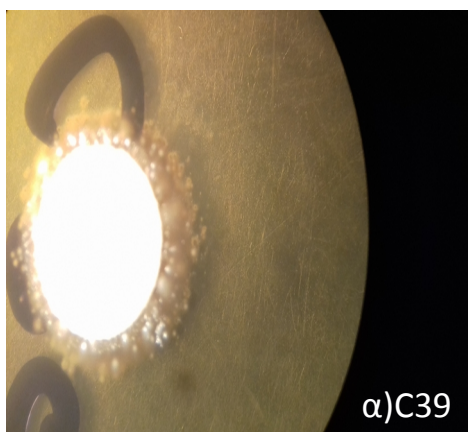
^c: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε σχέση με το χρόνο $t=0$ μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό MRS απουσία χολικών αλάτων.

^d: Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) σε $t=0$ μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό MRS παρουσία ή απουσία χολικών αλάτων (έλεγχος εμβολίου)

3.3. Έλεγχος δράσης υδρολότητας των χολικών αλάτων των υπό μελέτη στελεχών

Ο έλεγχος της δράσης της υδρολότητας των χολικών έγινε με παρατήρηση της ύπαρξης ζώνης ιζήματος γύρω από το σημείο όπου έγινε η τοποθέτηση των καλλιιεργειών ανά 24ωρο και μέχρι την συμπλήρωση 72 ωρών. Θετικό ως προς την υδρολότητα εμφανίστηκε το στέλεχος C39.

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DSM 20079.



Εικόνα 4. α) Δοκιμή παρουσίας της BSH στο στέλεχος C39 β) Δοκιμή παρουσίας της BSH στο στέλεχος DSM 20079

ΚΕΦ.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για να προωθήσουν τα ευεργετικά τους αποτελέσματα στον ξενιστή, τα προβιοτικά πρέπει να μπορούν να επιζήσουν κατά την διέλευσή τους μέσω όξινων συνθηκών του γαστρικού περιβάλλοντος και να είναι σε θέση να φθάσουν στο παχύ έντερο σε επαρκείς ποσότητες για να μπορέσουν να επιζήσουν και να αποικήσουν εκεί . Δυστυχώς, τα περισσότερα προβιοτικά δεν έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν λόγω του χαμηλού pH (pH=2) του γαστρικού υγρού το οποίο περιορίζει την αποτελεσματικότητά τους .(Li,et al. ,2011)

Η μικρο-ενθυλάκωση είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα οι προβιοτικοί πληθυσμοί εγκλείονται μέσα σε μια κάψουλα με σκοπό να προστατεύσει τα κύτταρα από την αποικοδόμηση έναντι των επιβλαβών παραγόντων που θα εμφανισθούν κατά την διέλευσή της από την αρχή του γαστρεντερικού σωλήνα ως το παχύ έντερο και να απελευθερωθούν με ελεγχόμενους ρυθμούς υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Desai, 2005).

Ο σκοπός της μικρο-ενθυλάκωσης των προβιοτικών είναι η προστασία τους από το χαμηλό pH, τα χολικά άλατα που συναντά κατά τη διάρκεια της γαστρεντερικής μεταφοράς (Muthukumarasamy and Wojtas,2006). Μια μικρο-κάψουλα περιλαμβάνει μία ημι-διαπερατή ή μη διαπερατή, σφαιρική, λεπτή και ισχυρή μεμβράνη που περιβάλλει έναν στερεό και υγρό πυρήνα με πολύ μικρή διάμετρο περίπου 1mm. Τα υλικά εγκλεισμού γενικά αναγνωρίζονται ως ασφαλή συστατικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές τροφίμων (Ei-salam and Ei-shibini,2012). Πολυμερή ποιότητας τροφίμων,όπως αλγινικό, χιτοζάνη, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, κόμμι ξανθάνης, άμυλο, καραγενάνη, ζελατίνη και πηκτίνη, εφαρμόζονται σε μεγάλο βαθμό χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές μικρο-ενθυλάκωσης.(Sultana et al.,2000).

ΚΕΦ.5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα στελέχη C39, C50 2γ, Anlb 51 που μελετήθηκαν προέκυψε τελικά πώς τα στελέχη C50 2γ και Anlb 51 παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε pH 3, ενώ αντίθετα μειώνονται σημαντικά οι πληθυσμοί τους στο ακόμη χαμηλότερο pH 2. Το στέλεχος C39 εμφανίζεται ως πιο ευαίσθητο και στο pH 3 εφόσον ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται σημαντικά τόσο μετά από χρόνο 1,5 ώρες όσο και μετά από χρόνο 3 ώρες επώασης σε αυτές τις συνθήκες. Επίσης τα στελέχη C39 και C50 2γ αυξάνονται σημαντικά παρουσία χολικών, αλλά το Anlb 51 δεν παρουσιάζει σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα με τα χολικά. Τέλος παρατηρήθηκε δράση της υδρολάσης των χολικών μόνο στο στέλεχος C39.

Πίνακας 6. Τελικό προφίλ των υποψήφιων προβιοτικών

	pH2	pH3	Χολικά άλατα	BSH
Anlb51	-	+	-	-
C39	-	-	+	+
C50 2γ	-	+	+	-

Με (-) & (+) σημειώνονται στον παραπάνω πίνακα τα στελέχη εκείνα που δεν έδειξαν ανθεκτικότητα και αντίστοιχα κατά τις δοκιμές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ

ABD EL-SALAM, M. H., & EL-SHIBINY, S. (2011). Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 13-21. doi:10.1111/j.1471-0307.2011.00737.x

Adlerberth, I., & Wold, A. (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica*, 98(2), 229-238. doi:10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x

Alvarez-Olmos, M. I., & Oberhelman, R. A. (2001). Probiotic Agents and Infectious Diseases: A Modern Perspective on a Traditional Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), 1567-1576. doi:10.1086/320518

Amara, A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(2), 107-114. doi:10.1016/j.jsps.2013.07.001

Arrieta, M., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M., & Finlay, B. (2014). The Intestinal Microbiome in Early Life: Health and Disease. *Frontiers in Immunology*, 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00427

Backhed, F. (2005). Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*, 307(5717), 1915-1920. doi:10.1126/science.1104816

Bekkering, P., Jafri, I., Van Overveld, F. J., & Rijkers, G. T. (2013). The intricate association between gut microbiota and development of Type 1, Type 2 and Type 3 diabetes. *Expert Review of Clinical Immunology*, 9(11), 1031-1041. doi:10.1586/1744666x.2013.848793

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174. doi:10.1159/000342079

Brookes, R. M., & Buckle, A. E. (1992). Lactic Acid Bacteria in Plant Silage. *The Lactic Acid Bacteria Volume 1*, 363-386. doi:10.1007/978-1-4615-3522-5_14

Charteris, Kelly, Morelli, & Collins. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 759-768. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00407.x

Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., & Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep23129

Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(10), 701-712. doi:10.1038/nrn3346

Dashkevich, M. P., & Feighner, S. D. (1989). Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 11-16.

Dairy Microbiology Handbook. (2002). doi:10.1002/0471723959

Desai, K. G., & Jin Park, H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394. doi:10.1081/drt-200063478

Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., & Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature*, 449(7164), 811-818. doi:10.1038/nature06245

Dominguez-Bello, M. G., Blaser, M. J., Ley, R. E., & Knight, R. (2011). Development of the Human Gastrointestinal Microbiota and Insights From High-Throughput Sequencing. *Gastroenterology*, 140(6), 1713-1719. doi:10.1053/j.gastro.2011.02.011

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11971-11975. doi:10.1073/pnas.1002601107

Du Toit, M., Franz, C., Dicks, L., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., ... Holzapfel, W. (1998). Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1-2), 93-104. doi:10.1016/s0168-1605(98)00024-5

Food and Agriculture Organization/World Health Organization: “Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.” London, Ontario, Canada: Author, 2002

Fuller, R.(1989) . Probiotics in man and animals. *J. Appl. Microbiol.* , 66, 365–378

GILLILAND, S. E. (1979). Beneficial Interrelationships Between Certain Microorganisms and Humans: Candidate Microorganisms for Use as Dietary Adjuncts. *Journal of Food Protection*, 42(2), 164-167. doi:10.4315/0362-028x-42.2.164

GILLILAND, S. E., & SPECK, M. L. (1977). Enumeration and Identity of Lactobacilli in Dietary Products. *Journal of Food Protection*, 40(11), 760-762. doi:10.4315/0362-028x-40.11.760

Gilliland, S., & Walker, D. (1990). Factors to Consider When Selecting a Culture of *Lactobacillus acidophilus* as a Dietary Adjunct to Produce a Hypocholesterolemic Effect in Humans. *Journal of Dairy Science*, 73(4), 905-911. doi:10.3168/jds.s0022-0302(90)78747-4

Gosalbes, M. J., Llop, S., Vallès, Y., Moya, A., Ballester, F., & Francino, M. P. (2013). Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical & Experimental Allergy*, 43(2), 198-211. doi:10.1111/cea.12063

Gupta, V., & Garg, R. (2009). Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3), 202. doi:10.4103/0255-0857.53201

Henriksson, A., Khaled, A. K., & Conway, P. L. (1999). *Lactobacillus* Colonization of the Gastrointestinal Tract of Mice After Removal of the Non-Secreting Stomach Region. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 11(2). doi:10.3402/mehd.v11i2.7893

Holzappel, W., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24(3), 343-362. doi:10.1016/0168-1605(94)00036-6

Hong, P., Croix, J. A., Greenberg, E., Gaskins, H. R., & Mackie, R. I. (2011). Pyrosequencing-Based Analysis of the Mucosal Microbiota in Healthy Individuals Reveals Ubiquitous Bacterial Groups and Micro-Heterogeneity. *PLoS ONE*, 6(9), e25042. doi:10.1371/journal.pone.0025042

Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C., ... Rodríguez, J. M. (2005). Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. *Current Microbiology*, 51(4), 270-274. doi:10.1007/s00284-005-0020-3

Jin, L. Z., Marquardt, R. R., & Zhao, X. (2000). A Strain of *Enterococcus faecium* (18C23) Inhibits Adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to Porcine Small Intestine Mucus. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4200-4204. doi:10.1128/aem.66.10.4200-4204.2000

K Gogineni, V., & Morrow, L. E. (2013). Probiotics: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Journal of Probiotics & Health*, 01(01). doi:10.4172/2329-8901.1000101

Keighley, M. R., Arabi, Y., Dimock, F., Burdon, D. W., Allan, R. N., & Alexander-Williams, J. (1978). Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut*, 19(12), 1099-1104. doi:10.1136/gut.19.12.1099

Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., ... Ley, R. E. (2010). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement_1), 4578-4585. doi:10.1073/pnas.1000081107

Kofoed, C. A. (1934). Antony van Leeuwenhoek and His "Little Animals". Clifford Dobell. *Isis*, 21(1), 216-218. doi:10.1086/346843

Kotsou, M. G., Mitsou, E. K., Oikonomou, I. G., & Kyriacou, A. A. (2008). In Vitro Assessment of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains from Infant Gut Microflora. *Food Biotechnology*, 22(1), 1-17. doi:10.1080/08905430701707844

Lee, Y. K. (2014). What could probiotic do for us? *Food Science and Human Wellness*, 3(2), 47-50. doi:10.1016/j.fshw.2014.06.001

Lin MY, Chang F(2000)J: Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digest Dis Sci* 45:1617–1622,

Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell*, 124(4), 837-848. doi:10.1016/j.cell.2006.02.017

- Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748. doi:10.1126/science.147.3659.747
- Li, X. Y., Chen, X. G., Sun, Z. W., Park, H. J., & Cha, D. (2011). Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1479-1485. doi:10.1016/j.carbpol.2010.09.053
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <http://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Martin JA, Hamilton BE, Ventura SJ, et al. 2011. Births: final data for 2009. *Natl Vital Stat Rep* 60:1–70.
- Metchnikoff, E (1908). Etude sur la flore intestinale. *Ann. d. l'Inst. Pasteur* 22: 929-955
- MISHRA, V., & PRASAD, D. (2005). Application of in vitro methods for selection of strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109-115. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.047
- Moro, E (1900). Ueber den *Bacillus acidophilus*. *Jahrb. f. Kinderh.* 52: 38-55
- Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P., & Holley, R. A. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in Different Types of Microcapsules. *Journal of Food Science*, 71(1), M20-M24. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.tb12395.x
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sánchez, B., Margolles, A., & De los Reyes-Gavilán, C. G. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low PH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1), 79-86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.003

O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688-693. doi:10.1038/sj.embor.7400731

Ott, S. J. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(5), 685-693. doi:10.1136/gut.2003.025403

Parker, C. T., Taylor, D., & Garrity, G. M. (2003). Exemplar Abstract for *Lactobacillus acidophilus* (Moro 1900) Hansen and Mocquot 1970 (Approved Lists 1980). The NamesforLife Abstracts. doi:10.1601/ex.20839

Pereira, D. I., & Gibson, G. R. (2002). Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4689-4693. doi:10.1128/aem.68.9.4689-4693.2002

Rajilić-Stojanović, M. (2013). Function of the microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), 5-16. doi:10.1016/j.bpg.2013.03.006

Robinson, R.K. (2002). Dairy microbiology. (Elsevier applied science, London), pp 241-318

Salminen, S. and Wright, A. (1998a). Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects. (Marcel Dekker Inc., New York), pp. 1-73

Sherman, JM (1938).The enterococci and related streptococci.*J.Bacteriol.*35:81-93

Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., & Ho, Y. W. (2017). Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(8), 666-676. doi:10.1080/07315724.2017.1337529

Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227-238. doi:10.1038/nrmicro2974

Stevens, D. L. (2012). Streptococci and enterococci. Oxford Medicine Online. doi:10.1093/med/9780199204854.003.070602_update_001

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 47-55. doi:10.1016/s0168-1605(00)00380-9

Swidsinski, A., Mendling, W., Loening-Baucke, V., Ladhoff, A., Swidsinski, S., Hale, L. P., & Lochs, H. (2005). Adherent Biofilms in Bacterial Vaginosis. *Obstetrics & Gynecology*, 106(5, Part 1), 1013-1023. doi:10.1097/01.aog.0000183594.45524.d2

Tannock, G. W. (2004). A Special Fondness for Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3189-3194. doi:10.1128/aem.70.6.3189-3194.2004

Thirabunyanon, M., Boonprasom, P., & Niamsup, P. (2008). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology Letters*, 31(4), 571-576. doi:10.1007/s10529-008-9902-3

Van den Abbeele, P., Grootaert, C., Marzorati, M., Possemiers, S., Verstraete, W., Gerard, P., ... Van de Wiele, T. (2010). Microbial Community Development in a Dynamic Gut Model Is Reproducible, Colon Region Specific, and Selective for Bacteroidetes and Clostridium Cluster IX. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5237-5246. doi:10.1128/aem.00759-10

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222-227. doi:10.1038/nature11053