



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Πτυχιακή εργασία

Μελέτη της in vitro ανάπτυξης υποψήφιων προβιοτικών στελεχών που έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών σε πρεβιοτικά υποστρώματα

ΜΟΛΔΟΒΑΝΙΔΗ ΤΑΤΙΑΝΑ

ΑΜ 214130

Αθήνα, 2021

[1]



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ ΚΥΡΙΑΚΟΥ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αδαμαντίνη Κυριακού
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Μαρία Κώτσου
Μέλος Ε.ΔΙ.Π, Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ. , Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Τζώρτζης Νομικός
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αθήνα, 2021

Η Μολδοβανίδα Τατιάνα,

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.

Ευχαριστίες,

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Αδαμαντίνης Κυριακού.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου κυρία Αδαμαντίνη Κυριακού για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την συγκεκριμένη εργασία, για την καθοδήγησή της, καθώς επίσης για τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να δώσω στην κυρία Μαρία Κώτσου, μέλος Εργαστηριακού Διδακτορικού Προσωπικού, για το αμέριστο ενδιαφέρον, την καθοδήγηση και για τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ακόμη, θερμές ευχαριστίες δίνω στην διδάκτορα Σοφία Ποιμενίδου, για την άριστη συνεργασία μας, την υπομονή της και την βοήθεια που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του ερευνητικού πρωτοκόλλου.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου που είναι οι πιο θερμοί υποστηρικτές μου σε όλα μου τα βήματα και δεν αποτέλεσαν ποτέ τροχοπέδη στα όνειρά μου.

Στους γονείς μου...

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<u>Περίληψη στα Ελληνικά.....σελ.8</u>	
<u>Περίληψη στα Αγγλικά.....σελ.10</u>	
<u>Εισαγωγή.....σελ.11</u>	
<u>1. Εντερικός μικροβιόκοσμος.....σελ.11</u>	
<u>2. Προβιοτικά.....σελ.11</u>	
<u>2.1. Ορισμός προβιοτικών.....σελ.11</u>	
<u>2.2. Ιδιότητες προβιοτικών.....σελ.12</u>	
<u>2.3. Απομόνωση και χορήγηση προβιοτικών.....σελ.12</u>	
<u>2.4. Το γένος <i>Lactobacillus</i>.....σελ.13</u>	
<u>2.5. Μηχανισμός δράσης προβιοτικών.....σελ.14</u>	
<u>2.6. Οφέλη προβιοτικών για την υγεία.....σελ.14</u>	
<u>3. Πρεβιοτικά.....σελ.16</u>	
<u>3.1 Ορισμός.....σελ.16</u>	
<u>3.2 Κριτήρια πρεβιοτικών.....σελ.16</u>	
<u>3.3. Ιδιότητες πρεβιοτικών.....σελ.17</u>	
<u>3.4. Οφέλη πρεβιοτικών για την υγεία.....σελ.17</u>	
<u>3.5. Φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS)σελ.18</u>	
<u>3.6. Ινουλίνη.....σελ.19</u>	
<u>3.7. Β-γλυκάνες.....σελ.19</u>	
<u>3.7.1. Ευεργετικές δράσεις β-γλυκανών.....σελ.20</u>	
<u>3.7.2. Εφαρμογές β-γλυκανών στα τρόφιμα.....σελ.21</u>	
<u>4. Τροφογενή παθογόνα.....σελ.21</u>	
<u>4.1. Λιστέρια.....σελ.21</u>	
<u>Σκοποί πειραματικής έρευνας.....σελ.21</u>	
<u>Α. Ανάπτυξη λακτοβακίλων σε πρεβιοτικά υποστρώματα.....σελ.22</u>	
<u>Β. Έλεγχος αντιλειτουργικής δράσης λακτοβακίλων.....σελ.22</u>	
<u>Κεφ.1 Υλικά και μέθοδοι.....σελ.22</u>	
<u>Προέλευση προβιοτικών στελεχών του γένους <i>Lactobacillus</i>.....σελ.22</u>	

<u>Φύλαξη και προετοιμασία των βακτηριακών στελεχών.....σελ.23</u>	<u>σελ.23</u>
<u>Πρόελευση στελεχών λιστέριας.....σελ.23</u>	<u>σελ.23</u>
<u>A. Μεθοδολογία ανάπτυξης λακτοβακίλλων σε πρεβιοτικά υποστρώματα.....σελ.24</u>	<u>σελ.24</u>
<u>Συμβολισμός για την ποιοτική εκτίμηση της ανάπτυξης των λακτοβακίλλων στις διαφορετικές πηγές C.....σελ.25</u>	<u>σελ.25</u>
<u>B. Μεθοδολογίες ελέγχου αντιλιστεριακής δράσης.....σελ.25</u>	<u>σελ.25</u>
<u>B.1. Πρώτη μέθοδος: Εμβολιασμός τρυβλίων (SPOT INOCULATION METHOD).....σελ.25</u>	<u>σελ.25</u>
<u>B.2. Δεύτερη μέθοδος: Διάχυση σε πηγαδάκια από άγαρ (agar well diffusion assay)..σελ.26</u>	<u>σελ.26</u>
<u>Κεφ.2 Αποτελέσματα.....σελ.27</u>	<u>σελ.27</u>
<u>A. Αποτελέσματα ανάπτυξης λακτοβακίλλων σε πρεβιοτικά υποστρώματα.....σελ.27</u>	<u>σελ.27</u>
<u>A.1. Φωτογραφίες και παρατήρηση τρυβλίων με υποστρώματα γλυκόζης, FOS, ινουλίνης και β γλυκάνης.....σελ.27</u>	<u>σελ.27</u>
<u>A.2 Φωτογραφίες των τρυβλίων με υπόστρωμα β-γλυκάνη σε μεγέθυνση.....σελ.36</u>	<u>σελ.36</u>
<u>B. Αποτελέσματα ελέγχου αντιλιστεριακής δράσης.....σελ.40</u>	<u>σελ.40</u>
<u>B.1. Πρώτη μέθοδος ελέγχου αντιλιστεριακής δράσης-Εμβολιασμός τρυβλίων(SPOT INOCULATION METHOD): Φωτογραφίες τρυβλίων-Παρατήρηση.....σελ.40</u>	<u>σελ.40</u>
<u>B.2. Δεύτερη μέθοδος ελέγχου αντιλιστεριακής δράσης-Διάχυση σε πηγαδάκια από άγαρ (agar well diffusion assay): Φωτογραφίες τρυβλίων-Παρατήρηση.....σελ.47</u>	<u>σελ.47</u>
<u>Κεφ.3 Σχολιασμός Αποτελεσμάτων-Συζήτηση.....σελ.67</u>	<u>σελ.67</u>
<u>A. Σχολιασμός αποτελεσμάτων ανάπτυξης λακτοβακίλλων σε πρεβιοτικά υποστρώματα.....σελ.67</u>	<u>σελ.67</u>
<u>B. Σχολιασμός αποτελεσμάτων ελέγχου αντιλιστεριακής δράσης.....σελ.67</u>	<u>σελ.67</u>
<u>B.1. Σχολιασμός πρώτης μεθόδου ελέγχου αντιλιστεριακής δράσης - Εμβολιασμού τρυβλίων(SPOT INOCULATION METHOD).....σελ.67</u>	<u>σελ.67</u>
<u>B.2. Σχολιασμός δεύτερης μεθόδου ελέγχου αντιλιστεριακής δράσης - Διάχυσης σε πηγαδάκια από άγαρ (agar well diffusion assay).....σελ.68</u>	<u>σελ.68</u>
<u>Βιβλιογραφία.....σελ.69</u>	<u>σελ.69</u>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Εισαγωγή: Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που ζουν στον ανθρώπινο οργανισμό χωρίς να τον βλάπτουν και όταν χορηγούνται σε κατάλληλες ποσότητες παρέχουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή, μέσω της παροδικής διαμόρφωσης του μικροβιόκοσμου του παχέος εντέρου. Επιστημονικές μελέτες δείχνουν ότι στη διαμόρφωση αυτή, μπορεί να συμβάλει ευεργετικά και η χορήγηση πρεβιοτικών, τα οποία είναι συστατικά που δεν διασπώνται από τον ξενιστή και περνούν άπεπτα στο παχύ έντερο, όπου μεταβολίζονται-ζυμώνονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο προκαλώντας επιλεκτική αύξηση της ανάπτυξης ή και της δραστηριότητας συγκεκριμένων βακτηριακών πληθυσμών που υπάρχουν ήδη στο παχύ έντερο.

Ορισμένα προβιοτικά έχουν εμφανίσει αντιλisterιακή δράση, γεγονός που προσέγγισε το επιστημονικό ενδιαφέρον. Το *Listeria monocytogenes* είναι ένα από τα πιο ισχυρά τροφογενή παθογόνα βακτήρια, με ανθεκτικότητα σε συνθήκες επεξεργασίας τροφίμων, που μπορεί να γίνει επικίνδυνο για την υγεία του ξενιστή, ιδιαίτερα για ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού όπως οι εγκυμονούσες ή οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει μέχρι και στο θάνατο.

Σκοπός: Α) Η μελέτη της καλλιέργειας και της ανάπτυξης in vitro προβιοτικών στελεχών, συγκεκριμένα λακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από τον εντερικό σωλήνα θηλαζόντων νεογνών, σε διαφορετικά πρεβιοτικά υποστρώματα, συγκεκριμένα γλυκόζης, ινουλίνης, φρουκτοολιγοσακχαριτών (FOS) και β-γλυκανών.

Β) Ο έλεγχος ύπαρξης αντιλisterιακής δράσης ορισμένων στελεχών λακτοβακίλλων καλλιεργημένων σε γλυκόζη και FOS.

Υλικά-μέθοδοι: Α) Στελέχη του γένους *Lactobacillus spp.*, τα οποία έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών (Συλλογή Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου), καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό MRS agar, στο οποίο είχε προστεθεί, ως πηγή C γλυκόζη, είτε FOS, είτε ινουλίνη, είτε β γλυκάνες και έγινε αναερόβια επώαση των στελεχών στους 37°C. Παρατηρήθηκε και συγκρίθηκε η ανάπτυξή τους στις 24, στις 48 και τις 72 ώρες.

Β) Για τον έλεγχο της αντιλisterιακής δράσης επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν «ενεργοποιημένες καλλιέργειες» από τα στελέχη λακτοβακίλλων που σημείωσαν την καλύτερη ανάπτυξη στα θρεπτικά υλικά με πηγή C γλυκόζη ή FOS. Ο έλεγχος της αντιλisterιακής δράσης έγινε με δύο πειραματικές μεθόδους, την μέθοδο ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΤΡΥΒΛΙΩΝ (SPOT INOCULATION METHOD) και την μέθοδο ΔΙΑΧΥΣΗΣ ΣΕ ΑΓΑΡ (agar well diffusion assay).

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα: Α) Όλα τα υπό εξέταση στελέχη αναπτύσσονται στα θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν ως πηγή άνθρακα γλυκόζη, FOS ή ινουλίνη, ενώ ορισμένα από αυτά αναπτύχθηκαν αρκετά καλά και στο υπόστρωμα που περιείχε β-γλυκάνη. Εκείνα τα υποστρώματα που ευνόησαν περισσότερο την ανάπτυξη των λακτοβακίλλων ήταν της γλυκόζης και των FOS. Σε ορισμένα στελέχη μάλιστα παρατηρήθηκε καλύτερη ανάπτυξη στο υπόστρωμα FOS από ότι στη γλυκόζη.

Β) Σε καμία από τις δύο μεθόδους δεν ανιχνεύτηκε στέλεχος με εμφανή αντιλisterιακή δράση, δηλαδή εμφάνιση ξεκάθαρων διαυγών ζωνών γύρω από τα εμβολιασμένα σημεία. Το αποτέλεσμα αυτό, δεν μπορεί σε καμία περίπτωση να γενικευτεί ως προς το σύνολο των

λακτοβάκιλων, πόσο μάλλον ως προς το σύνολο των προβιοτικών μικροοργανισμών. Κάθε στέλεχος είναι μοναδικό και διαθέτει ξεχωριστές ιδιότητες. Για τον λόγο αυτό, το συμπέρασμα της παρούσας έρευνας περιορίζεται στην αλληλεπίδραση των συγκεκριμένων προβιοτικών στελεχών με τα συγκεκριμένα στελέχη λιστέριας που χρησιμοποιήθηκαν.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: εντερικός μικροβιόκοσμος, προβιοτικά, πρεβιοτικά, λακτοβάκιλλοι, ινουλίνη, β-γλυκάνη, φρουκτοολιγοσακχαρίτες, *Listeria monocytogenes*

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that when they administered in suitable quantities, they are beneficial by contributing to the host's intestinal microbial balance. Prebiotics are substrates, not digested by the host, but they are selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit. Some probiotic strains have demonstrated antimicrobial activity against foodborne pathogens. *Listeria monocytogenes* is one of the most harmful foodborne pathogens and also it is extremely resistant in food processing methods.

Aim: 1) To investigate whether different prebiotic substrates (Fructo-oligosaccharides, inulin, β -glucan) can be used for the cultivation of potential probiotic *Lactobacillus* strains, isolated from infant's gut microbiota. 2) To investigate the anti-listerial activity of these *Lactobacillus* strains, cultivated into prebiotic substrates (Fructo-oligosaccharides - FOS).

Results:

Our results showed that all the *Lactobacillus spp.* strains that were tested can grow in FOS and inulin, but only a few of them can grow properly in β -glucan. The most suitable substrate for the growth of these stains was the FOS (glucose).

The antimicrobial activity of these lactobacilli against *Listeria monocytogenes* was tested with two different methods (spot inoculation method and agar well diffusion assay). Nevertheless, none of the tested strains appeared to have obvious anti-listerial activity. These results can't be generalized for all probiotic strains.

KEY WORDS: human gut microbiota, probiotics, prebiotics, *Lactobacillus spp.*, inulin, β -glucan, fructooligosaccharides(FOS), *Listeria monocytogenes*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

Ως εντερικός μικροβιόκοσμος, ορίζεται το σύνολο των μικροοργανισμών που ζουν στο έντερο. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι κυρίως βακτήρια που συνυπάρχουν ωστόσο και με μύκητες, πρωτόζωα, ιούς και αρχαιοβακτήρια (1).

Αν και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί συχνά ανιχνεύονται και αντιμετωπίζονται ως παθογόνοι από το αμυντικό σύστημα του ξενιστή, τα εντερικά βακτήρια είναι στην πλειοψηφία τους μη παθογόνα και συμβιώνουν ομαλά με τον ξενιστή. Μάλιστα, ορισμένα από αυτά ενισχύουν τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς αυξάνοντας την αντιμικροβιακή προστασία. Παράλληλα, οι μικροοργανισμοί του εντέρου παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό θρεπτικών στοιχείων και ξενοβιοτικών φαρμάκων. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι απαραίτητος για την διατήρηση του εντερικού φραγμού και της ακεραιότητας της δομής του γαστρεντερικού σωλήνα, αλλά είναι σημαντικός και για τη διατήρηση της συνολικής υγείας του ατόμου.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τον ρόλο που παίζει ο εντερικός μικροβιόκοσμος στην υγεία αλλά και στην εμφάνιση και θεραπεία νόσων που είτε σχετίζονται με τον γαστρεντερικό σωλήνα, όπως οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου (2) (3), αλλά και μεταβολικών νοσημάτων (πχ. παχυσαρκία, διαβήτη) (4). Επίσης μεγάλο ενδιαφέρον έχει αποκτήσει η σύνδεση του εντερικού μικροβιόκοσμου με το ανοσοποιητικό σύστημα και ασθένειες, όπως οι αλλεργίες (Bisgaard et al., 2011) (5), αλλά και με το νευρικό σύστημα και διάφορες νευροεκφυλιστικές νευροεξελικτικές ασθένειες (Νόσος Parkinson).

2. ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες παρέχουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή, μέσω της παροδικής διαμόρφωσης του μικροβιόκοσμου του παχέος εντέρου. Οι ζωντανοί αυτοί μικροοργανισμοί, αφού επιβιώνουν από την διαδικασία της πέψης, περνούν στο έντερο. Εκεί, ανάλογα με τις εξειδικευμένες ιδιότητες που διαθέτουν, ενισχύουν την ρύθμιση της λειτουργίας του εντέρου με διάφορους τρόπους, για παράδειγμα επιταχύνουν τον χρόνο διέλευσης της τροφής από το πεπτικό σύστημα καταπολεμώντας την δυσκοιλιότητα, τα φουσκώματα ή και εντερικούς πόνους ή ενισχύουν τους φυσικούς αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Τα προβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη διαχείριση τροφικών αλλεργιών, φλεγμονωδών νοσημάτων, δυσκοιλιότητας αλλά και της παιδικής διάρροιας (6). Οι πιο διαδεδομένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί ανήκουν στα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Στις μέρες μας, τα προβιοτικά αποτελούν αντικείμενο επιστημονικής μελέτης με σκοπό να εξακριβωθεί ο ακριβής τρόπος με τον οποίο παρέχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή. Δικαιωματικά λοιπόν τους έχει παραχωρηθεί ο όρος 'Probiotic' που προέρχεται από τις λέξεις 'Pro', που σημαίνει 'για', και 'biotic' που σημαίνει 'βιοτικό' δηλαδή 'για ζωή' (7).

Βέβαια υπάρχουν και βακτηριακά στελέχη που όταν αυξάνεται ο πληθυσμός τους στον εντερικό αυλό μπορούν να έχουν αρνητική επίδραση στην υγεία του ξενιστή. Για το λόγο αυτό υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γύρω απ' την παρέμβαση στους πληθυσμούς των εντερικών βακτηρίων ώστε να επικρατήσουν τα είδη που έχουν ευεργετικές επιδράσεις.

2.2.ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Το υποωήφιο προβιοτικό στέλεχος να έχει ανθρώπινη προέλευση (πχ. Γαστρεντερικό σωλήνα θηλαζόντων νεογνών)
- Να έχει προηγηθεί ταυτοποίηση του στελέχους σε επίπεδο γένους και είδους, η οποία πρέπει να γίνεται με υβριδισμό DNA-DNA και προσδιορισμό της ακολουθίας του rRNA
- Υπάρχουν διεθνείς «τράπεζες» μικροοργανισμών στις οποίες πρέπει να κατατίθενται τα νέα στελέχη
- Πρέπει να είναι μη-παθογόνο και ασφαλές τόσο για τον εμπλουτισμό κάποιου τρόφιμου όσο και για κλινική χρήση
- Πρέπει να έχει την ικανότητα πρόσδεσης στην επιφάνεια του εντερικού βλεννογόνου, χωρίς ωστόσο να το καταστρέφει
- Πρέπει να είναι ικανό να επιβιώνει στον εντερικό σωλήνα ή στο γυναικείο κόλπο (έστω και προσωρινά), ανάλογα με τη χρήση του
- Πρέπει να είναι ανθεκτικό στο όξινο περιβάλλον και στην παρουσία χολικών χωρίς να μπορεί να προκαλέσει σύζευξη των χολικών οξέων
- Δεν πρέπει να διαθέτει μεταθετά γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά
- Πρέπει να είναι ικανό να ανταγωνίζεται άλλα παθογόνα βακτήρια και να παράγει αντιμικροβιακές ουσίες
- Τα προβιοτικά που προορίζονται για κολπική χρήση πρέπει να εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε σπερματοκτόνα
- Πρέπει να υπάρχουν επαληθευμένες κλινικές μελέτες και δεδομένα για τα αποτελέσματα της δράσης του στην ανθρώπινη υγεία

2.3.ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

Τα προβιοτικά είναι ζωντανά μικροβιακά στελέχη. Τα πλέον γνωστά παραδείγματα ανήκουν στα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* (γαλακτοβάκιλλοι) τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως για τον εμπλουτισμό γιαουρτιών και άλλων προβιοτικών γαλακτοκομικών προϊόντων που υπάρχουν στο εμπόριο, όπως ρευστά όξινα γάλατα με ή χωρίς φρούτα και, πρόσφατα, τυριά και παγωτά. Αυτοί οι οργανισμοί είναι μη παθογόνοι, δεν παράγουν τοξίνες, διατηρούν την βιωσιμότητά τους κατά τη διάρκεια της συντήρησης του τροφίμου στο οποίο βρίσκονται και επιζούν από την διέλευσή τους μέσα από το στομάχι και το λεπτό έντερο. Εκεί μπορούν να έχουν πολλαπλές αλληλεπιδράσεις με τον ξενιστή (8) συμπεριλαμβανομένων α) της ανταγωνιστικής

τους δράσης έναντι άλλων μικροβίων, β) των επιδράσεων στη λειτουργία του εντερικού φραγμού αλλά και γ) των αλληλεπιδράσεων με τα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (9).

Τα προβιοτικά απομονώνονται κυρίως από τον εντερικό μικροβιόκοσμο των θηλαζόντων νεογνών, όπως τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, και υπόκεινται σε διάφορες δοκιμές ώστε να ελεγχθούν οι προβιοτικές τους ικανότητες - ιδιότητες όπως αναφέρθηκαν και παραπάνω. Οι δοκιμές αυτές αφορούν, για παράδειγμα στο πόσο ανθεκτικά είναι στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, στα αντιβιοτικά κλπ. (10).

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που απομονώνονται από τα νεογνά ανήκουν κατά κύριο λόγο στο γένος *Lactobacillus* και στο γένος *Bifidobacterium*. Οι λακτοβάκιλλοι είναι οξυγαλακτικά βακτήρια που συναντώνται στον εντερικό μικροβιόκοσμο του εντέρου του ανθρώπου και των ζώων, ενώ τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium*, αν και εντοπίζονται επίσης στον εντερικό μικροβιόκοσμο, ανήκουν στα Ακτινοβακτήρια. Τα μπιφιδοβακτήρια είναι αυστηρά αναερόβια μη σπορογόνα βακτήρια, εμφανίζονται μερικές μέρες μετά τη γέννηση και η συγκέντρωσή τους στο παχύ έντερο μειώνεται με την ηλικία.

Διάφοροι τύποι βακτηρίων και ζυμομυκήτων χρησιμοποιούνται σαν προβιοτικά. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στελέχη του γένους των *Lactobacillus*, που απομονώθηκαν από τον εντερικό σωλήνα θηλαζόντων νεογνών, για το λόγο αυτό, η επόμενη παράγραφος εστιάζει στα χαρακτηριστικά τους.

2.4. ΓΕΝΟΣ LACTOBACILLUS:

Οι λακτοβάκιλλοι είναι gram θετικά, μη σπορογόνα, προαιρετικά αναερόβια ή μικροαερόφιλα βακτήρια με ραβδόμορφο σχήμα, που παράγουν ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού τους γαλακτικό οξύ, γι' αυτό και ανήκουν στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργούν ένα όξινο περιβάλλον το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων ειδών επιβλαβών βακτηρίων (11). Πρόκεινται για μια ομάδα ετερογενών βακτηρίων που ανήκουν στο φύλο *Firmicutes*, στη κλάση *Bacilli* και στην οικογένεια *Lactobacillaceae* (12). Ανάλογα με τα μεταβολικά τους προϊόντα οι λακτοβάκιλλοι του εντερικού σωλήνα διακρίνονται κυρίως σε τρεις ομάδες α) τους υποχρεωτικά ομοζυμωτικούς λακτοβακίλλους, β) τους προαιρετικά ετεροζυμωτικούς λακτοβακίλλους, γ) τους υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς λακτοβακίλλους (13).

Στους ανθρώπους, τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* υπάρχουν φυσιολογικά στον κόλπο, στο γαστρεντερικό σωλήνα (14) και είναι μαζί με τα *bifidobacteria*, τα πρώτα βακτήρια που αποικίζουν το έντερο του βρέφους μετά τη γέννηση (15)

Ορισμένα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γιαουρτιού, τυριού, λάχανου τουρσιού, ψωμιού με προζύμι, κρασιού και άλλων ζυμωμένων προϊόντων (16), (17). Σε όλες τις περιπτώσεις, τα σάκχαρα ζυμώνονται σε γαλακτικό οξύ, δημιουργώντας έτσι ένα εχθρικό περιβάλλον για τους μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση και επιτρέπουν με αυτό τον τρόπο τη συντήρηση των τροφίμων.

2.5.ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

Οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών που προκύπτουν από τελευταίες μελέτες, φαίνεται να ασκούνται μέσω της τροποποίησης του εντερικού μικροβιόκοσμου ή των δραστηριοτήτων του. Αυτό μπορεί να συμβαίνει με διάφορους τρόπους:

- Να συμβάλλουν στην αύξηση παραγωγής εντερικής βλέννης ή και να ενισχύουν την ακεραιότητα του εντερικού βλεννογόνου
- Να παράγουν αντιμικροβιακούς μεταβολικούς παράγοντες που αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών
- Να τροποποιούν την φλεγμονώδη αντίδραση στον εντερικό βλεννογόνο
- Να διεγείρουν τον σχηματισμό μακροφάγων και να ενεργοποιούν μηχανισμούς φαγοκυττάρωσης
- Να συμβάλλουν στην αύξηση κυττάρων που εκκρίνουν IgA, IgG, IgM
- Να αυξάνουν την έκκριση sIgA σε ορό και εντερικό βλεννογόνο

(18),(19).

2.6.ΟΦΕΛΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Όταν για πρώτη φορά διαπιστώθηκε η συμβιωτική σχέση ενός μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών με τους ανώτερους οργανισμούς, δημιούργησε μεγάλη εντύπωση, γιατί είχε επικρατήσει η εντύπωση πως όλοι οι μικροοργανισμοί είναι παθογόνοι. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η πλειοψηφία των μικροοργανισμών όχι μόνο δεν είναι παθογόνοι, αλλά μπορούν να έχουν και ζωτική σημασία για την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, την προστασία έναντι παθογόνων μικροβίων και την πέψη και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών.

Ο μικροβιόκοσμος κάθε οργανισμού ποικίλλει. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του οργανισμού και των διαφόρων συμβιοτικών του μικροοργανισμών, έχουν καθοριστική σημασία για την υγεία και ευεξία του ατόμου. Όταν για κάποιο λόγο διαταραχτεί η ισορροπία μεταξύ των εντερικών μικροβιακών πληθυσμών, ο οργανισμός γίνεται ευάλωτος σε πιθανές μολύνσεις και μπορεί να υπάρξουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του. Η αποκατάσταση της ισορροπίας στον εντερικό μικροβιόκοσμο απαιτεί χρόνο και μπορεί να διευκολυνθεί με τη διατροφή αλλά και με συμπληρώματα διατροφής όπως τα προβιοτικά. Η ισορροπία του εντερικού μικροβιόκοσμου διαταράσσεται με δύο κυρίως τρόπους:

1) Μέσω της χορήγησης αντιβιοτικών, διότι μαζί με τους παθογόνους μικροοργανισμούς θανατώνονται και μη παθογόνοι, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την ομαλή λειτουργία του εντερικού σωλήνα. Έτσι τα αντιβιοτικά μπορούν να προκαλέσουν παρενέργειες όπως διάρροια, μετεωρισμό και εντερικές συσπάσεις. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται προβιοτικά με σκοπό να τις αντισταθμίσουν. Ακόμη, σε περιπτώσεις δυσανεξίας στη λακτόζη, χρησιμοποιούνται για την ανακούφιση των συμπτωμάτων.

2) Παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, μύκητες, παράσιτα και ιοί, μπορούν επίσης να διαταράξουν την εντερική ισορροπία. Η επιστήμη στρέφει τις έρευνες και τις προσπάθειες προς τον περιορισμό των παθογόνων παραγόντων, την αναστολή του πολλαπλασιασμού τους και την

καταστολή της δράσης τους. Ορισμένες παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού όπου τα προβιοτικά φαίνεται να συμβάλλουν θετικά, είναι οι εξής:

- Σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου
- Ελκώδης κολίτιδα
- Νόσος του Crohn
- Προσβολή από το *Helicobacter pylori*, (βακτήριο που ευθύνεται για τα περισσότερα έλκη και αρκετούς τύπους χρόνιας φλεγμονής του στομάχου)
- Η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών είναι αδιαμφισβήτητη στην πρόληψη και αντιμετώπιση διάρροιας, όπως της λοιμώδους διάρροιας, της προκαλούμενης από αντιβιοτικά ή γαστρεντερίτιδας που προκαλείται από τον ρετροϊό.
- Πρόληψη της Νεκρωτικής Εντεροκολίτιδας σε πρόωρα βρέφη
- Φλεγμονές στομάχου και αναπνευστικού συστήματος σε παιδιά
- Πρόληψη της ατοπικής δερματίτιδας
- Πρόληψη και θεραπεία των αλλεργιών σε βρέφη και παιδιά
- Διάβρωση δοντιών και περιοδοντική νόσο
- Αύξηση της απορρόφησης ασβεστίου, σύνθεση βιταμινών και μείωση του κινδύνου εμφάνισης οστεοπόρωσης
- Πρόληψη και θεραπεία λοιμώξεων της γυναικείας ουρογεννητικής οδού
- Μείωση της συχνότητας του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.
- Μείωση του χρόνου αποθεραπείας στην επιμόλυνση από το *Clostridium difficile*
- Μείωση των επιπέδων λιπιδίων στο αίμα και συνεπώς στον περιορισμό των καρδιαγγειακών νοσημάτων
- Περιορισμό του φαινομένου της παχυσαρκίας
- Μείωση του μη ινσουλινοεξαρτόμενου διαβήτη

Για πολλές από τις παραπάνω καταστάσεις, όπως και για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, πρέπει να τονιστεί ότι, για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας των προβιοτικών, διεξάγονται προς το παρόν έρευνες και αναμένεται η εξαγωγή συμπερασμάτων (10),(20).

3. ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ

3.1. ΟΡΙΣΜΟΣ

Η ιδέα των πρεβιοτικών προϊόντων προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Gibson και Roberfroid οι οποίοι αντικατέστησαν το πρόθεμα “προ” της λέξης προβιοτικά με το ελληνικό πρόθεμα “πρε”, για να περιγράψουν τα μη πεπτόμενα συστατικά των τροφίμων, τα οποία περνούν αδιάσπαστα από το λεπτό στο παχύ έντερο και ε_πηρεάζουν θετικά την υγεία του ξενιστή, μέσω

εκλεκτικής επαγωγής της ανάπτυξης ή/και της δραστηριότητας ενός ή περιορισμένου αριθμού βακτηρίων στο παχύ έντερο, κυρίως των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* (21). Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιστημονική Ένωση για τα Προβιοτικά και Πρεβιοτικά (ISAPP), πρεβιοτικά είναι επιλεκτικά ζυμούμενα συστατικά, τα οποία οδηγούν σε εξειδικευμένες μεταβολές της σύστασης ή και της δραστηριότητας του εντερικού μικροβιόκοσμου προς όφελος του ξενιστή (22). Ο ορισμός δεν απέχει πολύ από αυτόν των φυτικών ινών, με εξαίρεση την επιλεκτικότητα και εξειδίκευση των διαφορετικών ειδών πρεβιοτικών ως προς συγκεκριμένα είδη βακτηρίων (23).

3.2.ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ

Τα κριτήρια για την κατάταξη των υδατανθράκων ως πρεβιοτικά είναι:

- 1) αντοχή στην γαστρική δραστηριότητα, στην υδρόλυση από τα ένζυμα και στην γαστρεντερική απορρόφηση
- 2) ζύμωση/μεταβολισμό από τον εντερικό μικροβιόκοσμο
- 3) εκλεκτική αύξηση της ανάπτυξης ή και της δραστηριότητας των εντερικών βακτηρίων που συμβάλλουν στην υγεία και την ευεξία

(24)

Μέχρι σήμερα, δεν έχουν προκύψει ευεργετικά αποτελέσματα στον ξενιστή από τη βακτηριακή ζύμωση στο παχύ έντερο άπεπτων λιπών, πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Με τα πλέον πρόσφατα στοιχεία, μόνον οι άπεπτοι ολιγοσακχαρίτες (NDO), οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) και γαλακτοσακχαρίτες πληρούν τα κριτήρια των πρεβιοτικών. Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες αναφέρονται είτε ως ολιγοφρουκτόζη εάν έχουν μικρό αριθμό πολυμερισμού ($DP < 9$), είτε ως ινουλίνη με μεγαλύτερο αριθμό πολυμερισμού ($9 < DP < 60$). Αντιθέτως το ανθεκτικό άμυλο αλλά και άλλοι πολυσακχαρίτες (από το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, ημικυτταρίνες, πηκτίνες, κόμμεα) δεν ανταποκρίνονται στη βασική προϋπόθεση της εκλεκτικής επαγωγής αύξησης βακτηρίων, αλλά επάγουν την μη εκλεκτική βακτηριακή αύξηση και τον μεταβολισμό των βακτηρίων στο κόλον. Επάγουν δηλαδή την αύξηση, τόσο των πιθανά επιβλαβών όσο και των ευεργετικών για την υγεία του ξενιστή ειδών. Επιπλέον άλλοι υδατάνθρακες υποψήφιοι για πρεβιοτικές ιδιότητες είναι η λακτουλόζη και οι ολιγοσακχαρίτες που περιέχουν γαλακτόζη, ξυλόζη και μαννόζη.

3.3.ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ

Τα πρεβιοτικά είναι αβιοτικά συστατικά τροφίμων, πράγμα που σημαίνει ότι δεν αντιμετωπίζουν τα προβλήματα που συνδέονται με τη χρήση των προβιοτικών στελεχών σε τρόφιμα όσον αφορά τη μικροβιακή επιβίωση. Επιπλέον, τα πρεβιοτικά δεν αντιμετωπίζουν το πρόβλημα της επιβίωσης από τις όξινες συνθήκες στο στομάχι, τις εκκρίσεις του λεπτού εντέρου και από τον μικροβιακό ανταγωνισμό του παχέος εντέρου, που είναι ένα σημαντικό εμπόδιο για την αύξηση ή ακόμα και την επιβίωση των προβιοτικών στελεχών που εισέρχονται στο γαστρεντερικό σωλήνα (25)

Συγκεκριμένα τα πρεβιοτικά διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

- Λεπτός έλεγχος στη ρύθμιση του μικροβιόκοσμου και εκλεκτικός πολλαπλασιασμός των <<ωφέλιμων>> βακτηρίων (bifidobacter, lactobaccili)
- Αποφυγή δυσάρεστων παρενεργειών, όπως αύξηση προϊόντων που παράγουν αέρια, ενίσχυση παθογόνων μικροοργανισμών κλπ.
- Αναστολή προσκόλλησης των παθογόνων
- Υψηλό μοριακό βάρος, παραμονή σε απόμακρο σημείο στο κόλον και αργή ζύμωση
- Ζύμωση σε μικτή καλλιέργεια και εκλεκτική αύξηση συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών
- Διαθέσιμοι σε διαφορετικά μοριακά βάρη και τρόπους σύνδεσης
- Έχουν α 1-6 δεσμούς και υδατανθρακικούς δακτυλίους πυρανοσίλης
- Κυμαινόμενη σύνθεση μονοσακχαριτών και κυμαινόμενο ιζώδες
- Διαθέτουν ακολουθίες κατάλληλων υποδοχέων
- Ενεργά στην διατροφικά εφικτή δόση (όσο το δυνατόν χαμηλότερη)
- Καλή αποθήκευση και σταθερότητα στην επεξεργασία
- Διαφορετική γλυκύτητα

Προκειμένου να πετύχουν τις ιδιότητες αυτές, τα πρεβιοτικά πρέπει να μεταβολίζονται από συγκεκριμένα είδη-στόχους, όπως μπιφιδοβακτήρια και λακτοβάκιλλους και όχι από κάποιον άλλο οργανισμό (26).

3.4.ΟΦΕΛΗ ΤΩΝ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Η δράση τους φαίνεται πως είναι ήπια καθαρτική και αυτό το γεγονός οφείλεται στην οσμωτική τους επίδραση και στην ευεργετική επίδραση των βακτηρίων για τα οποία αποτελούν υπόστρωμα. Κύριο χαρακτηριστικό των πρεβιοτικών, είναι ο παρατεταμένος χρόνος παραμονής τους στο παχύ έντερο, με αποτέλεσμα την αύξηση της βακτηριακής μάζας και του όγκου των κοπράνων, που οφείλεται στη διαλυτότητα και στο ιζώδες των πρεβιοτικών.

Τα θετικά αποτελέσματα που αναμένουμε από τα πρεβιοτικά είναι τα εξής:

- Διατήρηση και ενίσχυση της σύνθεσης των ευεργετικών ομάδων του εντερικού μικροβιόκοσμου
- Αύξηση της απορρόφησης των ιχνοστοιχείων
- Ρύθμιση της παραγωγής των γαστρεντερικών πεπτιδίων και του ενεργειακού μεταβολισμού
- Βελτίωση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού και εντερικού σωλήνα
- Ενίσχυση του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή
- Πρόληψη και μείωση των εντερικών λοιμώξεων
- Καταπολέμηση της εντερικής φλεγμονής με παράλληλη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου

(27), (28), (29), (30).

Σε μελέτες από πειραματόζωα και ασθενείς, ο συνδυασμός της ινουλίνης και της ολιγοφρουκτόζης με προβιοτικά, φάνηκε ότι όχι μόνο ενισχύει τον πληθυσμό των *Bifidobacteria* και *Lactobacilli*, αλλά και ότι αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων βακτηριακών στελεχών όπως *Clostridium sp*, *Cambylobacter jejuni*, *Enterobacterium sp*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella tyumphimuri* (28) (31).

Μία ακόμη ευεργετική δράση τους είναι ότι τόσο τα πρεβιοτικά όσο και τα προβιοτικά, φαίνεται να αυξάνουν τον πληθυσμό των βακτηρίων γαλακτικού οξέος, με αποτέλεσμα την ακόλουθη διέγερση της παραγωγής βουτυρικού οξέος. Το βουτυρικό οξύ χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας για τα εντεροκύτταρα και φαίνεται ότι συσχετίζεται με τις αντικαρκινικές ιδιότητες των πρεβιοτικών. Επίσης, το προπιονικό οξύ που παράγεται και αυτό από τον μεταβολισμό των πρεβιοτικών, παρεμποδίζει τη σύνθεση της χοληστερόλης, άρα φαίνεται να βοηθά στη μείωση της στο αίμα. Ακόμη, το προπιονικό οξύ βοηθά και στη βελτίωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (32).

Η αποτελεσματικότητα των πρεβιοτικών είναι ένα πολύπλοκο αντικείμενο έρευνας, το οποίο απαιτεί την συνεκτίμηση πολλών παραμέτρων, όπως τη μεταβολή των βακτηριακών πληθυσμών του εντερικού μικροβιόκοσμου σε δείγματα κοπράνων. Τα πρεβιοτικά θεωρείται ότι προσφέρουν αντίστοιχο όφελος με τα προβιοτικά στο έντερο, αλλά την ίδια στιγμή είναι πιο οικονομικά και είναι πιο εύκολο να ενταχθούν σε μια διατροφή σε σχέση με τα προβιοτικά, επειδή στην πλειοψηφία τους είναι υδατάνθρακες που μπορούν να προστεθούν σε ένα πολύ ευρύτερο φάσμα προϊόντων διατροφής (π.χ. είδη ζαχαροπλαστικής, ψημένα τρόφιμα, καθώς και πιο παραδοσιακά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση πχ. γάλα και ποτά φρούτων)(24). Παρόλα αυτά η επίδραση τους στην συνολικότερη λειτουργία του εντέρου είναι σχετικά μικρή και πολύ λίγες κλινικές μελέτες έχουν δημοσιευτεί για την γενικότερη επίδραση τους.

3.5.ΦΡΟΥΚΤΟΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) είναι ολιγομερή του μορίου της φρουκτόζης με γενική δομή $\alpha\text{-D-Glu-(1-2)-}[\beta\text{-D-Fru-1-2-}]_n$ όπου (n), ο βαθμός πολυμερισμού, κυμαίνεται από 2 έως 4. Συντίθενται από σουκρόζη μέσω φρουκτοσυλτρανσφερασών που έχουν απομονωθεί από τον *Aspergillus niger*, είτε παραλαμβάνονται με εκχύλιση ριζών του ραδικιού (*Cichoricum intybus*), μετά από μερική ενζυματική υδρόλυση της ινουλίνης. Μπορεί να είναι είτε παράγωγα απλής πολυμερισμένης φρουκτόζης είτε τμήματα φρουκτόζης συνδεδεμένα με ένα μόριο σουκρόζης (33).

Αποτελούν φυσικό συστατικό στο σιτάρι, το κρεμμύδι, το βερίκοκο, τη μπανάνα και το σπαράγγι. Φτάνουν στο κόλον ανέπαφοι καθώς δεν πέπτονται από τον ξενιστή, όπου εκεί μεταβολίζονται εκλεκτικά από μικροοργανισμούς όπως μπιφιδοβακτήρια και λακτοβάκιλλοι (34). Σε in vitro μελέτη στην Αγγλία φάνηκε ότι οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες προκαλούν αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων και ταυτόχρονη μείωση βακτηρίων όπως τα *Bacteroides spp.* και των κλοστριδίων, στις πρώτες 6 ώρες της καλλιέργειας. Οι FOS είναι τα πιο καλά μελετημένα πρεβιοτικά και η ικανότητα τους να προκαλούν επιλεκτική αύξηση των *Bifidobacterium spp.* είναι πλέον αποδεδειγμένη από πολλές in vitro και in vivo μελέτες (35). Θεωρούνται το πλέον

κατάλληλο υπόστρωμα για τα περισσότερα είδη μπιφιδοβακτηρίων συγκριτικά με τη γλυκόζη, την ινουλίνη και τους διακλαδισμένους φρουκτοολιγοσακχαρίτες (36).

3.6.ΙΝΟΥΛΙΝΗ

Η ινουλίνη είναι πολυμερές της D-φρουκτόζης με γενική δομή (1-2)-[β-D-Fru-1-2-]n 60 ενωμένα μεταξύ τους με β-2-1 δεσμό, με συνδεδεμένο μόριο D-γλυκόζης στο άκρο του μορίου, όπου (n), ο βαθμός πολυμερισμού, κυμαίνεται από 2 έως 60. Εφαρμόζοντας ειδικές διαχωριστικές μεθόδους, η βιομηχανία τροφίμων μπορεί να παράγει μακράς αλύσου ινουλίνη, γνωστή ως ινουλίνη HP. Με την ανάμιξη ινουλίνης HP και ολιγοφρουκτόζης προκύπτουν ειδικά προϊόντα με το όνομα συνεργιστική ολιγοφρουκτόζη (37).

Φυσιολογικά η ινουλίνη βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα όπως κρεμμύδι, σκόρδο, ντομάτα, μπανάνα (38). Βιομηχανικά μπορεί να προέλθει από εκχύλιση με καυτό νερό ριζών ραδικιού, που στη συνέχεια ακολουθεί ραφινάρισμα και ξηρό ψέκασμα. Η ινουλίνη κυκλοφορεί εμπορικά σε σκόνη με υψηλή περιεκτικότητα (>90%) σε καθαρή ινουλίνη. Όπως και οι FOS, φτάνει στο κόλον ανέπαφη καθώς δεν πέπτεται από τον ξενιστή, όπου μεταβολίζεται εκλεκτικά από μικροοργανισμούς όπως μπιφιδοβακτήρια και λακτοβάκιλλους (24).

3.7.Β-ΓΛΥΚΑΝΕΣ

Οι β-γλυκάνες είναι φυσικοί πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων και στο κυτταρικό τοίχωμα του ενδοσπερμίου των δημητριακών. Θεωρούνται διαιτητικές ίνες διότι το πεπτικό σύστημα του ανθρώπου δεν διαθέτει τα κατάλληλα ένζυμα για την διάσπαση και αφομοίωσή τους. Έτσι δεν πέπτονται από τον ξενιστή και καταλήγουν στο παχύ έντερο, όπου υφίστανται ζυμώσεις από ορισμένα βακτήρια (39). Από προηγούμενες μελέτες παρέμβασης, έχει φανεί ότι η πρόσληψη β-γλυκανών συμβάλλει στην ανάπτυξη των θετικών για την υγεία βακτηρίων όπως *Bifidobacterium* spp. και *Enterococcus* spp. (40), καθώς επίσης και στη μείωση πιθανών παθογόνων βακτηρίων όπως τα *Clostridium* spp. (41). Φυσική πηγή των β-γλυκανών είναι η βρώμη, το κριθάρι, κάποια μανιτάρια, φύκη και ζύμες. Η περιεκτικότητα της βρώμης και του κριθαριού σε β-γλυκάνες είναι υψηλότερη από όλα τα υπόλοιπα δημητριακά που τις περιέχουν και συγκεκριμένα είναι 2,5-11% για το κριθάρι και 2,2-7,8% για την βρώμη.

Οι β-γλυκάνες είναι πολυμερή της γλυκόζης, ενωμένα με β-1,3, β-1,4 και β-1,6 γλυκοζιδικούς δεσμούς. Η μακρομοριακή δομή τους εξαρτάται από την πηγή τους. Συγκεκριμένα οι β-γλυκάνες που προέρχονται από μύκητες και ζύμες αποτελούνται από ένα γραμμικό σκελετό γλυκόζης με β(1→3) γλυκοζυτικούς δεσμούς και πλευρικές αλυσίδες γλυκόζης με β(1→6) γλυκοζυτικούς δεσμούς, εκείνες που προέρχονται από τα δημητριακά είναι πολυσακχαρίτες γλυκόζης με β(1→3) και β(1→4) γλυκοζυτικούς δεσμούς και αυτές που προέρχονται από τα βακτήρια είναι πολυσακχαρίτες γλυκόζης με β(1→3) γλυκοζυτικούς δεσμούς (42).

3.7.1.ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ

Έχει αποδειχτεί ότι έχουν πολλές ευεργετικές δράσεις για τον οργανισμό, όπως ότι μπορούν να λειτουργήσουν προληπτικά στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου μέσω της δράσης τους στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Βακτηριακά γένη όπως τα κλωστρίδια, *Bacteroides* και αρκετά άλλα μέλη του εντερικού μικροβιόκοσμου συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης στο παχύ έντερο, ενώ αντίθετα ορισμένα άλλα όπως οι λακτοβάκιλλοι και μπιφιδοβακτήρια δύνανται να αδρανοποιήσουν καρκινογόνες ουσίες και να ασκήσουν προστατευτική δράση. Ωστόσο ακόμα δεν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες στον άνθρωπο.

Ακόμη η κατανάλωση β-γλυκανών, μειώνει την επιθυμία πρόσληψης τροφής, λόγω αύξησης του ιξώδους στο περιεχόμενο του στομάχου και της μείωσης της απορρόφησης της τροφής από το λεπτό έντερο, δράσεις που φαίνεται να οδηγούν στη μείωση της όρεξης (43). Αυτή τους η δράση θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντική βοήθεια στην καταπολέμηση της παχυσαρκίας, αφού σε μια ισορροπημένη διατροφή όπου καλύπτονται οι ανάγκες σε θρεπτικά συστατικά, ο έλεγχος του σωματικού βάρους σχετίζεται με την ρύθμιση της ενεργειακής πρόσληψης και της όρεξης. Σε πρόσφατη έρευνα παρατηρήθηκε ότι δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε β-γλυκάνη οδήγησε σε μείωση του βάρους σε ποντίκια καθώς επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση της ορμόνης PYY στο πλάσμα, ενός πεπτιδίου με ισχυρή ανορεξιογόνο δράση η οποία ασκείται μέσω ελάττωσης του ορεξιογόνου πεπτιδίου NPY (44). Το αίσθημα κορεσμού που μπορεί να επέλθει μεταγευματικά είναι ανάλογο με την περιεκτικότητα β-γλυκάνης και σύμφωνα με την βιβλιογραφία κορεσμός εμφανίζεται με ημερήσια πρόσληψη πάνω από 2γρ β-γλυκάνης. Προϊόντα με διαφορετικές περιεκτικότητες β-γλυκάνης, παρέχουν παρόμοιες ωφέλειες, ωστόσο απαιτείται ανεξάρτητος έλεγχος κάθε προϊόντος (45).

Μια επιπλέον αξιοσημείωτη ευεργετική δράση των β-γλυκανών, είναι η διέγερση της άμυνας του οργανισμού. Οι β-1,3 και β-1,6 γλυκάνες είναι οι πλέον αποτελεσματικές στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού μας συστήματος, που βρίσκονται κυρίως στα μανιτάρια και στις ζύμες. Οι β-1,4 γλυκάνες που βρίσκονται στα δημητριακά βρώμη, κριθάρι κλπ. είναι ευεργετικές για τον άνθρωπο αλλά δεν έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικές ως προς την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού. Ωστόσο πολλές φορές προωθούνται λανθασμένα ως ενεργοποιητές της άμυνας του οργανισμού μας μέσα από διαφημίσεις και σκευάσματα συμπληρωμάτων διατροφής (46).

3.7.2.ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

Οι παραπάνω ευεργετικές ιδιότητες των β-γλυκανών έστρεψαν το ενδιαφέρον των ερευνητών στην πιθανή ενσωμάτωσή τους σε σύνθετα τρόφιμα. Ήδη έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς η προσθήκη αλεύρου βρώμης και κριθαριού εμπλουτισμένων με β-γλυκάνες σε αρκετά προϊόντα όπως ζυμαρικά (47), (48), (49), δημητριακά πρωινού (50) και αρτοσκευάσματα αυξάνοντας την περιεκτικότητα των β-γλυκανών στα τρόφιμα αυτά (51), (48). Μία επιπλέον ιδιότητα των β-γλυκανών που έχει μελετηθεί, είναι η χρήση τους ως παράγοντες αύξησης του ιξώδους. Συγκεκριμένα, καθарές β-γλυκάνες ή δημητριακά εμπλουτισμένα με αυτές, χρησιμοποιούνται ως σταθεροποιητές και ως μιμητές λίπους (52) με σκοπό να τροποποιήσουν την υφή και την εμφάνιση σε χαμηλής λιποπεριεκτικότητας και θερμιδικής αξίας προϊόντα, όπως γιαούρτι (53), λευκού τύπου τυρί άλμης (54), λουκάνικα (55).

4. ΤΡΟΦΟΓΕΝΗ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

4.1. ΟΡΙΣΜΟΣ

Τροφογενή ονομάζονται τα παθογόνα που μπορεί να προκαλέσουν τροφογενή λοίμωξη στον άνθρωπο μετά από την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου ή ποτού.

4.2. *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Το *Listeria monocytogenes* είναι ένα Gram-θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, με ραβδόμορφο σχήμα που δεν σχηματίζει σπόρια. Έχει την ικανότητα να κινείται με τη βοήθεια μαστίγιου σε θερμοκρασία 30°C και κάτω, ενώ δεν παρουσιάζει κίνηση στους 37°C (56). Πρόκειται για το τροφογενές βακτήριο που προκαλεί τη λιστερίωση, την τρίτη μεγαλύτερη αιτία θανάτου μεταξύ των τροφογενών νοσημάτων στην Αμερική, με το 18% των ασθενών που έχουν μολυνθεί να καταλήγουν σε θάνατο (57). Εμφανίζει σημαντική ανθεκτικότητα σε συνθήκες επεξεργασίας τροφίμων, όπως αυξημένη οξύτητα, αυξημένη αλατότητα και χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης των τροφίμων, που το καθιστά ένα από τα πιο ισχυρά και επικίνδυνα τροφογενή παθογόνα βακτήρια (58), (59).

Το *Listeria* βρίσκεται φυσικά στο περιβάλλον, τόσο στο έδαφος και στη βλάστηση όσο και στα ζώα. Η κύρια οδός μετάδοσης πιστεύεται ότι είναι μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων αν και δεν αποκλείεται η μόλυνση απευθείας από το ζώο στον άνθρωπο, είτε και από άνθρωπο σε άνθρωπο. Τα τρόφιμα με τα οποία έχει συνδεθεί είναι κυρίως τα ωμά και τα μαγειρεμένα πουλερικά, τα λουκάνικα, τα ωμά και τα καπνιστά ψάρια, τα ακατέργαστα κρέατα, το νωπό και το παστεριωμένο γάλα, τα μαλακά ζυμωμένα τυριά (π.χ. μπρι), το παγωτό και τα ωμά λαχανικά (60).

Ο οργανισμός αυτός προκαλεί δύο μορφές λιστερίωσης: την μη διηθητική και την διηθητική λιστερίωση. Σε υγιή άτομα, τα συμπτώματα της μη διηθητικής λιστερίωσης είναι συνήθως τα τυπικά συμπτώματα ίωσης (πονοκέφαλος κλπ.). Ωστόσο, η κατάσταση γίνεται κρίσιμη στην περίπτωση προσβολής ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, όπως οι ηλικιωμένοι και οι ασθενείς που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική αγωγή, όπου η λιστερίωση μπορεί να εκδηλωθεί με σηψαιμία ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Η διηθητική λιστερίωση μπορεί να εμφανιστεί εξαιρετικά επικίνδυνη στην περίπτωση προσβολής εγκύου, αφού μπορεί να μεταδοθεί στο έμβρυο από τη μητέρα του μέσω του πλακούντα και να οδηγήσει σε αποβολή ή πολλαπλών μορφών λοίμωξης για το νεογνό (61).

ΣΚΟΠΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

A. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ ΣΕ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Σκοπός: Η παρατήρηση, ο έλεγχος και η σύγκριση της τυχόν ανάπτυξης λακτοβακίλλων σε διαφορετικά πρεβιοτικά υποστρώματα. Ειδικότερα, μελετήθηκαν οι πρεβιοτικές ενώσεις ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη ως πηγές C για την καλλιέργεια και ανάπτυξη συγκεκριμένων στελεχών λακτοβακίλλων σε τρυβλία.

B. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΛΙΣΤΕΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΩΝ

Σκοπός: Ο έλεγχος της ύπαρξης αντιλisterιακής δράσης ορισμένων στελεχών λακτοβακίλλων καλλιεργημένων σε γλυκόζη και φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) με δύο διαφορετικές πειραματικές μεθόδους, α) με εμβολιασμό σε τρυβλία με την μέθοδο spot inoculation και β) με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ (agar well diffusion assay), ώστε να ελεγχθούν και να επαληθευτούν τα αποτελέσματα.

ΚΕΦ.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ LACTOBACILLUS

Τα υπό μελέτη στελέχη του γένους *Lactobacillus* ανήκουν στην Συλλογή του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου και η απομόνωση τους έγινε από δείγματα κοπράνων υγιών νεογνών.

Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα στελέχη λακτοβακίλλων, που ελέγχθηκαν στη παρούσα μελέτη, για τα οποία έγινε ταυτοποίηση:

ΚΩΔΙΚΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
Anlb-1, Anlb-9, Anlb-10, Anlb-11, Anlb-13, Anlb-15, Anlb-25, Anlb-52, Anlb-46, C44, C58, *GG(control)	<i>L. rhamnosus</i>
Anlb-16, Anlb-17, Anlb-26, Anlb-49	<i>L. acidophilus 3 or L acidophilus 1</i>
Anlb-21, C5, C9, C15, C28, C32, C45, C59, C72, C74	<i>L. gasseri</i>
Anlb-30, C1, C51	<i>L. crispatus</i>
Anlb-44	<i>L. salivarius</i>
Anlb-47, C68, C70	<i>L. paracasei paracasei</i>
Anlb-18, Anlb-40	<i>L. delbueckii delbrueckii</i>
Anlb-23, Anlb-29	<i>L. fermentum</i>
Anlb-48	<i>L. plantarum</i>
Anlb-38	<i>L. brevis</i>
Anlb-51, C39, C50	<i>Lactobacillus spp.</i>
**DSM20079(control)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (αγορασμένο από συλλογή)

*Ο GG είναι προβιοτικό στέλεχος που έχει απομονωθεί από φαρμακευτικό προϊόν και τον χρησιμοποιούμε ως control

**Ο DSM20079 είναι πρότυπο στέλεχος από τη συλλογή DSM και τον χρησιμοποιούμε ως control

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Τα παραπάνω στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν από καλλιέργειες που φυλάσσονταν σε διάλυμα γλυκερόλης 30% στους – 80ο C. Πραγματοποιήθηκαν 3 ανακαλλιέργειες σε τρυβλία με MRS agar, προκειμένου στα πειράματα να χρησιμοποιηθούν «ενεργοποιημένες καλλιέργειες», δηλαδή καλλιέργειες με 100% βιωσιμότητα, στις οποίες όλοι οι μικροοργανισμοί θα βρίσκονται στην ίδια φυσιολογική κατάσταση και όχι σε διαφορετικά στάδια ο κάθε ένας.

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΛΙΣΤΕΡΙΑ:

Τα στελέχη λιστέρια που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη έρευνα καθώς και οι πηγές απομόνωσής τους παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΠΗΓΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΕΤΟΣ	ΧΩΡΑ
PL1	dairy farm environment	2007	ΙΡΛΑΝΔΙΑ
PL2	Farm house cheese	2000	ΙΡΛΑΝΔΙΑ
PL3(Scott A)	Epidemic strain, human isolate	1983	ΗΠΑ
PL4	Δάπεδο (πλακάκια υγιεινής στεγνά)	2007	ΕΛΛΑΔΑ
PL11	Πλαστικό τελάρο	2007	ΕΛΛΑΔΑ
PL13	Ταινία μεταφοράς	2007	ΕΛΛΑΔΑ
PL18	Ολόκληρο κοτόπουλο FQC 17	2007	ΕΛΛΑΔΑ
PL23 (EGDe)	Κλινική απομόνωση	1924	
FL78	Χοιρινός κιμάς συσκευασμένος	2012	ΕΛΛΑΔΑ
DSM 12464	CONTROL		

Τα συγκεκριμένα στελέχη λιστέρια ανήκουν όλα στο είδος *Listeria monocytogenes* και προέρχονται από τη Συλλογή μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

A. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΩΝ ΣΕ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Για να ελέγξουμε το κατά πόσο τα στελέχη λακτοβακίλλων μπορούν να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας πρεβιοτικές ενώσεις ως πηγή C, παρασκευάζουμε θρεπτικό υλικό MRS χωρίς πηγή C και το αποστειρώνουμε. Η πηγή C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS ή β γλυκάνη θα παρασκευαστεί χωριστά, θα αποστειρωθεί με βακτηριολογικό φίλτρο και θα προστεθεί στο θρεπτικό υλικό μετά την αποστείρωση.

MRS (ISO) AGAR ΧΩΡΙΣ ΠΗΓΗ C (1000ml):

Σε 800 ml dH₂O διαλύονται:

- ✓ 10 g enzymatic digest of casein
- ✓ 10 g meat extract
- ✓ 4 g yeast extract
- ✓ 2 g triammonium citrate
- ✓ 5 g sodium acetate
- ✓ 0.2 g magnesium sulphate heptahydrate
- ✓ 0.05 g manganese sulphate tetrahydrate
- ✓ 2 g dipotassium hydrogen phosphate
- ✓ 1.08 g polyoxyethylenesorbitan monooleate
- ✓ pH 5.7 at 25°C
- ✓ 15.5 g agar

- ❖ Μετά την προσθήκη agar λιώνουμε το υλικό με θέρμανση αναδεύοντάς το σε μαγνητικό αναδευτήρα και το μοιράζουμε σε 50 universal με 16 ml ανά universal.
- ❖ Αποστειρώνουμε (συνθήκες: 121°C, 20min)
- ❖ Μετά την αποστείρωση τοποθετούμε τα universal σε υδατόλουτρο στους 50°C.
- ❖ Διαλύουμε 20g από κάθε πηγή C (γλυκόζη, ινουλίνη, FOS ή β γλυκάνη) σε 200ml dH₂O και αποστειρώνουμε με διήθηση με βακτηριολογικό φίλτρο (της εταιρίας MILLEX με διάμετρο πόρων 0,22μm) σε αποστειρωμένο δοχείο. *
- ❖ Σε κάθε universal προστίθονται 4 ml από την πηγή C. Μετά την προσθήκη της πηγής C, το θρεπτικό υλικό άμεσα τοποθετείται σε τρυβλίο ώστε να στερεοποιηθεί.
- ❖ Σε κάθε τρυβλίο εμβολιάζουμε 6 διαφορετικά στελέχη λακτοβακίλλων (με 2 επαναλήψεις ανά στέλεχος) και επωάζουμε στον αναερόβιο θάλαμο (SHELLAB, Cornelius, OR, USA) στους 37°C. Παρατηρούμε την ανάπτυξη στις 24, 48 και 72h.

*Οι β γλυκάνες ήταν αδιάλυτες στο θρεπτικό υλικό, για αυτό το λόγο προστέθηκαν με μορφή σκόνης μετά την αποστείρωση μαζί με την κατάλληλη ποσότητα νερού, ώστε η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών στο υπόστρωμα να είναι κανονική. Αυτές ευθύνονται για την αδιαφανή όψη των τρυβλίων.

ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ C

Όταν οι λακτοβάκιλοι αναπτύσσονται στο θρεπτικό υλικό των τρυβλίων, διακρίνονται από το άσπρο χρώμα που εμφανίζεται στα σημεία που είχε γίνει ο εμβολιασμός τους. Έτσι συμβολίζουμε τον βαθμό ανάπτυξης των λακτοβακίλλων σε γλυκόζη, FOS και ινουλίνη με **0** όταν δεν αναπτύσσονται καθόλου οι λακτοβάκιλλοι, με **0,5** όταν έχουμε ελάχιστη ανάπτυξή τους, με **1** στην μέτρια, με **1,5** στην καλή και με **2** στην πολύ καλή ανάπτυξη. Επειδή τα τρυβλία που περιέχουν β-γλυκάνη είναι αδιαφανή και δεν είναι εύκολη η παρατήρηση της ανάπτυξης των λακτοβακίλλων, θα συμβολίζουμε με **-** όταν δεν υπάρχει καθόλου ανάπτυξη, με **+** όταν έχουμε μέτρια ανάπτυξη και με **++** όταν η ανάπτυξη είναι καλή.

B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΤΙΛΙΣΤΕΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ

B.1. ΠΡΩΤΗ ΜΕΘΟΔΟΣ: ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΡΥΒΛΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ “SPOT INOCULATION”

Για τη μέθοδο αυτή οι λακτοβάκιλλοι εμβολιάζονται σε διαφορετικά σημεία επάνω σε ένα τρυβλίο MRS agar με μειωμένη συγκέντρωση γλυκόζης και επωάζονται. Μετά την επώαση προστίθεται επάνω στο τρυβλίο μια νέα στοιβάδα υποστρώματος brain heart infusion soft agar στην οποία έχει ενσωματωθεί ένα στέλεχος λιστέρια. Το τρυβλίο επωάζεται εκ νέου και στη συνέχεια παρατηρούμε για τυχόν σχηματισμό διαυγών ζωνών παρεμπόδισης.

MRS (ISO) AGAR (1000ml) με μειωμένη συγκέντρωση γλυκόζης:

Σε 1000 ml dH₂O διαλύονται:

- ✓ 10 g enzymatic digest of casein
- ✓ 10 g meat extract
- ✓ 4 g yeast extract
- ✓ 2 g triammonium citrate
- ✓ 5 g sodium acetate
- ✓ 0.2 g magnesium sulphate heptahydrate
- ✓ 0.05 g manganese sulphate tetrahydrate
- ✓ 2 g dipotassium hydrogen phosphate
- ✓ 1.08 g polyoxyethylenesorbitan monooleate
- ✓ 2 g γλυκόζη
- ✓ pH 5.7 at 25⁰C
- ✓ 12 g agar

- ❖ Μετά την προσθήκη agar το λιώνουμε με θέρμανση αναδεύοντάς το σε μαγνητικό αναδευτήρα και το μοιράζουμε σε 22 medical με 45ml στο καθένα.
- ❖ Αποστειρώνουμε (συνθήκες: 121⁰C, 20min)
- ❖ Μετά την αποστείρωση τοποθετούμε τα medical σε υδατόλουτρο στους 50⁰C και μοιράζουμε σε μεγάλα τρυβλία Petri (150mm).

MRS BROTH (LABM):

Σε 1000ml dH₂O διαλύονται 55g προϊόντος, αναδεύονται σε μαγνητικό αναδευτήρα και μοιράζονται 5ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Αποστειρώνουμε (συνθήκες: 121⁰C, 15min). Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται για τις ανακαλλιέργειες των λακτοβακίλλων:

BRAIN HEART INFUSION BROTH:

Σε 1000ml dH₂O διαλύονται 37g προϊόντος, αναδεύονται σε μαγνητικό αναδευτήρα και μοιράζονται 5ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Αποστειρώνουμε (συνθήκες: 121⁰C, 15min). Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται για τις ανακαλλιέργειες των στελεχών *Listeria*.

BRAIN HEART INFUSION SOFT AGAR:

Σε 1000ml θρεπτικού υλικού brain heart infusion broth προσθέτουμε 7g agar (0,7% άγαρ). Λιώνουμε το υλικό αυτό σε μαγνητικό αναδευτήρα, μοιράζουμε 20ml σε universal και αποστειρώνουμε (121⁰C, 15min). Το υλικό αυτό θα εμβολιαστεί με ένα στέλεχος *Listeria* και θα αποτελέσει την άνω στοιβάδα στα τρυβλία με τους λακτοβάκιλλους.

Την ημέρα του πειράματος:

- ❖ Σε κάθε μεγάλο τρυβλίο Petri (150mm) εμβολιάζουμε με 3ml 12 διαφορετικά στελέχη λακτοβακίλλων (ενεργοποιημένες καλλιέργειες) σε προσημειωμένες θέσεις. Αφού απορροφηθεί το εμβόλιο, επωάζουμε αναερόβια για 24 ώρες στους 37°C.
- ❖ Εμβολιάζουμε τα στελέχη λιστέρια σε υγρές καλλιέργειες των 5ml brain heart infusion broth. Επωάζουμε αερόβια στους 37°C για 24 ώρες.

Την επόμενη ημέρα:

- ❖ Λιώνουμε τα universal με το brain heart infusion soft agar και τα κρατάμε σε υδατόλουτρο στους 50°C.
- ❖ Εμβολιάζουμε κάθε universal με 0,3ml από την ολονύχτια υγρή καλλιέργεια *Listeria*, αναδεύουμε καλά και αδειάζουμε το περιεχόμενο απαλά στο μεγάλο τρυβλίο με τα 12 στελέχη λακτοβακίλλων.
- ❖ Επωάζουμε αναερόβια για 24h και παρατηρούμε για παρουσία διαυγών ζωνών. Για κάθε στέλεχος λακτοβακίλλων και κάθε στέλεχος *Listeria*, πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις.

B.2. ΔΕΥΤΕΡΗ ΜΕΘΟΔΟΣ: ΔΙΑΧΥΣΗ ΣΕ ΑΓΑΡ (agar well diffusion assay)

- ❖ Στη μέθοδο αυτή, 45ml θρεπτικού υποστρώματος Brain Heart Infusion (BHI) broth με 0,7% άγαρ εμβολιασμένου με 700ml από καλλιέργεια 24 ωρών από ένα στέλεχος *L. monocytogenes* απλώθηκαν σε τρυβλία Petri (150mm) τα οποία περιείχαν επιστρωμένο 20ml άγαρ (1,2%).
- ❖ Τα τρυβλία παρέμειναν 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και 1 ώρα στους 4°C για να πήξει πλήρως το υπόστρωμα και στη συνέχεια, με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα, σχηματίστηκαν πάνω σε αυτό πηγάδια διαμέτρου 5mm.
- ❖ Καθένα από αυτά πληρώθηκε με 40ml από το υπερκείμενο καλλιέργειας 24 ωρών (cell free supernatants = υπερκείμενα ελεύθερα κυττάρων) από κάθε υποψήφιο βακτηριακό στέλεχος. Τα τρυβλία παρέμειναν 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει η διάχυση του υπερκείμενου και στη συνέχεια επώαστηκαν αναερόβια, στους 37°C για 24 ώρες.

Λόγω του ότι η συγκεκριμένη μέθοδος ανιχνεύει την αντιμικροβιακή δράση στο υπερκείμενο της υγρής καλλιέργειας του εκάστοτε υποψήφιου βακτηριακού στελέχους πριν από κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- ❖ Όλες οι βακτηριακές «ενεργοποιημένες καλλιέργειες» των υπό εξέταση στελεχών υποβλήθηκαν σε μία τελευταία 24ώρη ανακαλλιέργεια. Συγκεκριμένα, 200ml της ενεργοποιημένης καλλιέργειας εμβολιάστηκαν σε 10ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος (MRS broth για *Lactobacillus* spp.) και επώαστηκαν στους 37°C, για 24 ώρες υπό αναερόβιες συνθήκες. Η παραλαβή των υπερκειμένων των καλλιεργειών έγινε με φυγοκέντρηση στα 3000 x g για 15 λεπτά στους 25°C. Ακολούθησε ρύθμιση του pH των υπερκειμένων στο 6,5 με τη χρήση υπεροξειδίου του νατρίου (NaOH 4M) και διήθηση με βακτηριολογικά φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,22 μm (Millipore GR) για την απομάκρυνση των κυττάρων (62). Το pH των υπερκειμένων ρυθμίστηκε στο 6,5 καθότι

οι ενεργοποιημένες βακτηριακές καλλιέργειες, μετά την τελευταία ανακαλλιέργεια, εμφάνιζαν όξινο pH 4-4,5, λόγω ζύμωσης γαλακτικού οξέος, και αυτό θα μπορούσε να συντελέσει σε μη επιθυμητή αντιμικροβιακή δράση.

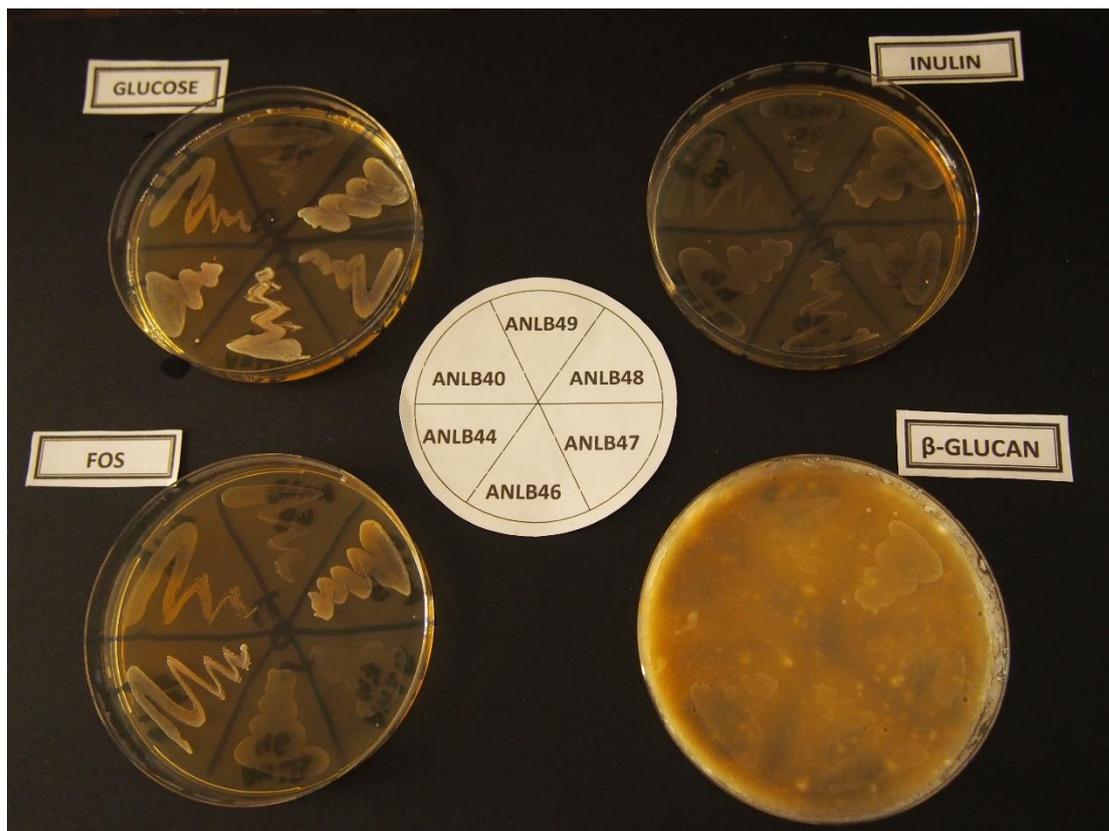
Η ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης έγινε, όπως και στην προηγούμενη μέθοδο, λαμβάνοντας υπόψη τις ίδιες παραμέτρους, δηλαδή τον σχηματισμό ή όχι ξεκάθαρων διαυγών ζωνών γύρω από τα εμβολιασμένα σημεία (πηγαδάκια).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

Α. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ ΣΕ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Α.1. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΡΥΒΛΙΩΝ ΜΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ, FOS, ΙΝΟΥΛΙΝΗΣ ΚΑΙ Β ΓΛΥΚΑΝΗΣ

Οι ακόλουθες φωτογραφίες τραβήχτηκαν 72 ώρες μετά τον εμβολιασμό των τρυβλίων με τα προβιοτικά στελέχη, ύστερα από την επώασή τους σε κατάλληλες αναερόβιες συνθήκες, στον αναερόβιο θάλαμο του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου.



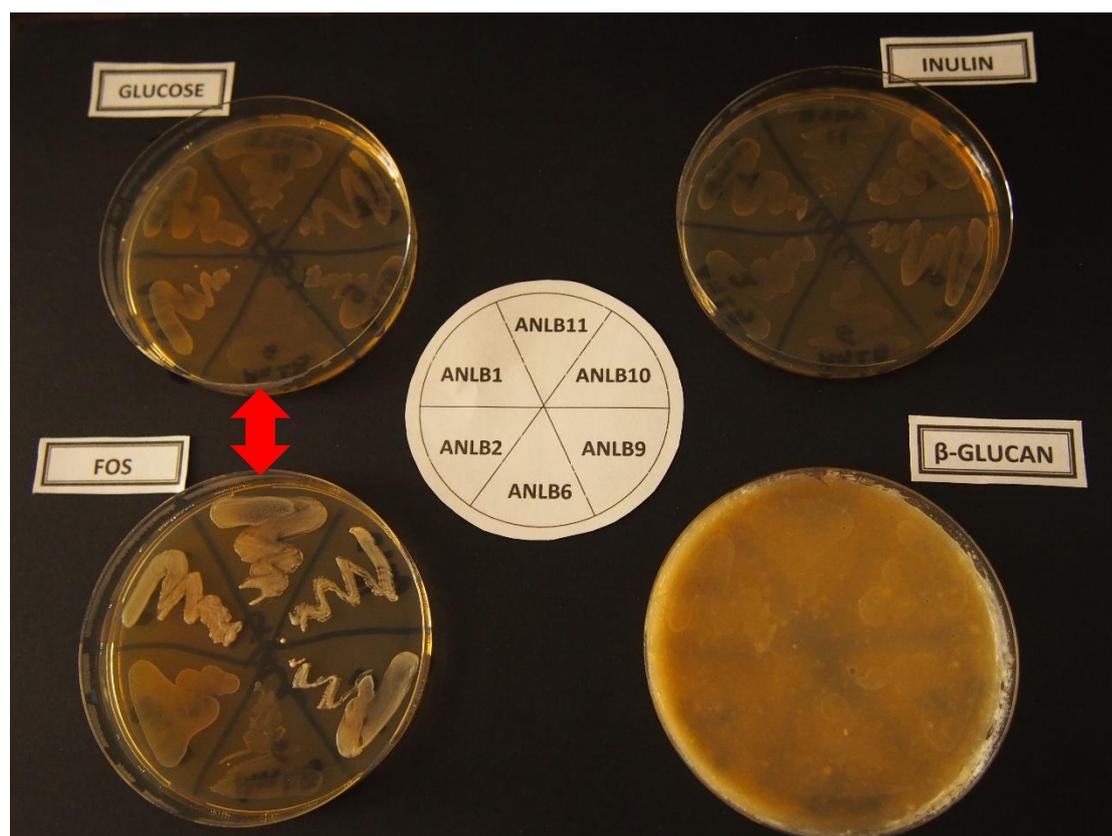
Εικόνα 1: Ανάπτυξη των στελεχών ANLB40, ANLB44, ANLB46, ANLB47, ANLB48, ANLB49, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

Τα αποτελέσματα για την ανάπτυξη των στελεχών ANLB40, ANLB44, ANLB46, ANLB47, ANLB48, ANLB49, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη δίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Βαθμολόγηση της ανάπτυξης των στελεχών ANLB40, ANLB44, ANLB46, ANLB47, ANLB48, ANLB49, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΛΥΚΟΖΗ	FOS	ΙΝΟΥΛΙΝΗ	Β-ΓΛΥΚΑΝΗ
ANLB49	1	1	1	+
ANLB48	2	2	1	++
ANLB47	2	1	1	+
ANLB46	2	1	1	+
ANLB44	2	2	1	++
ANLB40	2	1,5	1	-

Βαθμολογούμε με 0 όταν δεν αναπτύσσονται καθόλου οι λακτοβάκιλλοι, με 0,5 όταν έχουμε ελάχιστη ανάπτυξή τους, με 1 στην μέτρια, με 1,5 στην καλή και με 2 στην πολύ καλή ανάπτυξη. Στην β-γλυκάνη βαθμολογούμε με – όταν δεν υπάρχει καθόλου ανάπτυξη, με + όταν έχουμε μέτρια ανάπτυξη και με ++ όταν η ανάπτυξη είναι καλή.



Εικόνα 2: Ανάπτυξη των στελεχών ANLB1, ANLB2, ANLB6, ANLB9, ANLB10, ANLB11, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

*Στη συγκεκριμένη φωτογραφία έχουν τοποθετηθεί ανάποδα τα τρυβλία της γλυκόζης και των FOS.

Τα αποτελέσματα για την ανάπτυξη των στελεχών ANLB1, ANLB2, ANLB6, ANLB9, ANLB10, ANLB11, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη δίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Βαθμολόγηση της ανάπτυξης των στελεχών ANLB1, ANLB2, ANLB6, ANLB9, ANLB10, ANLB11, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΛΥΚΟΖΗ	FOS	ΙΝΟΥΛΙΝΗ	Β-ΓΛΥΚΑΝΗ
ANLB11	2	1	1	+
ANLB10	2	1	1	++
ANLB9	2	1	1	++
ANLB6	1	1	1	+
ANLB2	1	2	1	-
ANLB1	2	1	1	++

Βαθμολογούμε με 0 όταν δεν αναπτύσσονται καθόλου οι λακτοβάκιλλοι, με 0,5 όταν έχουμε ελάχιστη ανάπτυξή τους, με 1 στην μέτρια, με 1,5 στην καλή και με 2 στην πολύ καλή ανάπτυξη. Στην β-γλυκάνη βαθμολογούμε με - όταν δεν υπάρχει καθόλου ανάπτυξη, με + όταν έχουμε μέτρια ανάπτυξη και με ++ όταν η ανάπτυξη είναι καλή.



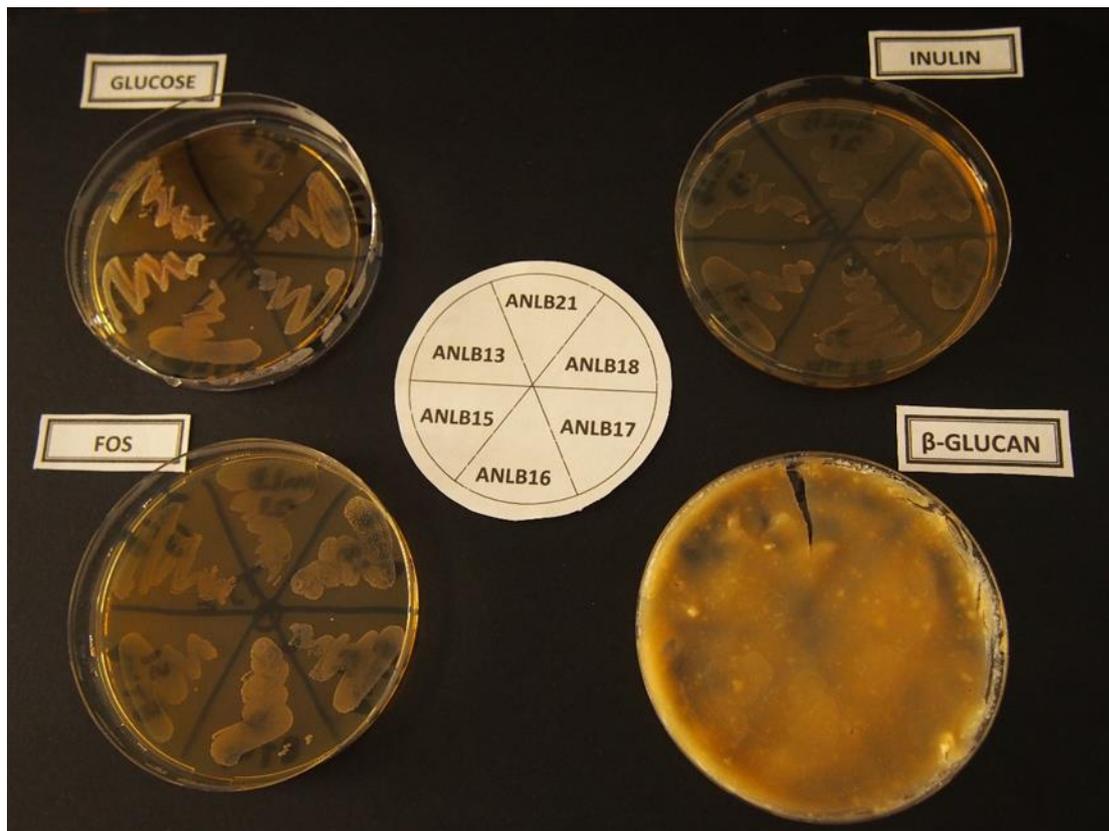
Εικόνα 3: Ανάπτυξη των στελεχών ANLB23, ANLB25, ANLB26, ANLB29, ANLB30, ANLB38, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

Τα αποτελέσματα για την ανάπτυξη των στελεχών ANLB40, ANLB44, ANLB46, ANLB47, ANLB48, ANLB49, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη δίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Βαθμολόγηση της ανάπτυξης των στελεχών ANLB38, ANLB30, ANLB29, ANLB26, ANLB25, ANLB23, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΛΥΚΟΖΗ	FOS	ΙΝΟΥΛΙΝΗ	Β-ΓΛΥΚΑΝΗ
ANLB38	1	0,5	0,5	-
ANLB30	1	1	1	-
ANLB29	2	1	0,5	+
ANLB26	2	1	1	+
ANLB25	2	1	1	+
ANLB23	1	1,5	1	+

Πίνακας 3: Βαθμολόγηση της ανάπτυξης των στελεχών ANLB38, ANLB30, ANLB29, ANLB26, ANLB25, ANLB23, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη. Βαθμολογούμε με 0 όταν δεν αναπτύσσονται καθόλου οι λακτοβάκιλλοι, με 0,5 όταν έχουμε ελάχιστη ανάπτυξή τους, με 1 στην μέτρια, με 1,5 στην καλή και με 2 στην πολύ καλή ανάπτυξη. Στην β-γλυκάνη βαθμολογούμε με – όταν δεν υπάρχει καθόλου ανάπτυξη, με + όταν έχουμε μέτρια ανάπτυξη και με ++ όταν η ανάπτυξη είναι καλή.



Εικόνα 4: Ανάπτυξη των στελεχών ANLB13, ANLB15, ANLB16, ANLB17, ANLB18, ANLB21, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

Τα αποτελέσματα για την ανάπτυξη των στελεχών ANLB13, ANLB15, ANLB16, ANLB17, ANLB18, ANLB21, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη δίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Βαθμολόγηση της ανάπτυξης των στελεχών ANLB13, ANLB15, ANLB16, ANLB17, ANLB18, ANLB21, σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΛΥΚΟΖΗ	FOS	ΙΝΟΥΛΙΝΗ	Β-ΓΛΥΚΑΝΗ
ANLB21	1	1	1	-
ANLB18	2	1,5	1	-
ANLB17	2	1,5	1	+
ANLB16	2	1,5	1	+

ANLB15	2	1	1	+
ANLB13	2	1	1	-

Βαθμολογούμε με 0 όταν δεν αναπτύσσονται καθόλου οι λακτοβάκιλλοι, με 0,5 όταν έχουμε ελάχιστη ανάπτυξή τους, με 1 στην μέτρια, με 1,5 στην καλή και με 2 στην πολύ καλή ανάπτυξη. Στην β-γλυκάνη βαθμολογούμε με – όταν δεν υπάρχει καθόλου ανάπτυξη, με + όταν έχουμε μέτρια ανάπτυξη και με ++ όταν η ανάπτυξη είναι καλή.



Εικόνα 5: Ανάπτυξη των στελεχών C58, C51, C50, C45, C44, C39 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

Τα αποτελέσματα για την ανάπτυξη των στελεχών C58, C51, C50, C45, C44, C39 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη δίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Βαθμολόγηση της ανάπτυξης των στελεχών C58, C51, C50, C45, C44, C39 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΛΥΚΟΖΗ	FOS	ΙΝΟΥΛΙΝΗ	Β-ΓΛΥΚΑΝΗ
C58	2	1	1	+
C51	0,5	0,5	0,5	-
C50	2	2	1	+
C45	1	1	1	-
C44	2	1	1	+
C39	1,5	2	1	+

Βαθμολογούμε με 0 όταν δεν αναπτύσσονται καθόλου οι λακτοβάκιλλοι, με 0,5 όταν έχουμε ελάχιστη ανάπτυξή τους, με 1 στην μέτρια, με 1,5 στην καλή και με 2 στην πολύ καλή ανάπτυξη. Στην β-γλυκάνη βαθμολογούμε με – όταν δεν υπάρχει καθόλου ανάπτυξη, με + όταν έχουμε μέτρια ανάπτυξη και με ++ όταν η ανάπτυξη είναι καλή.



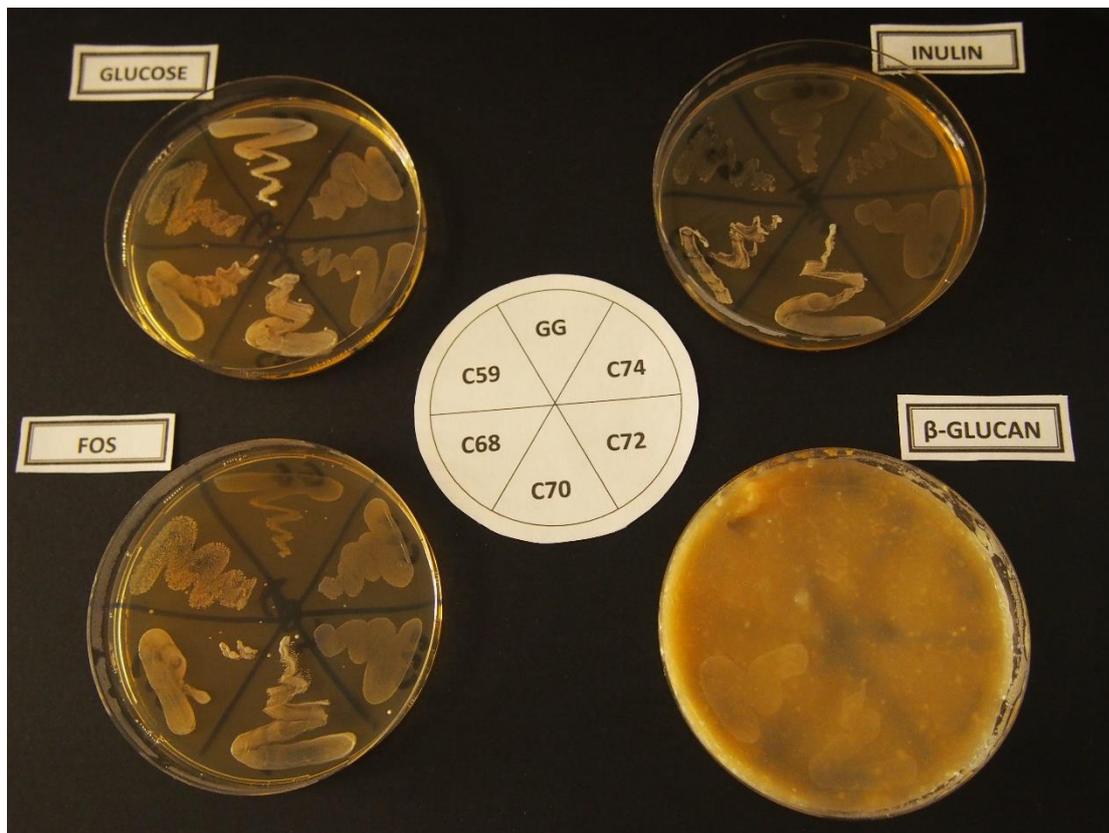
Εικόνα 6: Ανάπτυξη των στελεχών C1, C5, C9, C15, C28, C32 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

Τα αποτελέσματα δια την ανάπτυξη των στελεχών C1, C5, C9, C15, C28, C32 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη δίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Βαθμολόγηση της ανάπτυξης των στελεχών C1, C5, C9, C15, C28, C32 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΛΥΚΟΖΗ	FOS	ΙΝΟΥΛΙΝΗ	Β-ΓΛΥΚΑΝΗ
C32	2	1	1	-
C28	2	1	1	+
C15	2	1	1	-
C9	2	1	1	-
C5	2	1	1	-
C1	2	1,5	1	-

Βαθμολογούμε με 0 όταν δεν αναπτύσσονται καθόλου οι λακτοβάκιλλοι, με 0,5 όταν έχουμε ελάχιστη ανάπτυξή τους, με 1 στην μέτρια, με 1,5 στην καλή και με 2 στην πολύ καλή ανάπτυξη. Στην β-γλυκάνη βαθμολογούμε με - όταν δεν υπάρχει καθόλου ανάπτυξη, με + όταν έχουμε μέτρια ανάπτυξη και με ++ όταν η ανάπτυξη είναι καλή



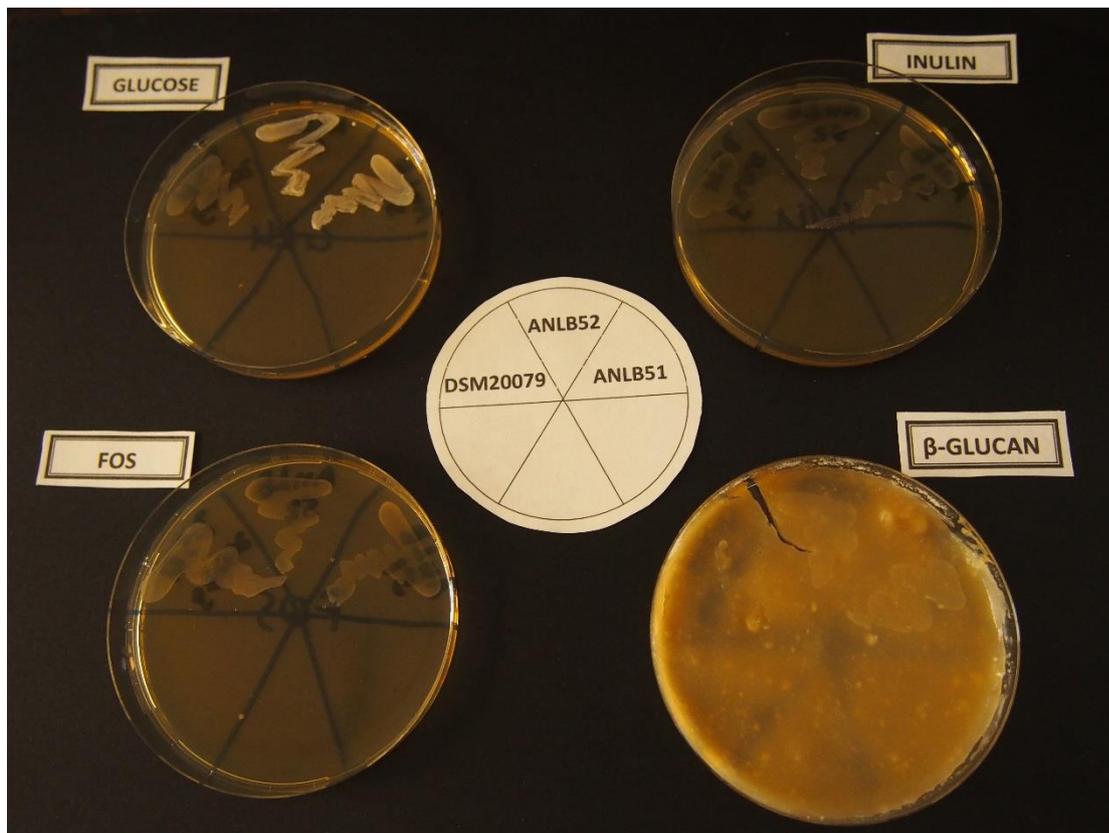
Εικόνα 7: Ανάπτυξη των στελεχών GG, C59, C68, C70, C72, C74 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη

Τα αποτελέσματα για την ανάπτυξη των στελεχών GG, C59, C68, C70, C72, C74 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη δίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Βαθμολόγηση της ανάπτυξης των στελεχών GG, C59, C68, C70, C72, C74 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΛΥΚΟΖΗ	FOS	ΙΝΟΥΛΙΝΗ	Β-ΓΛΥΚΑΝΗ
GG	2	1	1	+
C74	1,5	1	1	-
C72	1,5	1	1	+
C70	2	2	2	+
C68	2	2	2	++
C59	1,5	2	1	-

Βαθμολογούμε με 0 όταν δεν αναπτύσσονται καθόλου οι λακτοβάκιλλοι, με 0,5 όταν έχουμε ελάχιστη ανάπτυξή τους, με 1 στην μέτρια, με 1,5 στην καλή και με 2 στην πολύ καλή ανάπτυξη. Στην β-γλυκάνη βαθμολογούμε με - όταν δεν υπάρχει καθόλου ανάπτυξη, με + όταν έχουμε μέτρια ανάπτυξη και με ++ όταν η ανάπτυξη είναι καλή.



Εικόνα 8: Ανάπτυξη των στελεχών ANLB51, ANLB52, DSM20079 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

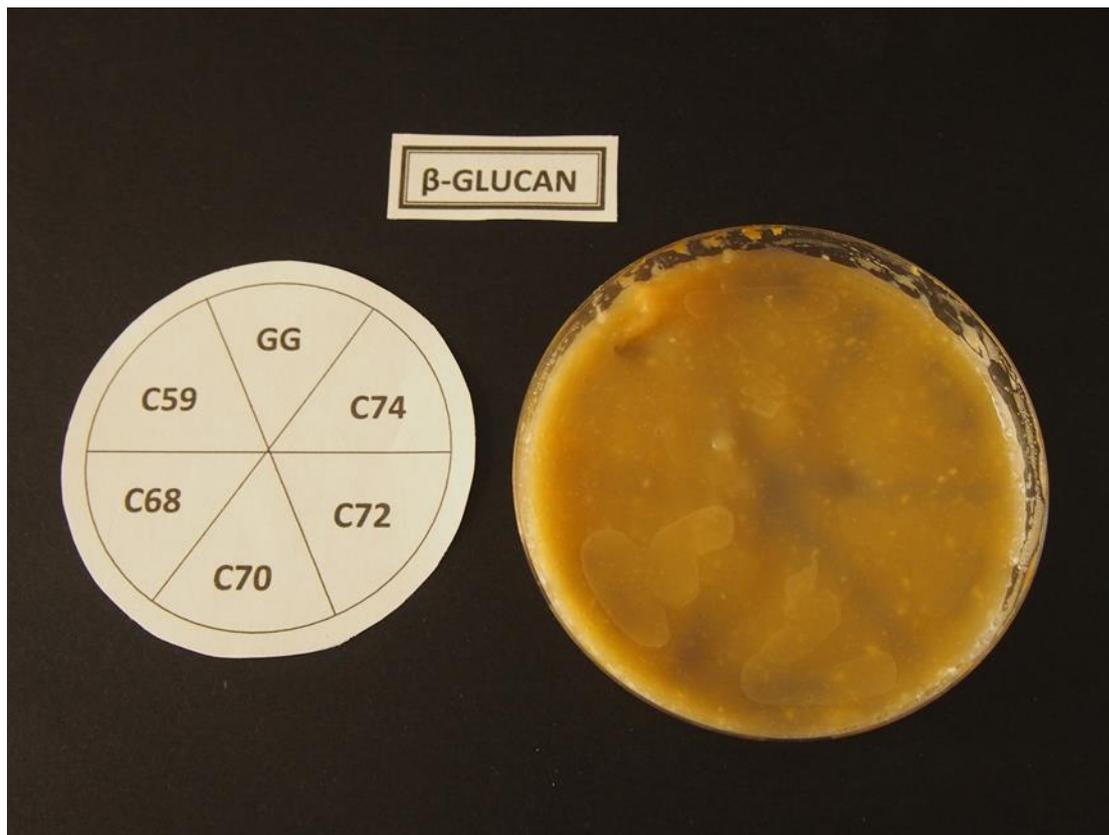
Τα αποτελέσματα για την ανάπτυξη των στελεχών ANLB51, ANLB52, DSM20079 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη δίνονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Βαθμολόγηση της ανάπτυξης των στελεχών ANLB51, ANLB52, DSM20079 σε υποστρώματα με πηγές C γλυκόζη, ινουλίνη, FOS και β-γλυκάνη.

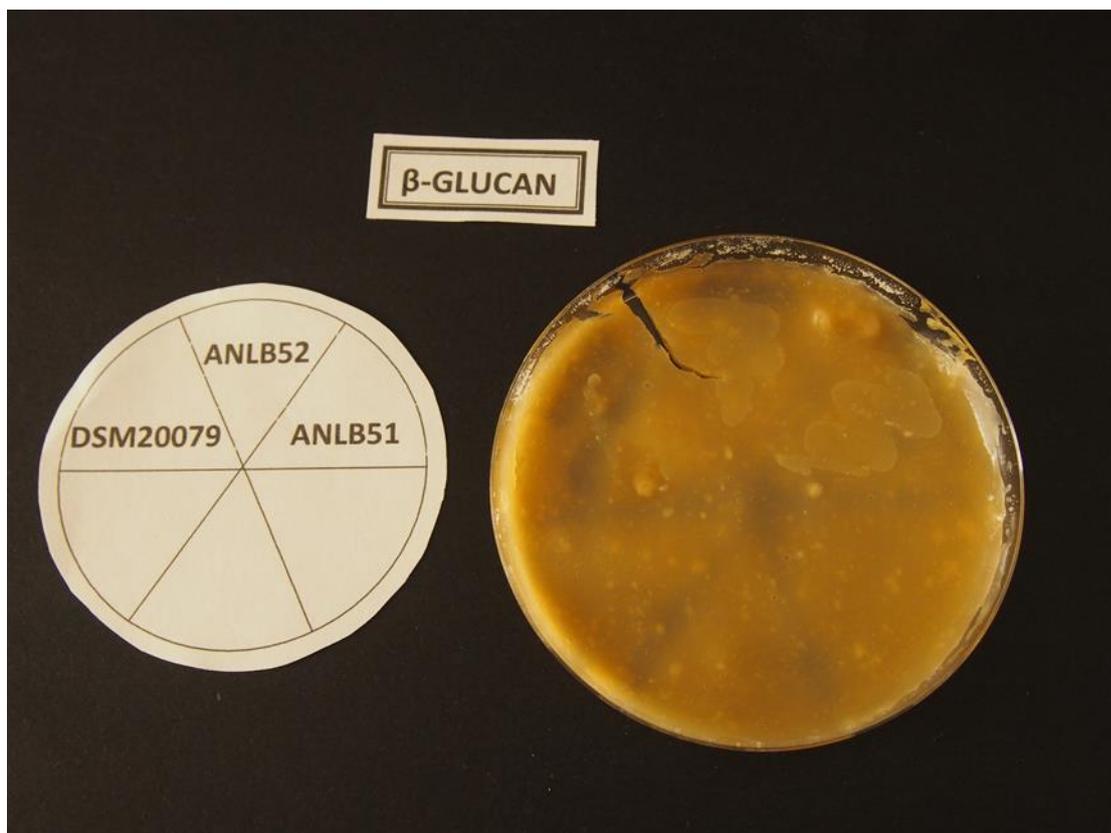
ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΓΛΥΚΟΖΗ	FOS	ΙΝΟΥΛΙΝΗ	Β-ΓΛΥΚΑΝΗ
ANLB52	2	1,5	1	++
ANLB51	2	1	1	++
DSM2 (control)	1	1	0,5	+

Βαθμολογούμε με 0 όταν δεν αναπτύσσονται καθόλου οι λακτοβάκιλλοι, με 0,5 όταν έχουμε ελάχιστη ανάπτυξή τους, με 1 στην μέτρια, με 1,5 στην καλή και με 2 στην πολύ καλή ανάπτυξη. Στην β-γλυκάνη βαθμολογούμε με – όταν δεν υπάρχει καθόλου ανάπτυξη, με + όταν έχουμε μέτρια ανάπτυξη και με ++ όταν η ανάπτυξη είναι καλή.

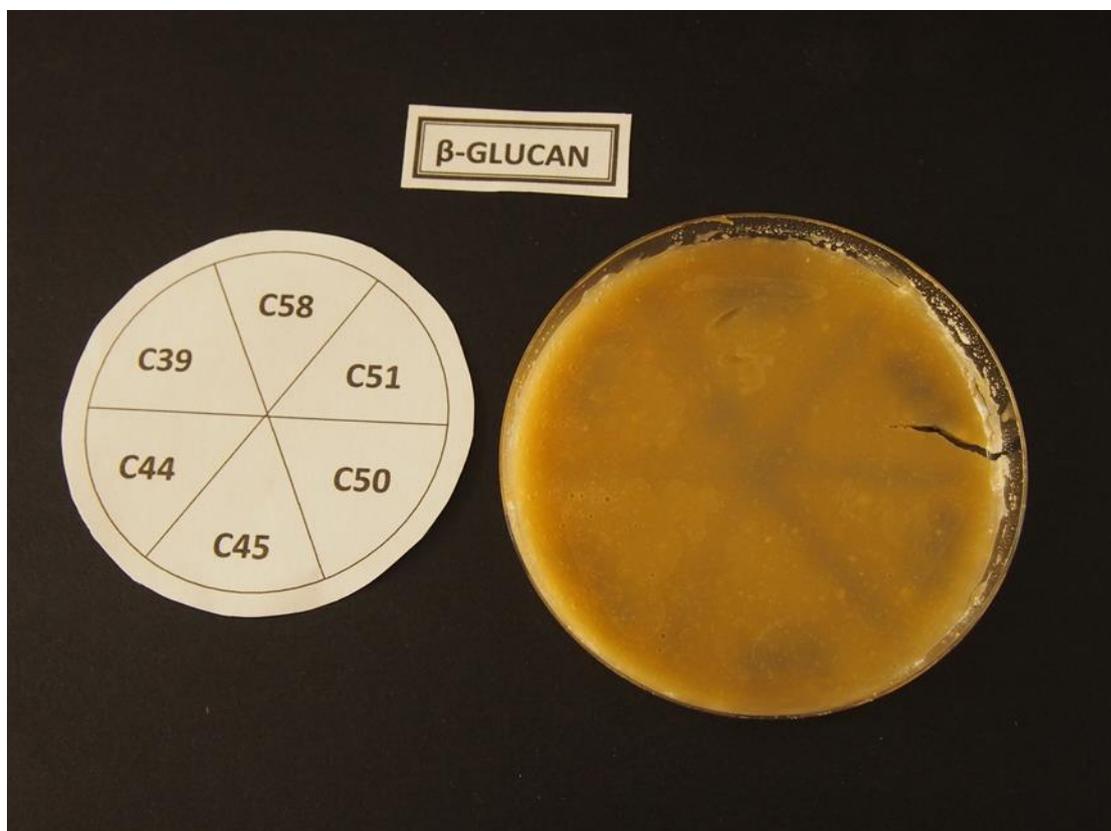
Α.2 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΤΩΝ ΤΡΥΒΛΙΩΝ ΜΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ Β ΓΛΥΚΑΝΗ ΣΕ ΜΕΓΕΝΘΥΣΗ



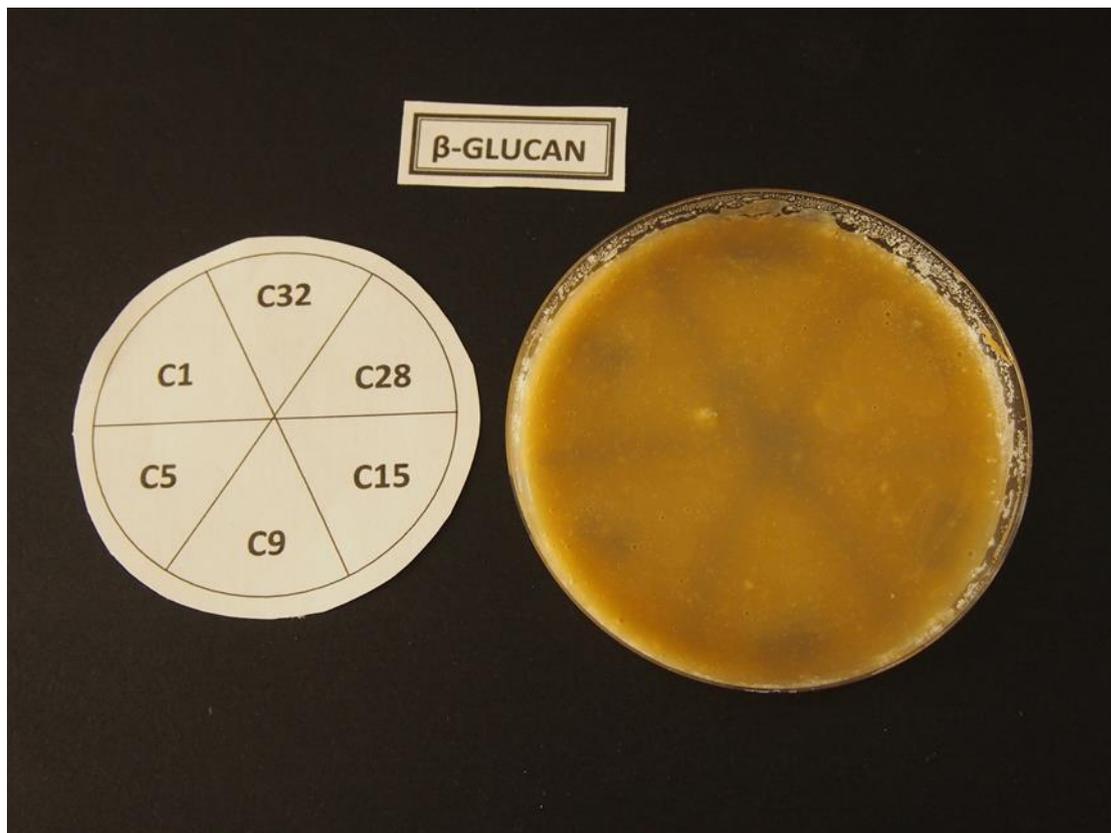
Εικόνα 9: Ανάπτυξη Λακτοβακίλλων: GG C59 C68 C70 C72 C74 σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα τη β-γλυκάνη,



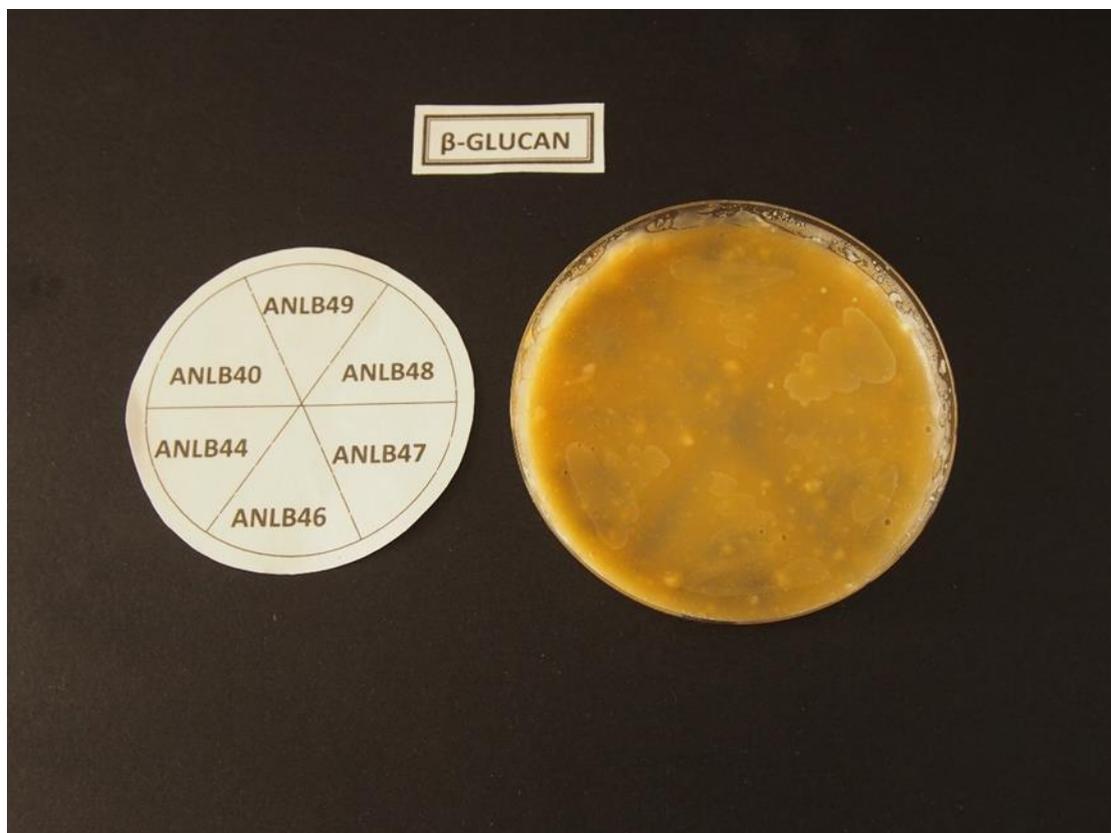
Εικόνα 10: Ανάπτυξη Λακτοβακίλλων : ANLB52 DSM20079 ANLB51 σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα τη β-γλυκάνη,



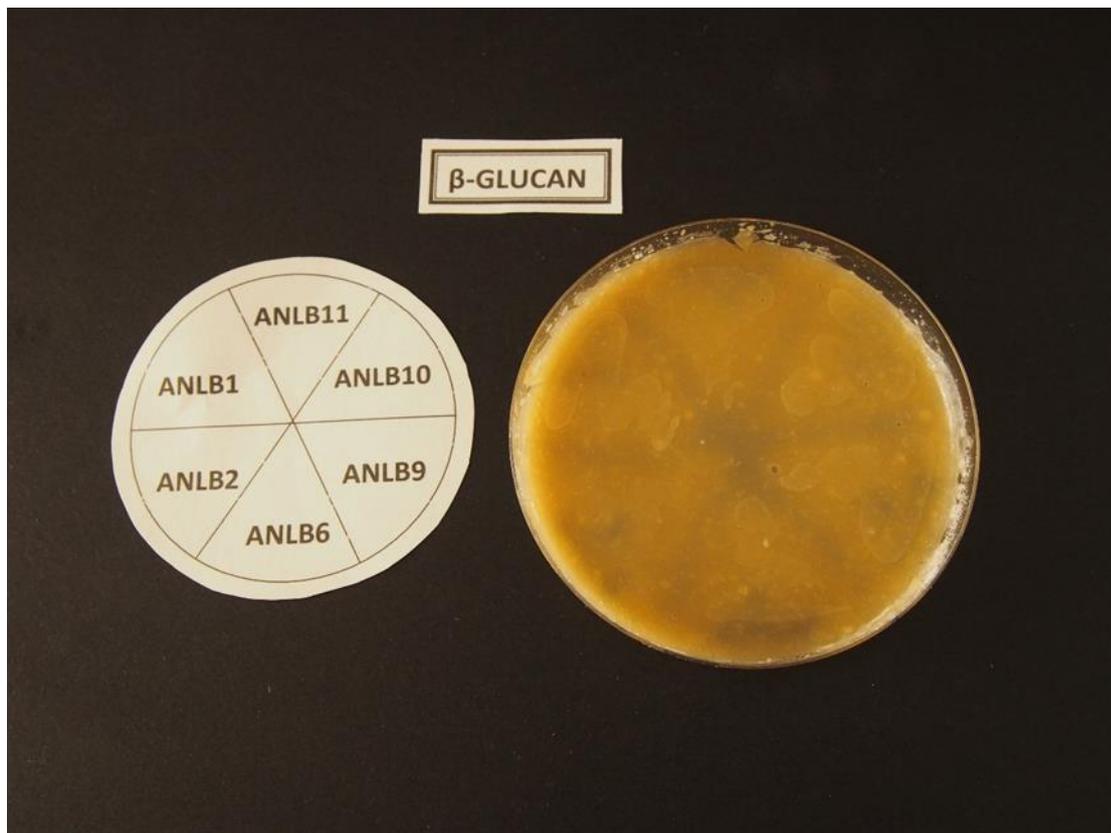
Εικόνα 11: Ανάπτυξη Λακτοβακίλλων: C58 C51 C50 C45 C44 C39 σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα τη β-γλυκάνη



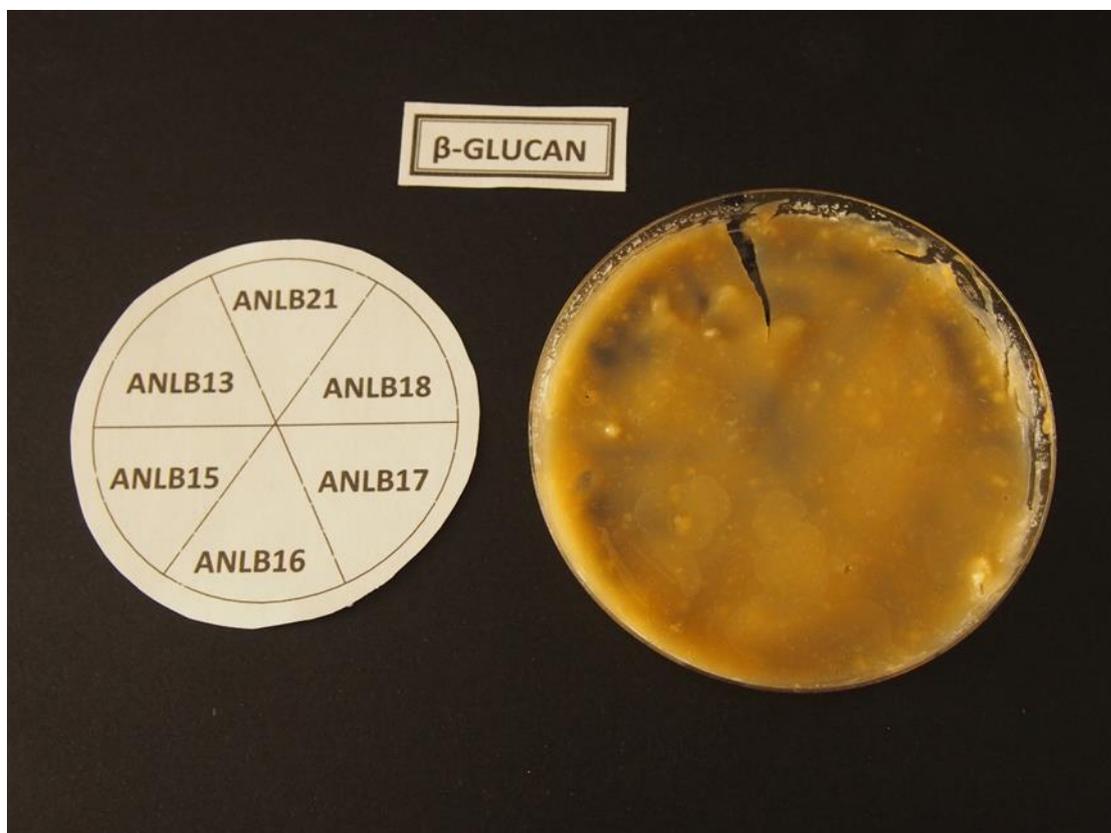
Εικόνα 12: Ανάπτυξη Λακτοβακίλλων: C1 C5 C9 C15 C28 C32 σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα τη β-γλυκάνη



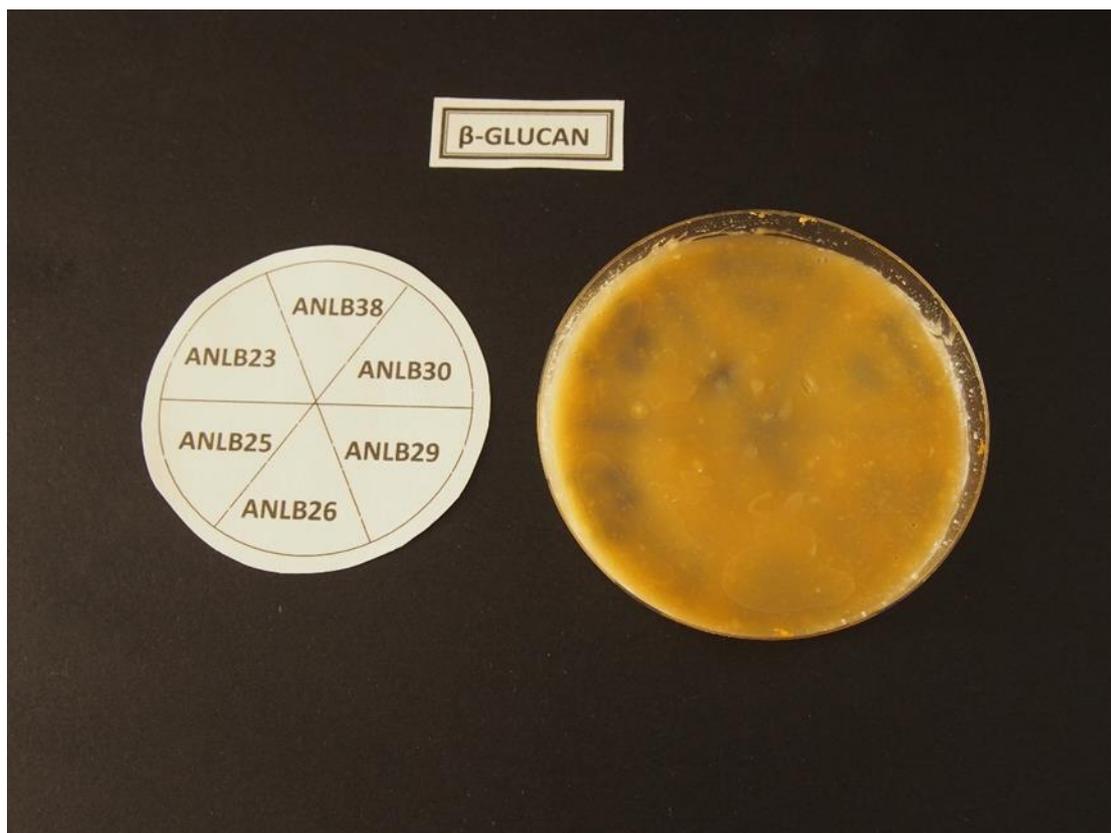
Εικόνα 13: Ανάπτυξη Λακτοβακίλλων : ANLB40 ANLB44 ANLB46 ANLB47 ANLB48 ANLB49 σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα τη β-γλυκάνη



Εικόνα 14: Ανάπτυξη Λακτοβακίλλων: ANLB1 ANLB2 ANLB6 ANLB9 ANLB10 ANLB11 σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα τη β-γλυκάνη



Εικόνα 15: Ανάπτυξη Λακτοβακίλλων : ANLB13 ANLB15 ANLB16 ANLB17 ANLB18 ANLB21 σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα τη β-γλυκάνη

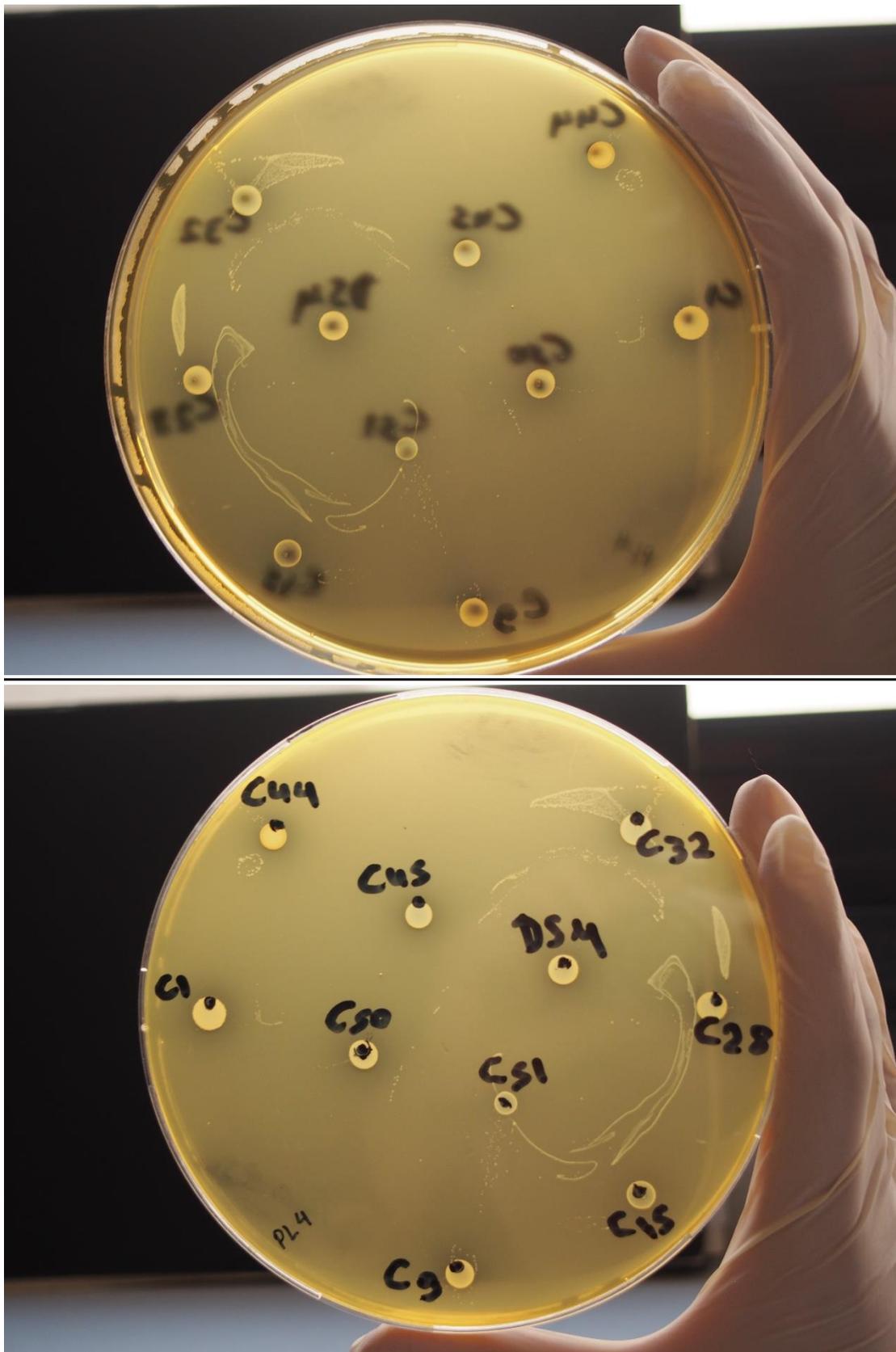


Εικόνα 16: Ανάπτυξη Λακτοθακίλλων: ANLB23 ANLB25 ANLB26 ANLB29 ANLB30 ANLB38 σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα τη β-γλυκάνη

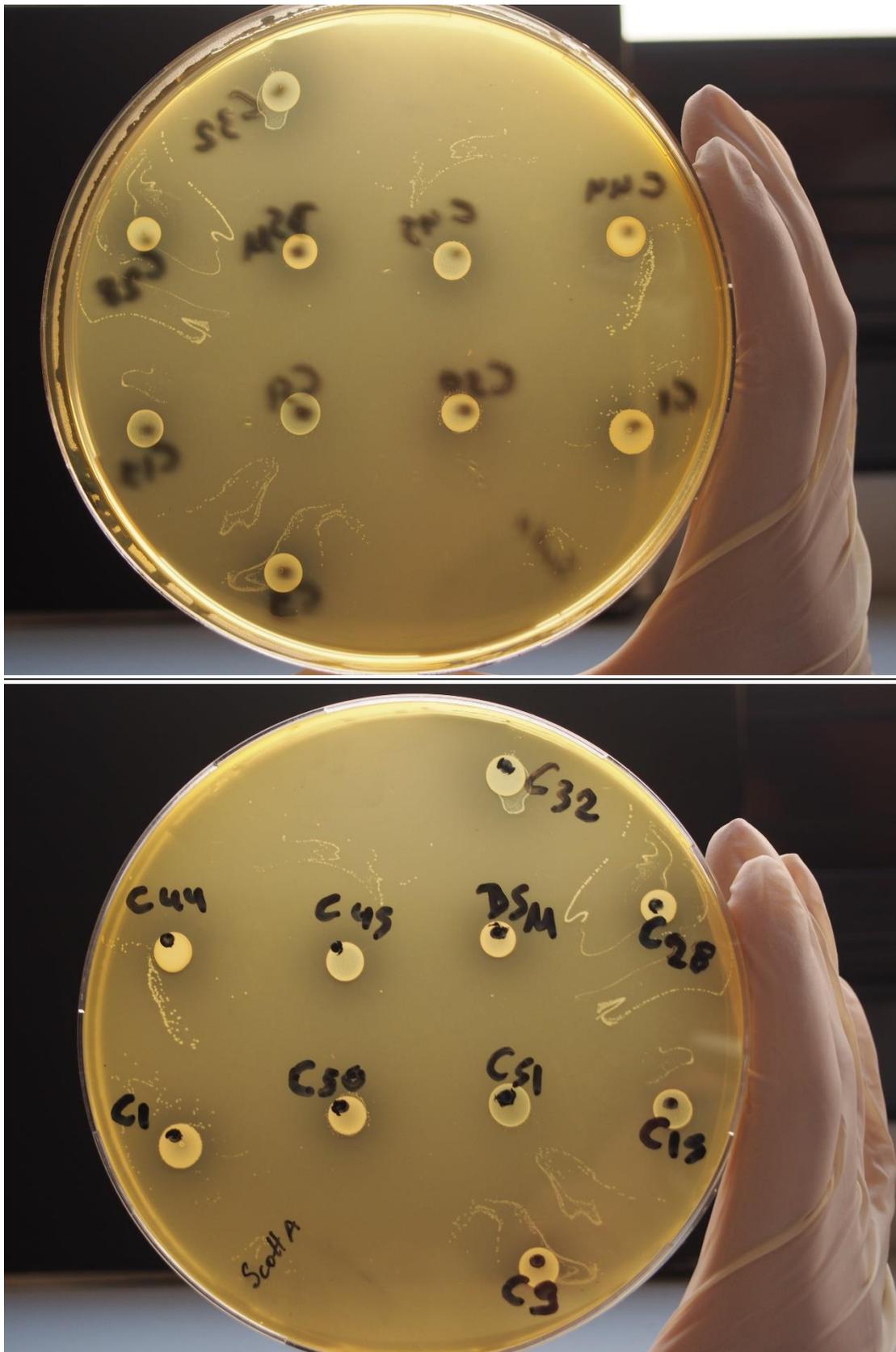
Β.ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΛΙΣΤΕΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Β.1. Πρώτη μέθοδος ελέγχου αντιλισταεριακής δράσης-Εμβολιασμός σε τρυβλία με τη μέθοδο SPOT INOCULATION: Φωτογραφίες τρυβλίων-Παρατήρηση

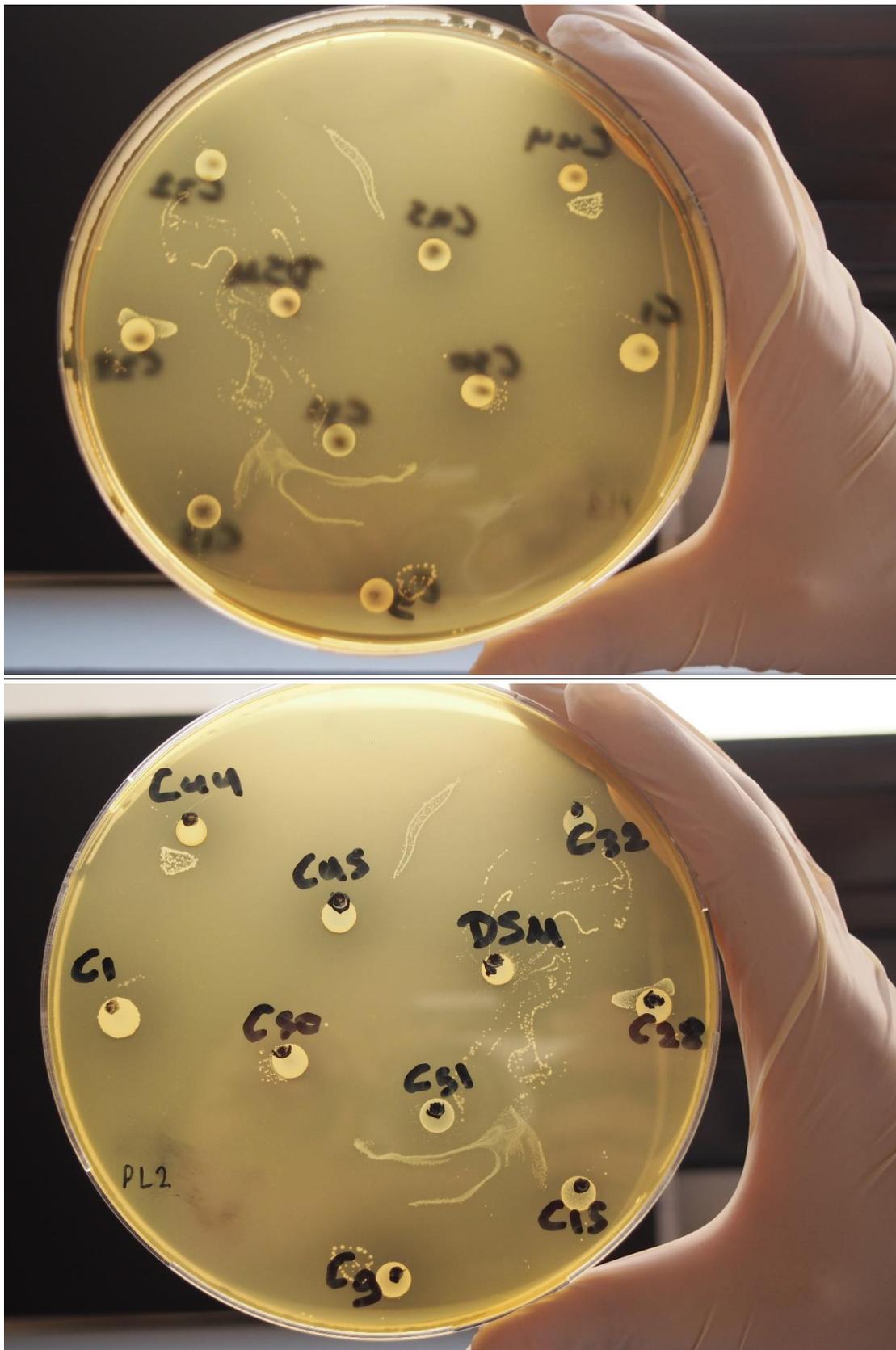
Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν μπρος και πίσω για το ίδιο τρυβλίο μετά από 24ωρη επώασή τους, στους 37°C στον αναερόβιο θάλαμο του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου.



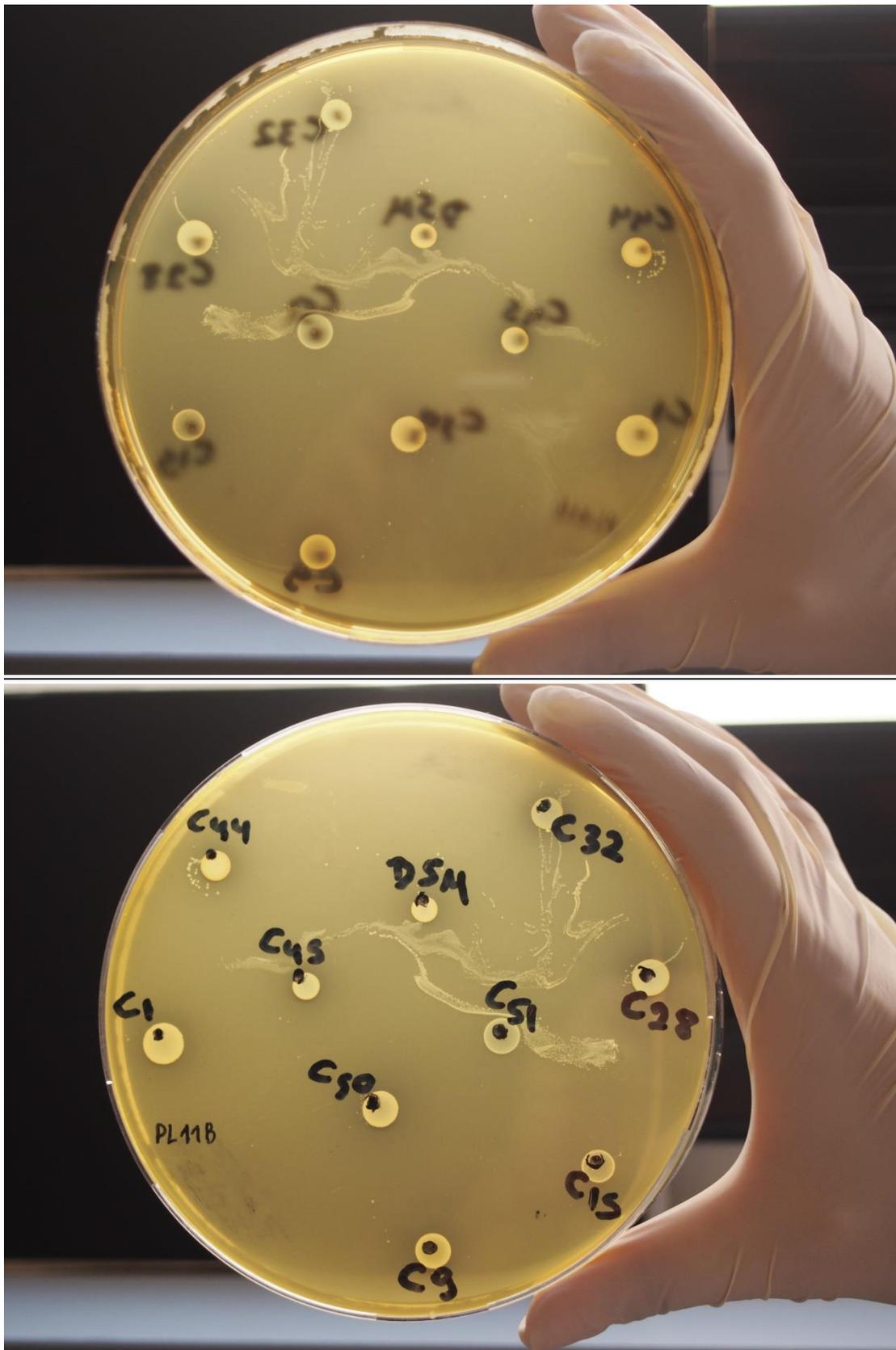
Εικόνα 17: Ανίχνευση πιθανής αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων C1 C9 C15 C28 C32 C44 C45 C50 C51 DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL4 με την μέθοδο "spot inoculation".



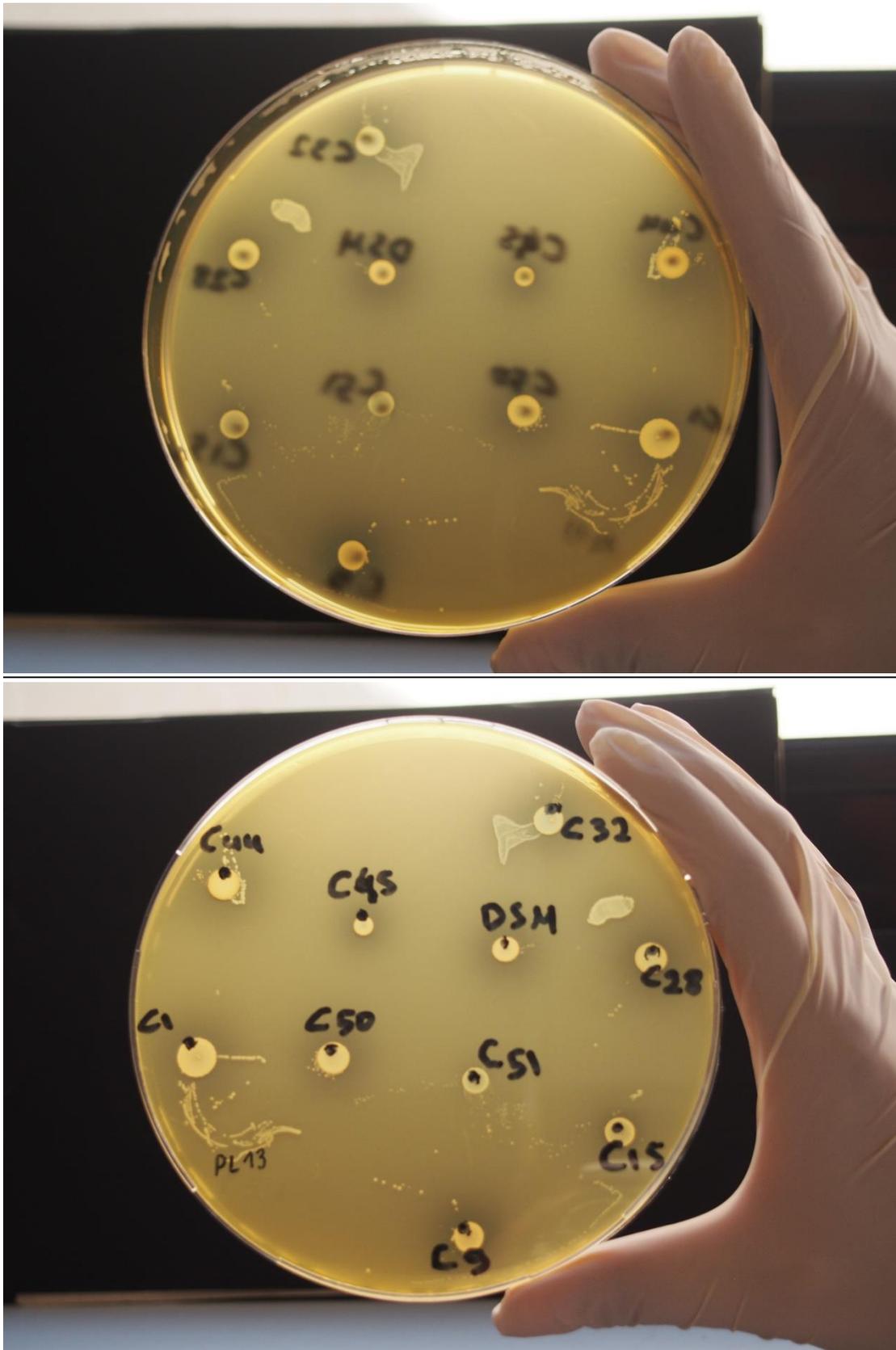
Εικόνα 18: Ανίχνευση πιθανής αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων C1 C9 C15 C28 C32 C44 C45 C50 C51 DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* Scott A με την μέθοδο "spot inoculation".



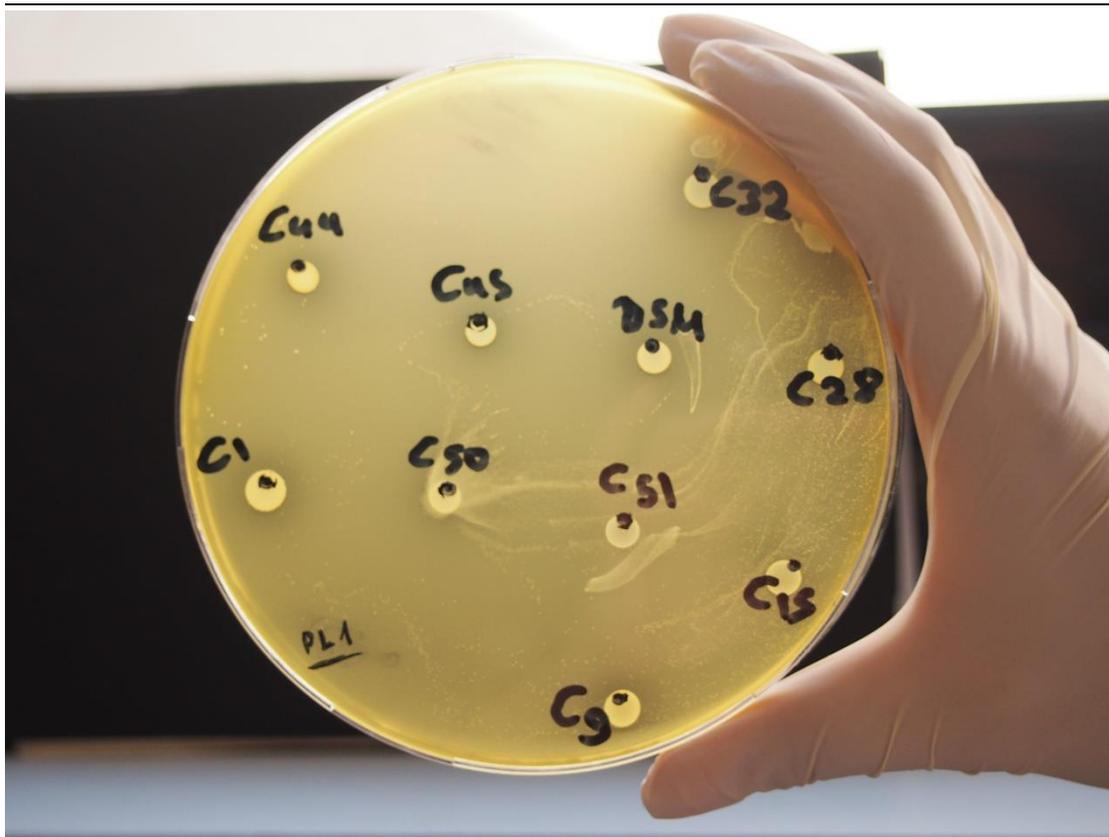
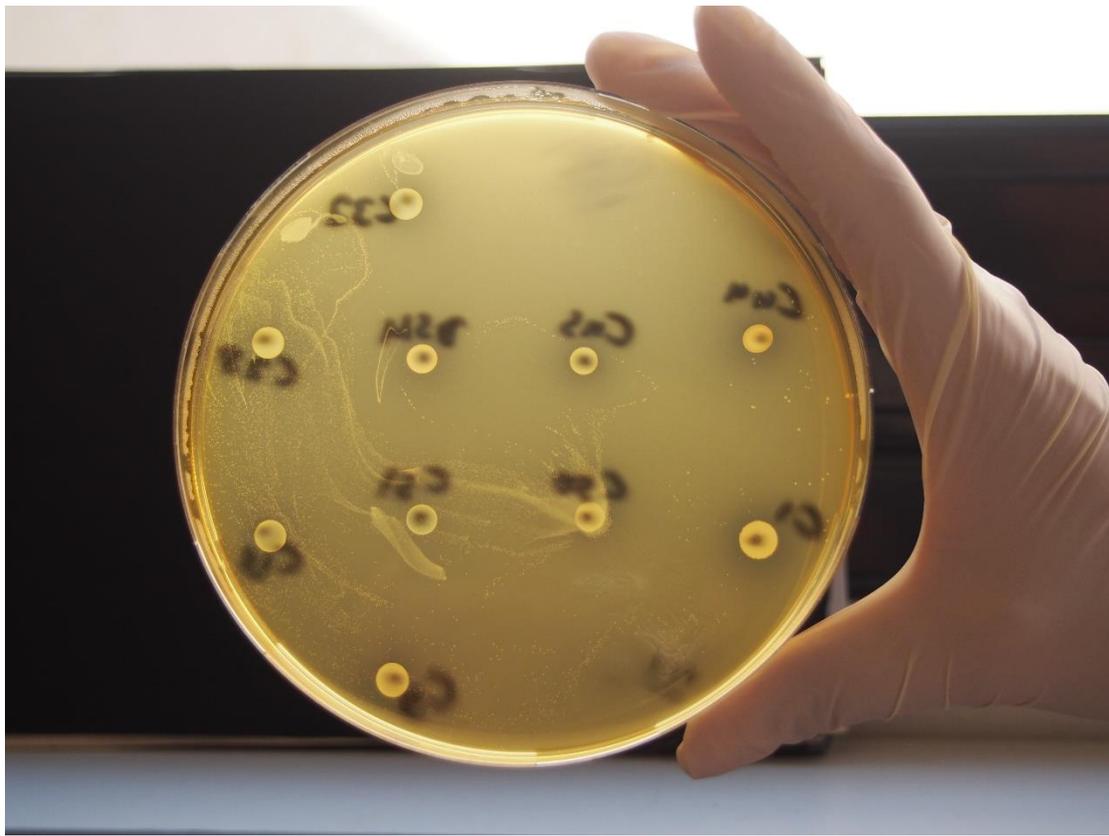
Εικόνα 19: Ανίχνευση πιθανής αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων C1 C9 C15 C28 C32 C44 C45 C50 C51 DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL2 με την μέθοδο "spot inoculation".



Εικόνα 20: Ανίχνευση πιθανής αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων C1 C9 C15 C28 C32 C44 C45 C50 C51 DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL11B με την μέθοδο "spot inoculation".



Εικόνα 21: Ανίχνευση πιθανής αντιλειτουργικής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων C1 C9 C15 C28 C32 C44 C45 C50 C51 DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL13 με την μέθοδο "spot inoculation".



Εικόνα 22: Ανίχνευση πιθανής αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων C1 C9 C15 C28 C32 C44 C45 C50 C51 DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL1 με την μέθοδο "spot inoculation".

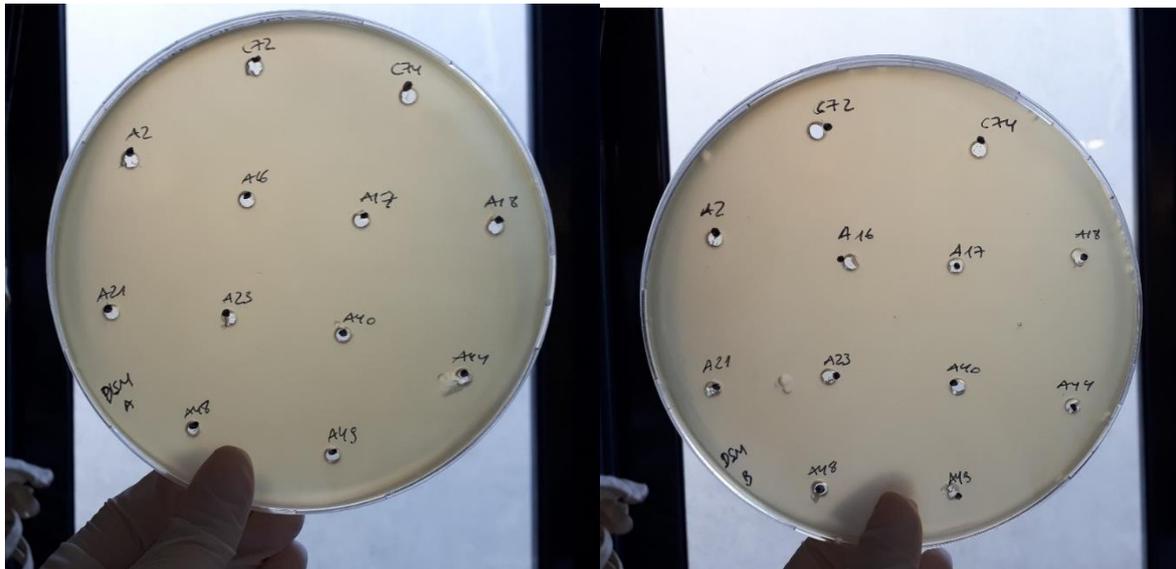
Δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός ξεκάθαρων διαυγών ζωνών γύρω από κανένα εμβολιασμένο σημείο.

**B.2. Δεύτερη μέθοδος ελέγχου αντιλειτουργικής δράσης-Διάχυση σε άγαρ (agar well diffusion assay):
Φωτογραφίες τρυβλίων-Παρατήρηση**

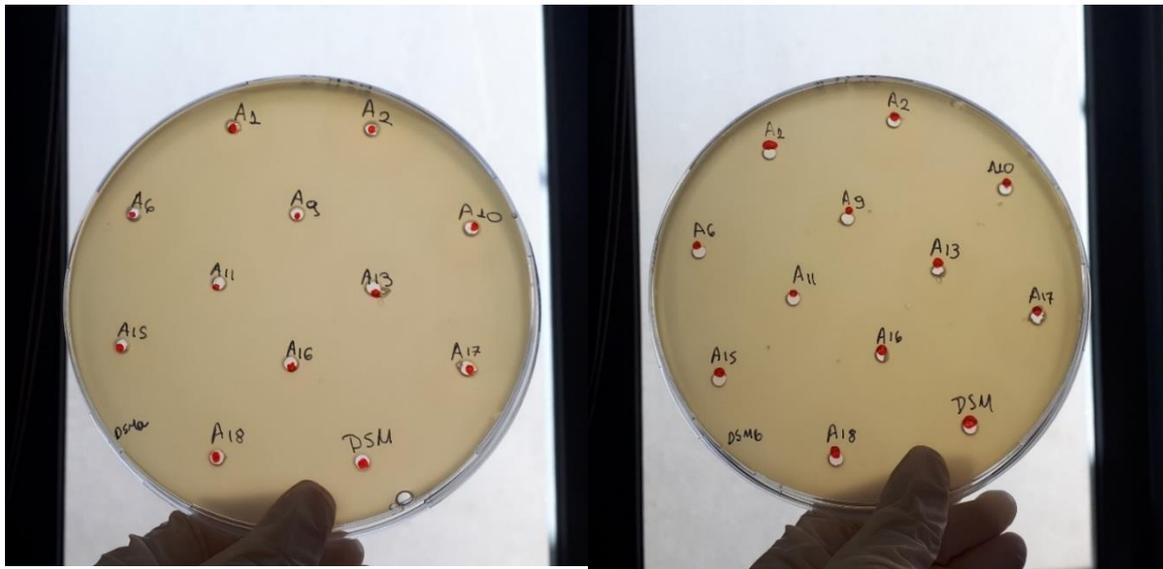


Εικόνα 23: Φωτογραφία τρυβλίου πριν τον σχηματισμό πηγαδιών με τη χρήση φελλοτρυπητήρα και πριν τη διάχυση της βακτηρισύνης.

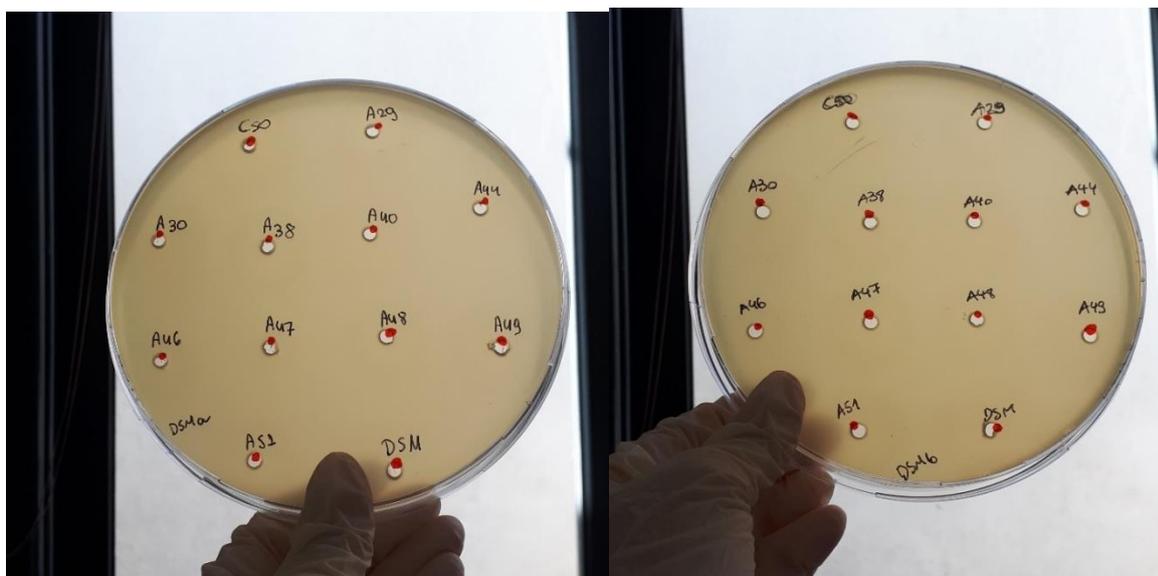
Οι ακόλουθες φωτογραφίες τραβήχτηκαν μετά από 24ωρη επώασή των τρυβλίων, στους 37°C στον αναερόβιο θάλαμο του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου, αφού προηγήθηκε ο σχηματισμός πηγαδιών με τη χρήση φελλοτρυπητήρα. Για κάθε τρυβλίο (με 1 στέλεχος λιστέρια και 12 στελέχη λακτοβακίλλων), πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις (δοκιμή Α και δοκιμή Β) με σκοπό τον επανέλεγχο των αποτελεσμάτων και την αποφυγή σφάλματος λόγω πιθανούς μόλυνσης.



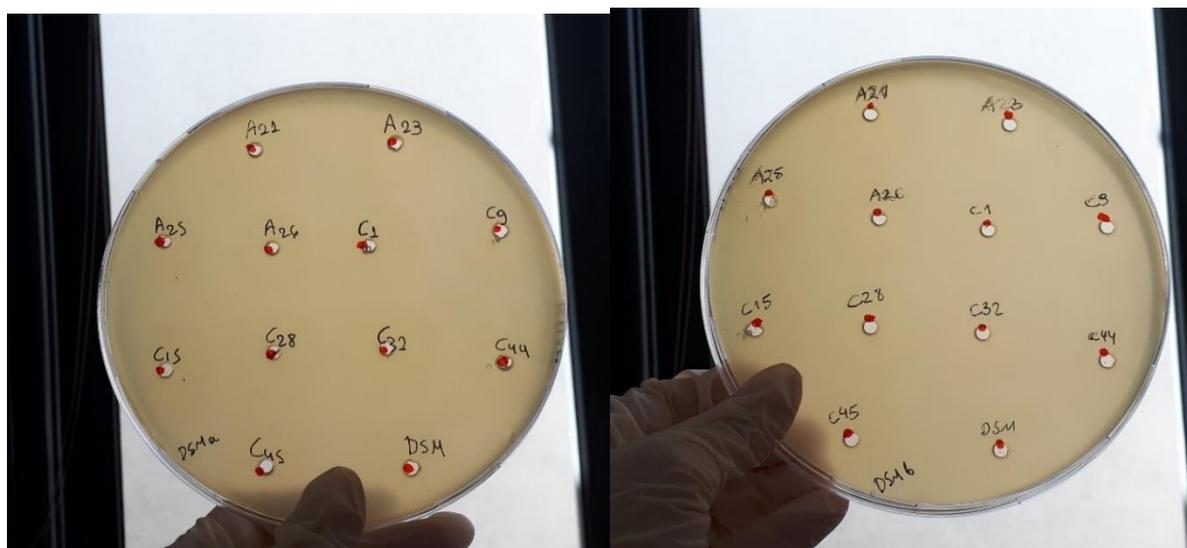
Εικόνα 24: Μελέτη της αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων C72 C74 A2 A16 A17 A18 A21 A23 A40 A44 A45 A48 έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* DSM 12464 (control) επαναλήψεις Α,Β.



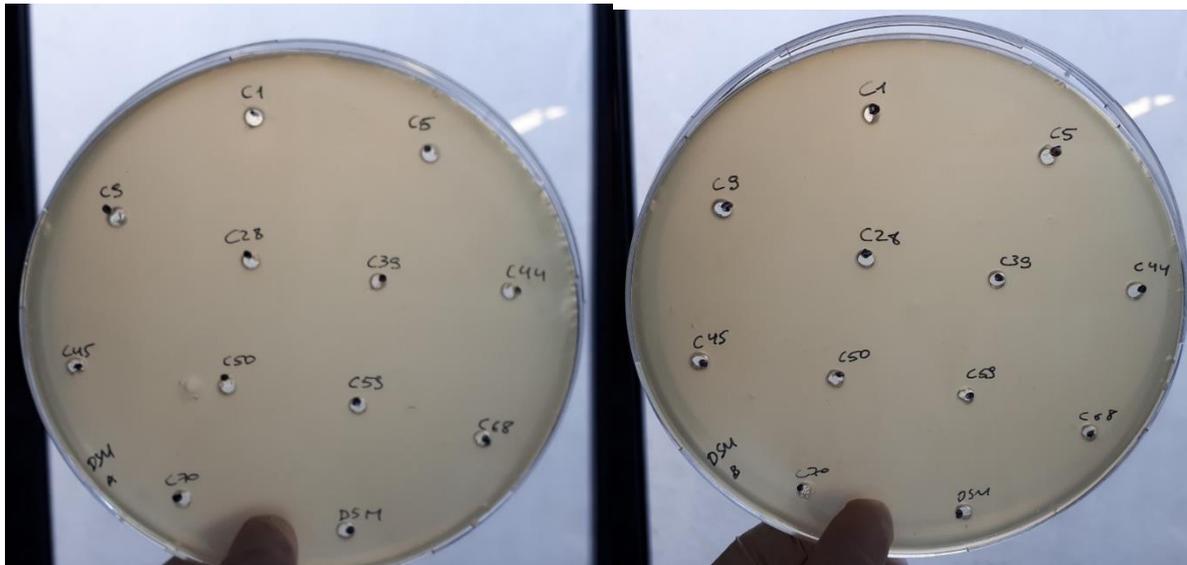
Εικόνα 25: Μελέτη της αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 DSM20079 έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* DSM 12464 (control) επαναλήψεις Α,Β.



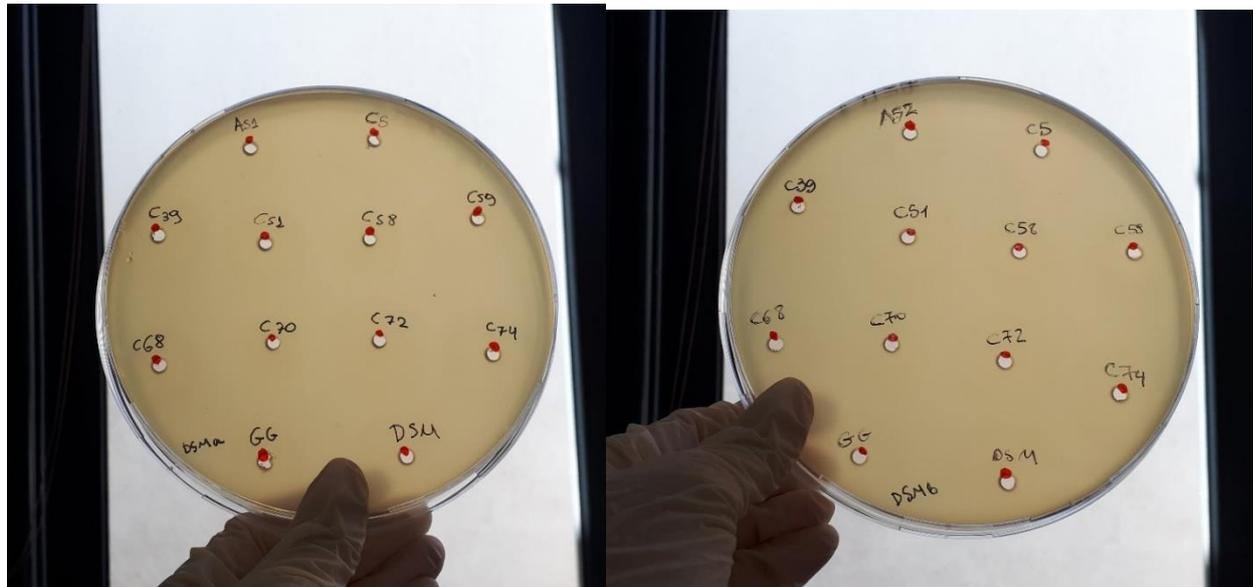
Εικόνα 26: Μελέτη της αντιλειτουργικής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων C50 A29 A30 A38 A40 A44 A46 A47 A48 A49 A51 DSM20079 έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* DSM 12464 (control) επαναλήψεις Α,Β.



Εικόνα 27: Μελέτη της αντιλειτουργικής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A21 A23 A25 A26 C1 C9 C15 C28 C32 C44 C45 DSM20079 έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* DSM 12464 (control) επαναλήψεις Α,Β.

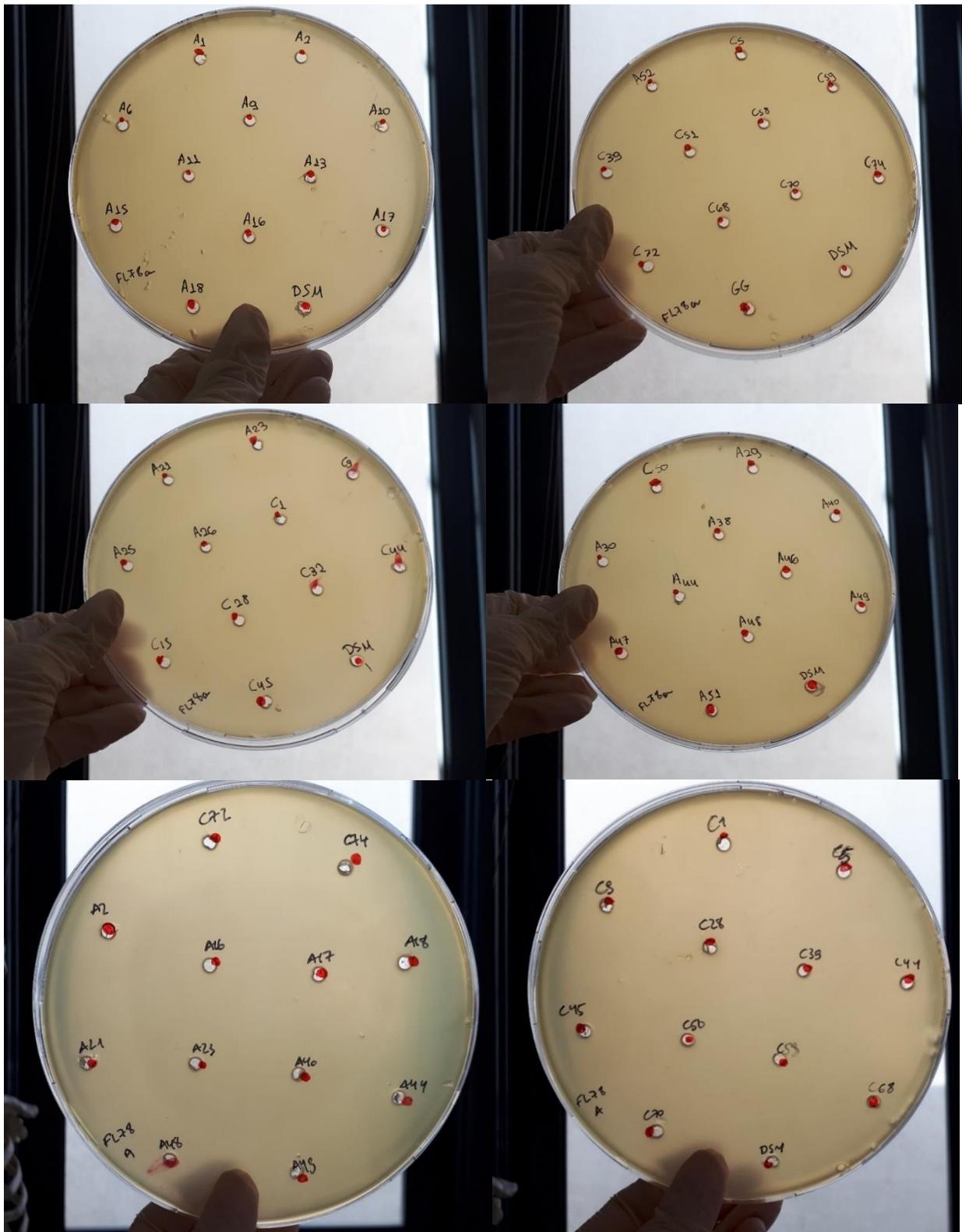


Εικόνα 28: Μελέτη της αντιλειτουργικής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων C1 C5 C15 C28 C39 C44 C45 C50 C59 C68 C70 DSM20079 έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* DSM 12464 (control) επαναλήψεις Α,Β.

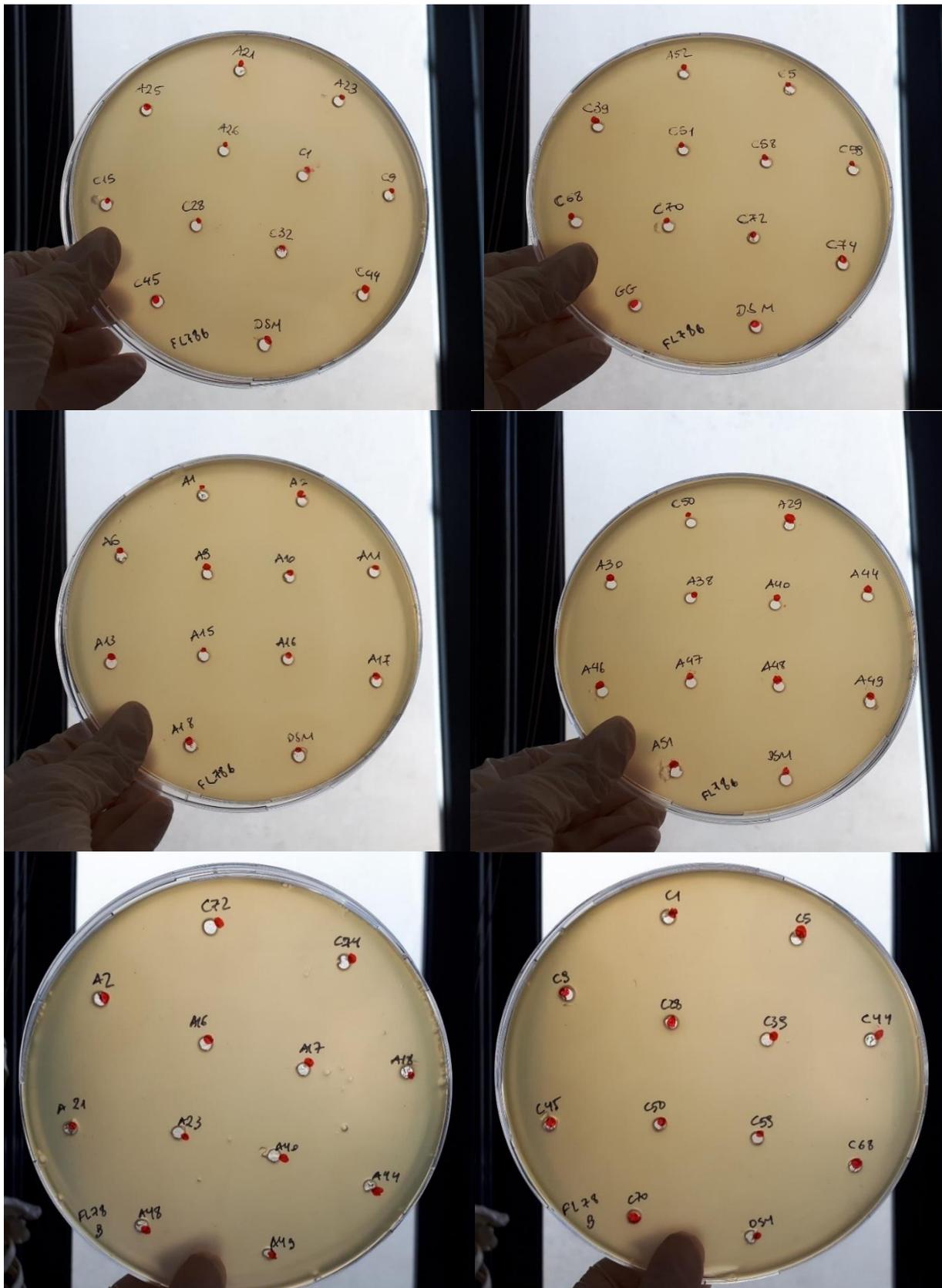


Εικόνα 29: Μελέτη της αντιλειτουργικής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A52 C5 C39 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079 έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* DSM 12464 (control) επαναλήψεις Α,Β.

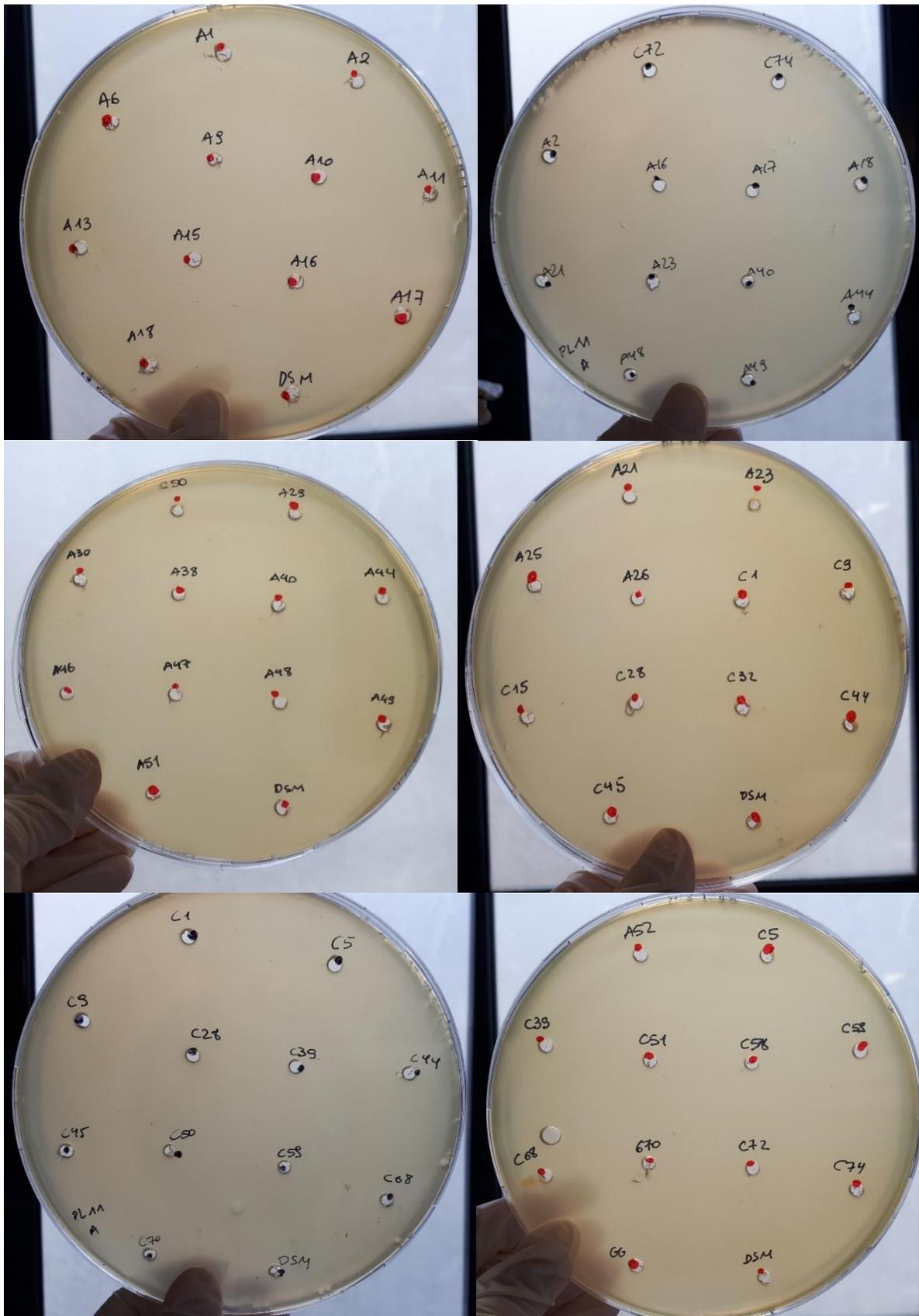
Οι εικόνες όλων των τρυβλίων είναι ίδιες για κάθε συνδυασμό στελέχους λιστέρια με λακτοβακίλλων. Συγκεκριμένα δεν σχηματίστηκε καμία διαυγή ζώνη γύρω από κανένα πηγαδάκι.



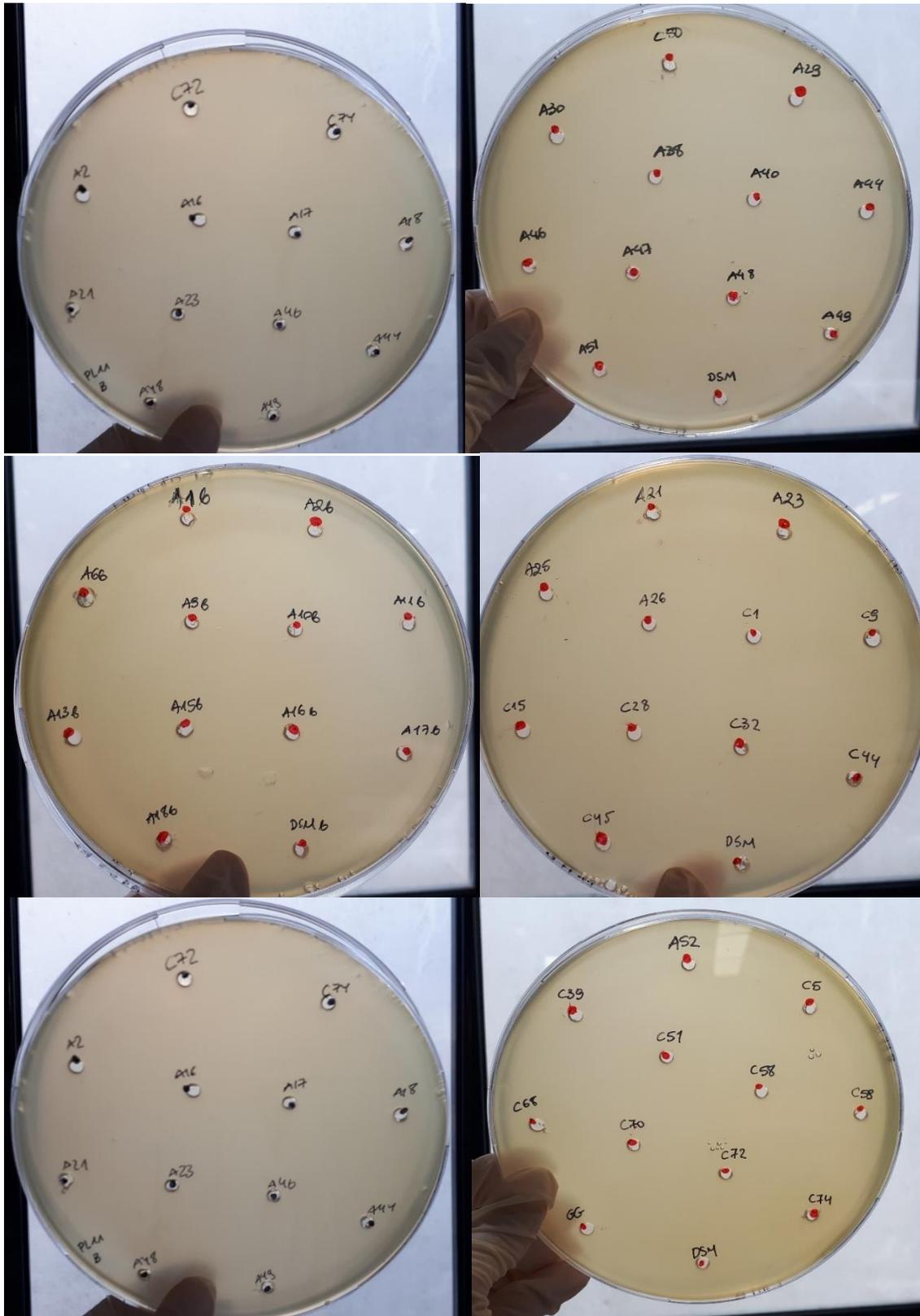
Εικόνα 30: Μελέτη της αντιλειτουργικής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* FL78, A επανάληψη.



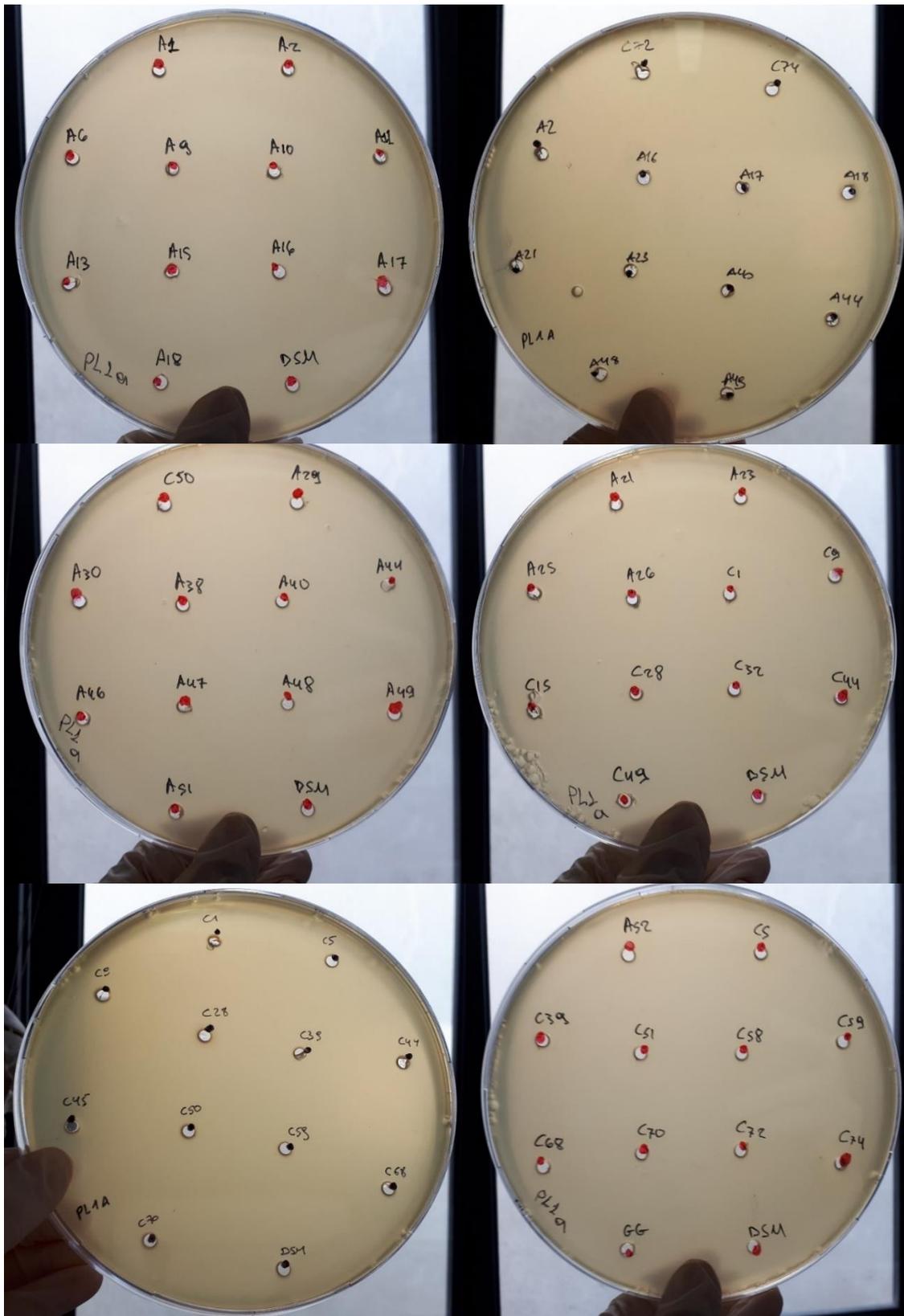
Εικόνα 31: Μελέτη της αντιλειτουργικής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* FL78, **B επανάληψη**.



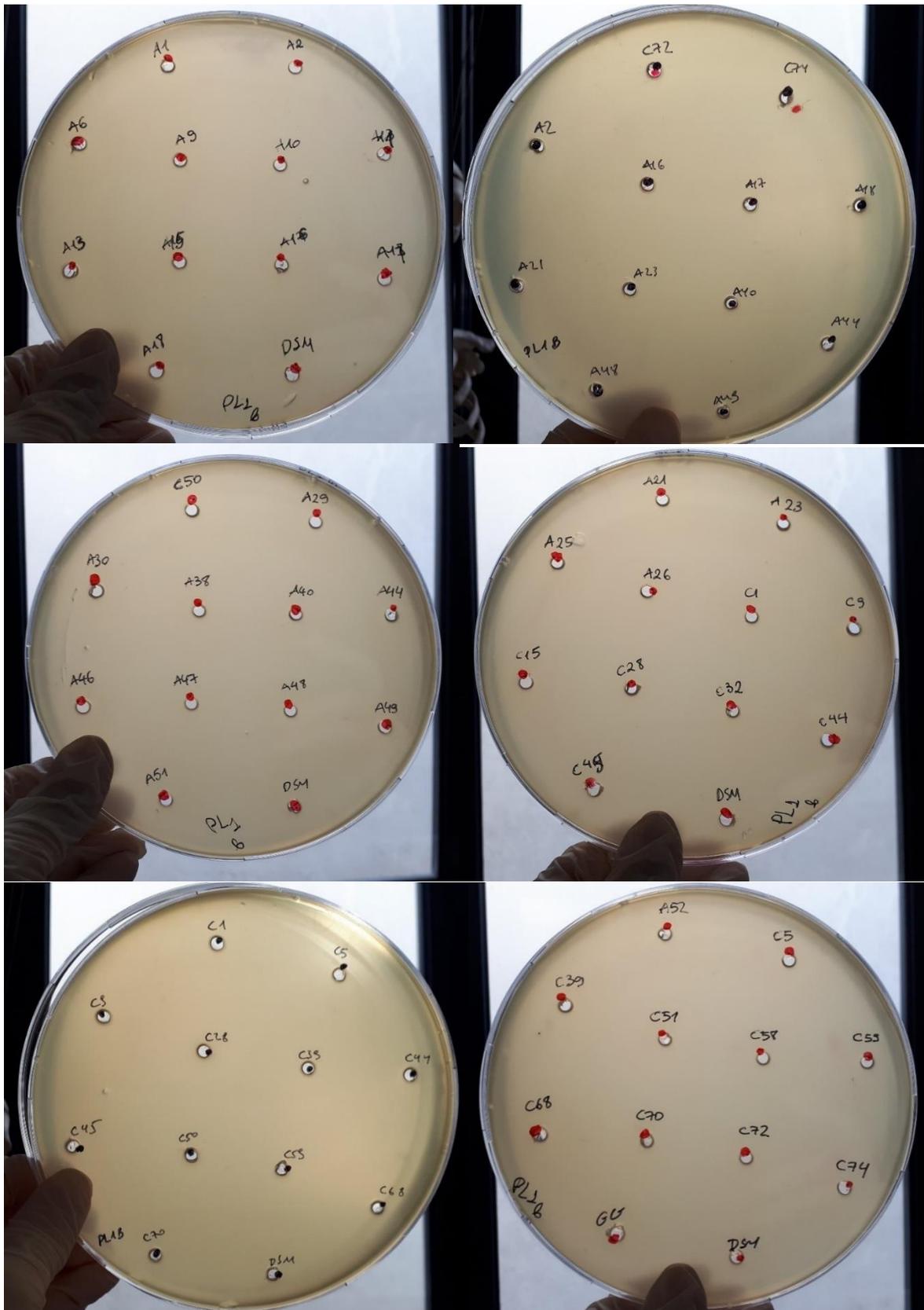
Εικόνα 32: Μελέτη της αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL11, A επανάληψη.



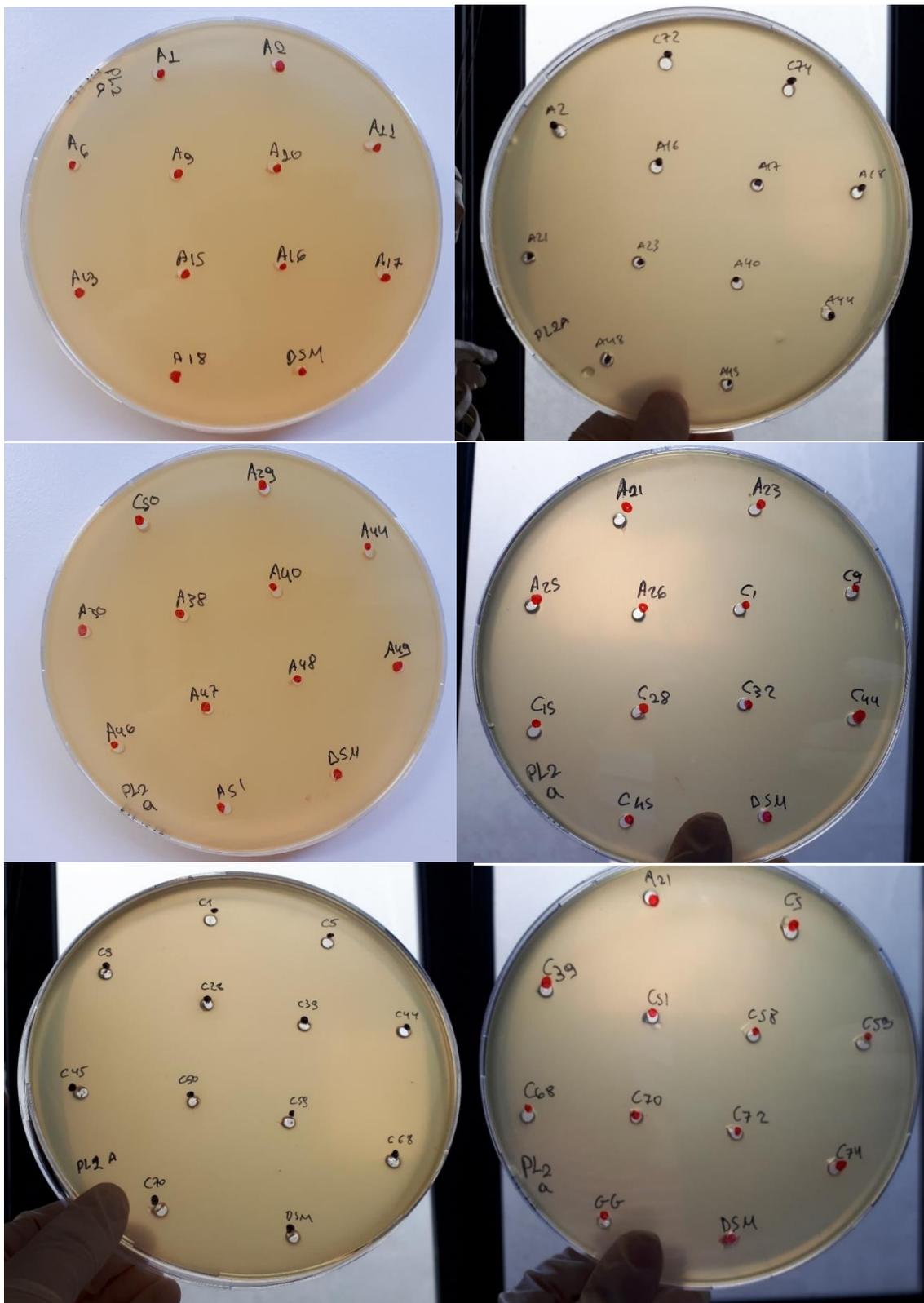
Εικόνα 33: Μελέτη της αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL11, **B επανάληψη.**



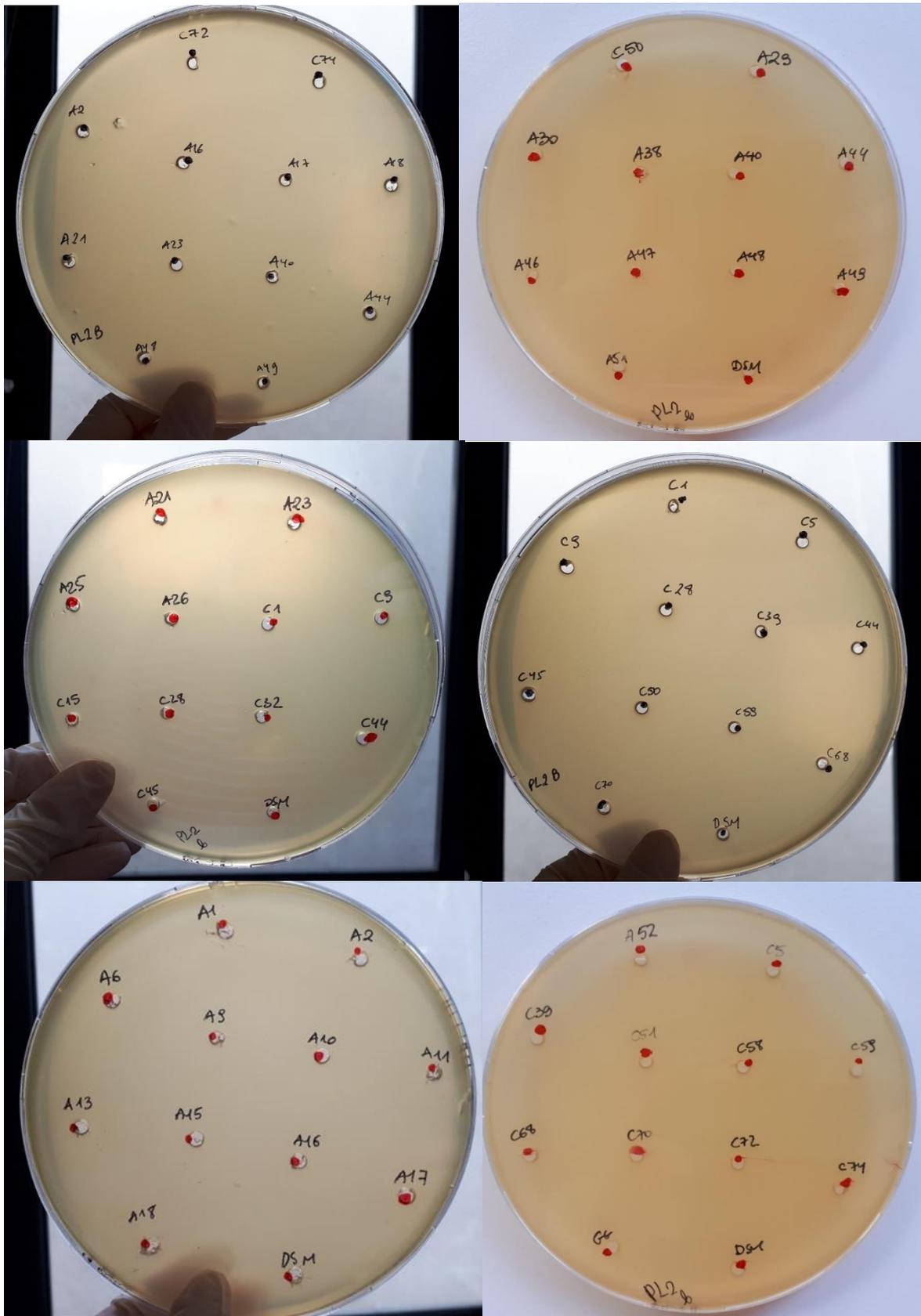
Εικόνα 34: Μελέτη της αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL1, A επανάληψη.



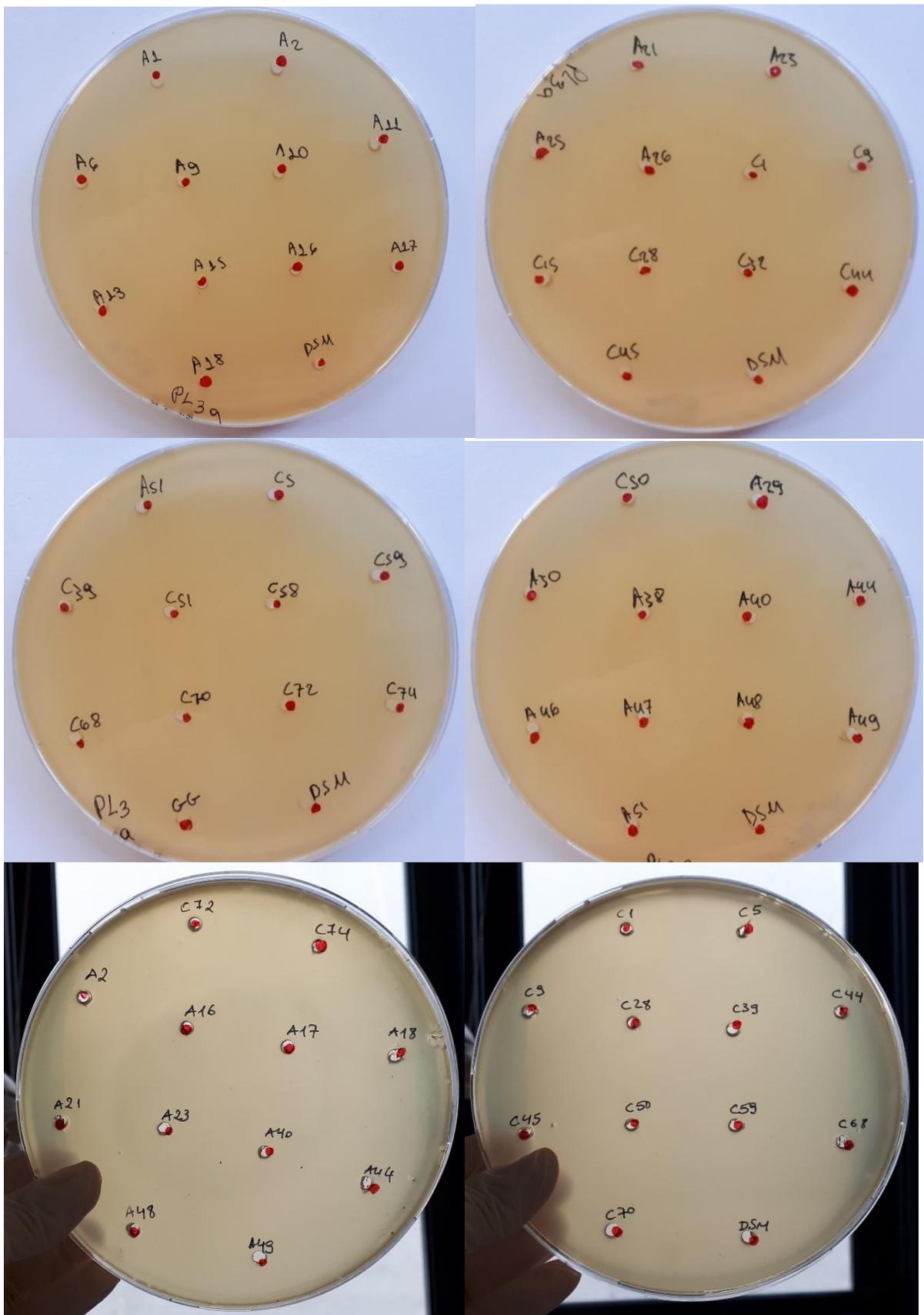
Εικόνα 35: Μελέτη της αντιλιστεριακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL1, **B επανάληψη**.



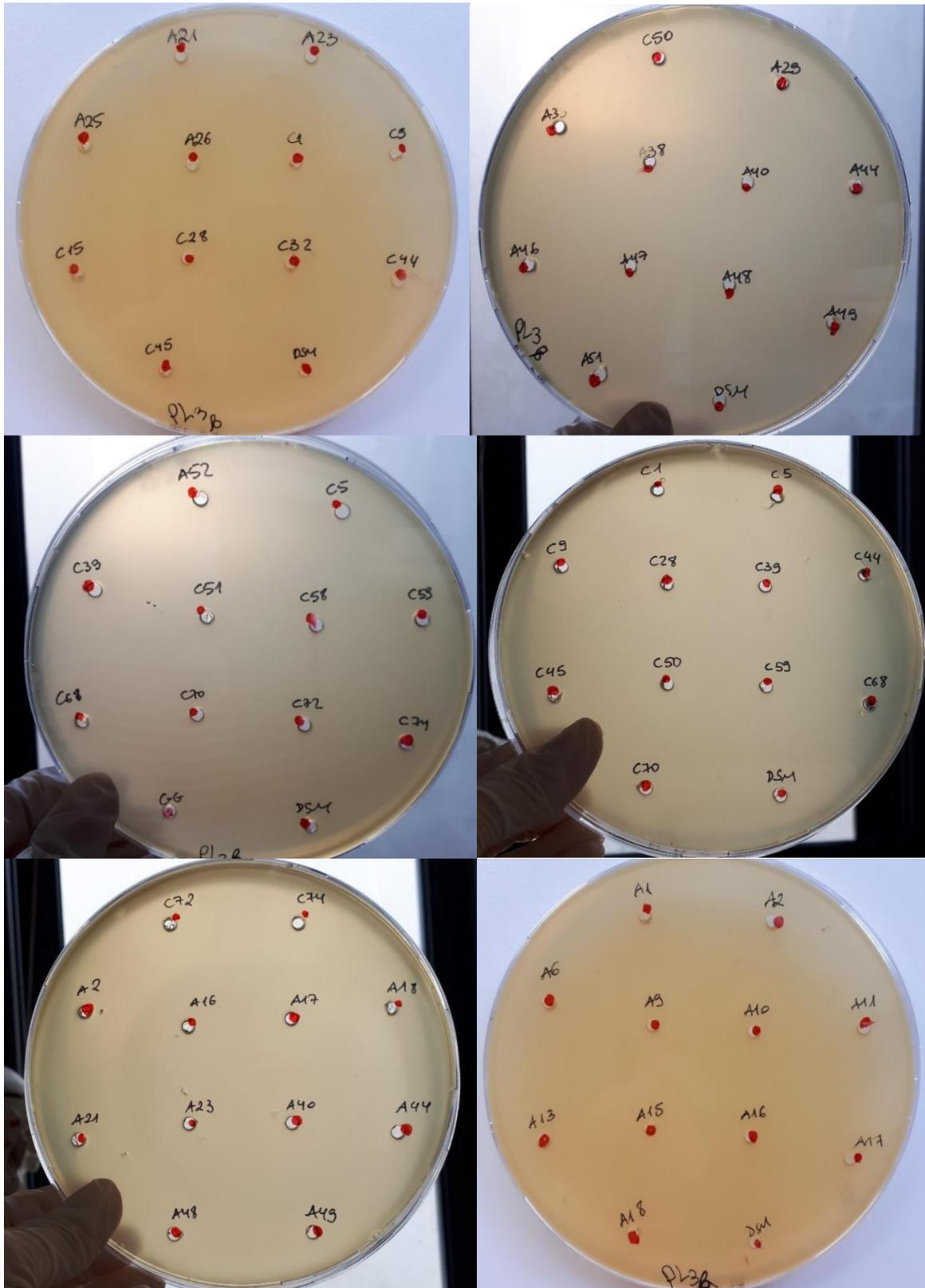
Εικόνα 36: Μελέτη της αντιλειτουργικής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL2, A επανάληψη.



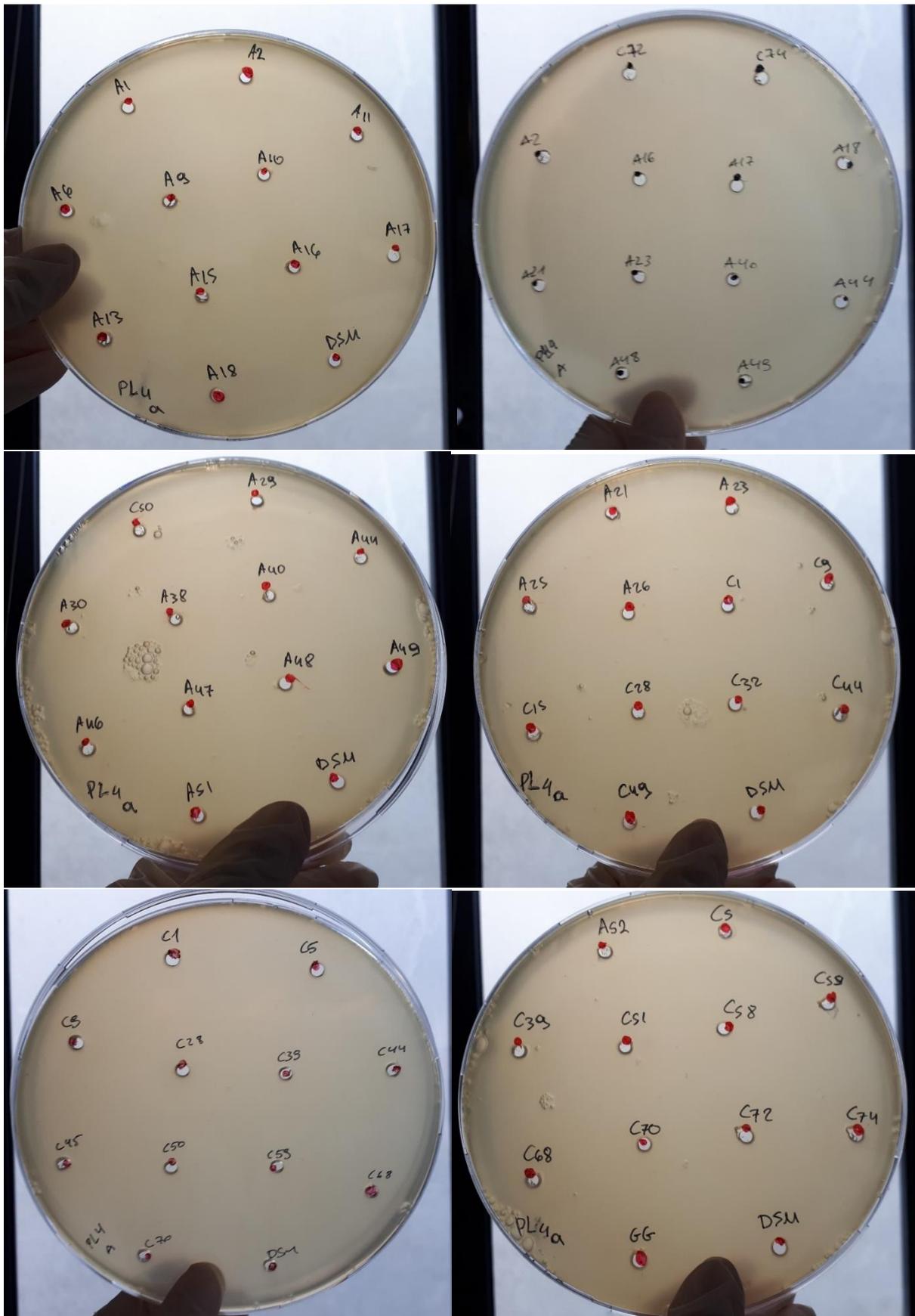
Εικόνα 37: Μελέτη της αντιλιστεριακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL2, B επανάληψη.



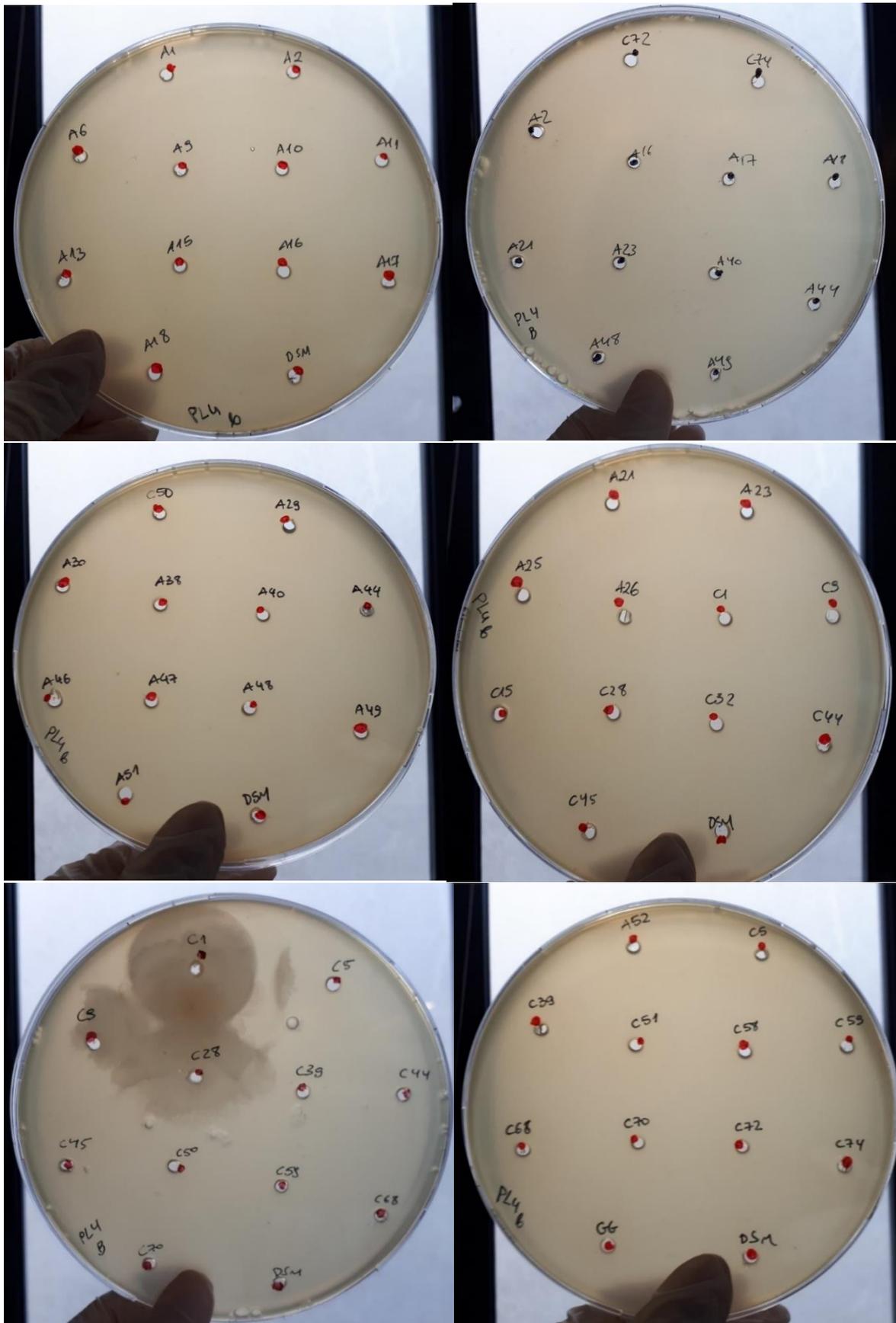
Εικόνα 38: Μελέτη της αντιλιστεριακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL3, A επανάληψη.



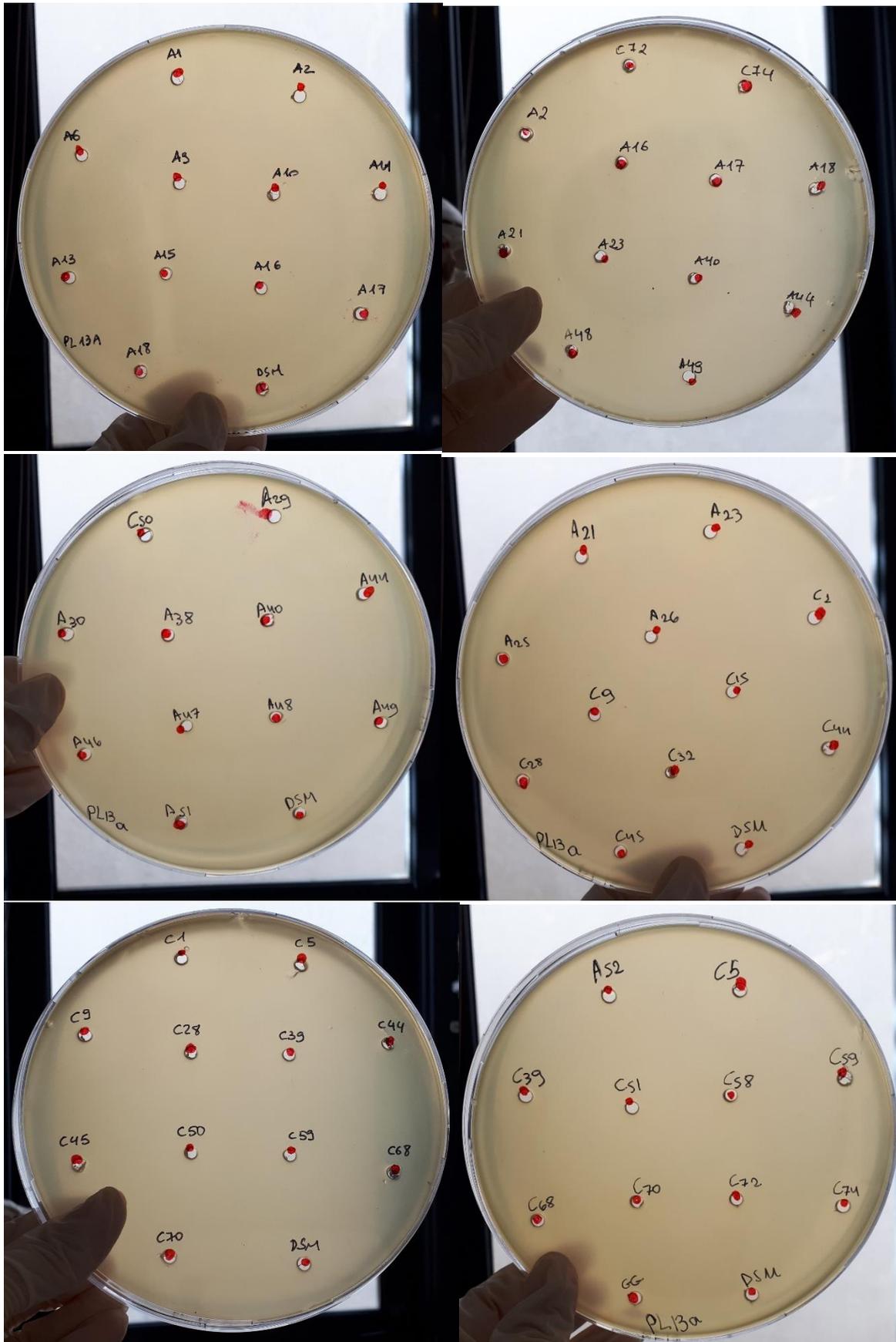
Εικόνα 39: Μελέτη της αντιλιστεριακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL3, **B επανάληψη**.



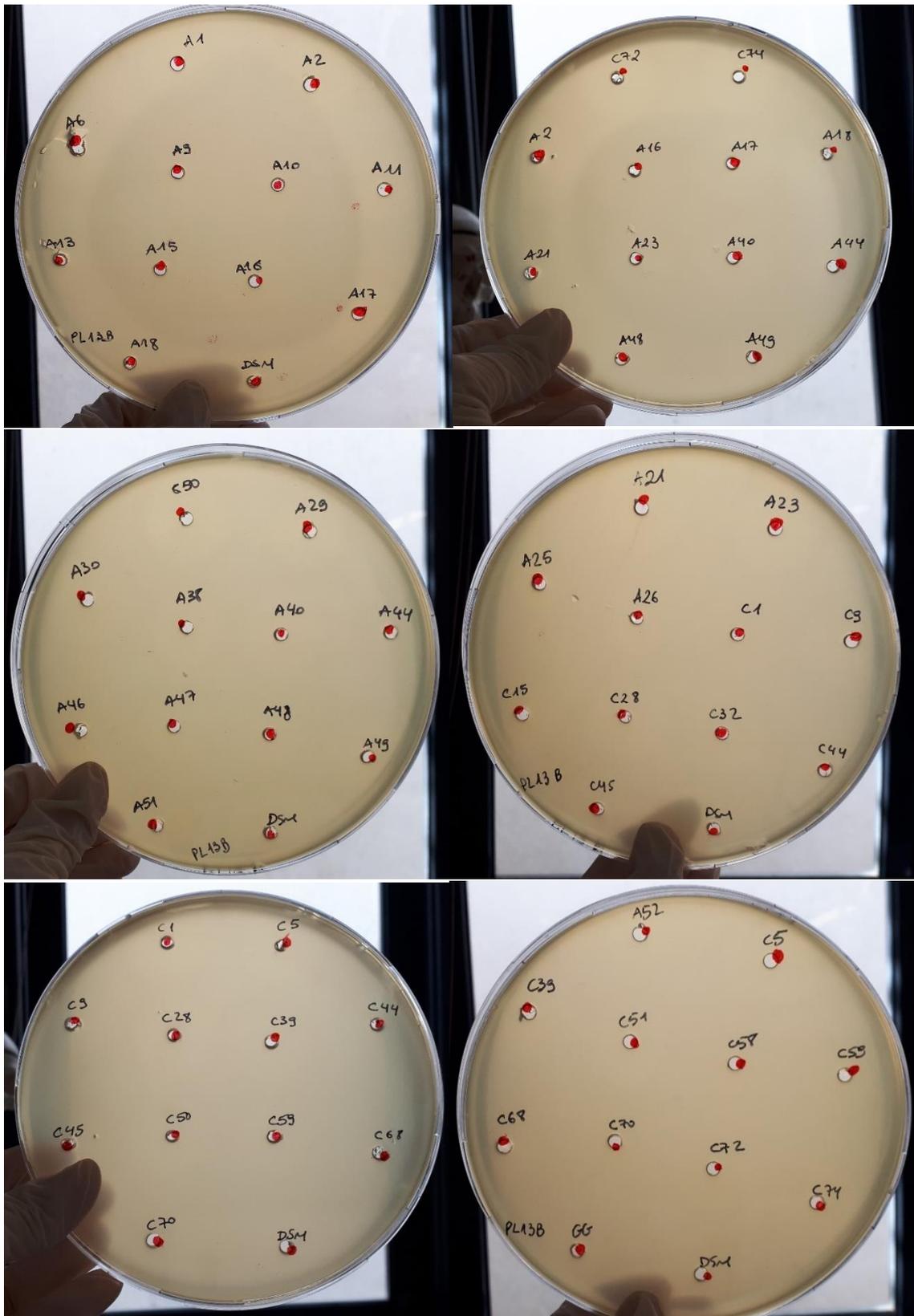
Εικόνα 40: Μελέτη της αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL4, **A επανάληψη.**



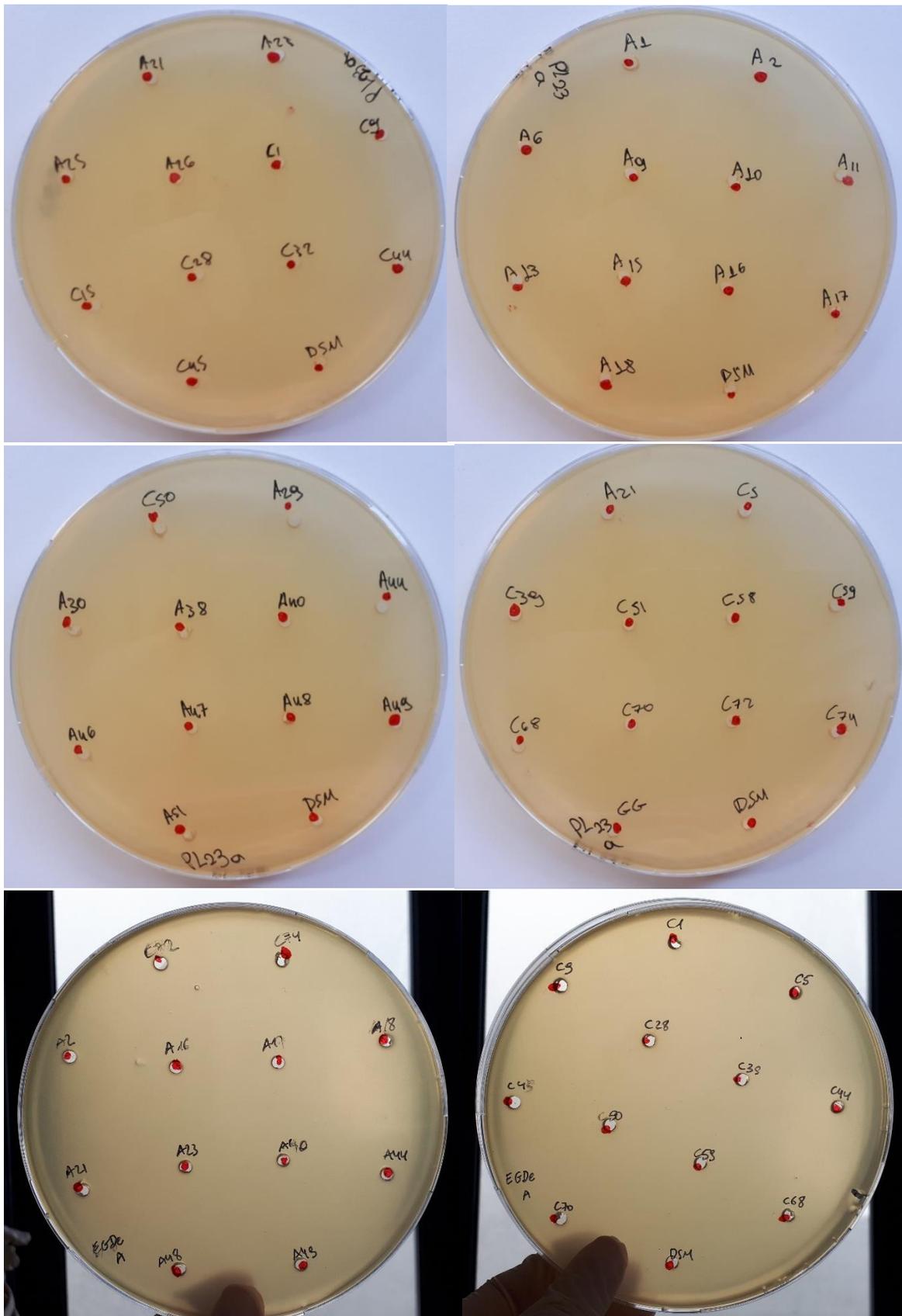
Εικόνα 41: Μελέτη της αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL4, Β επανάληψη.



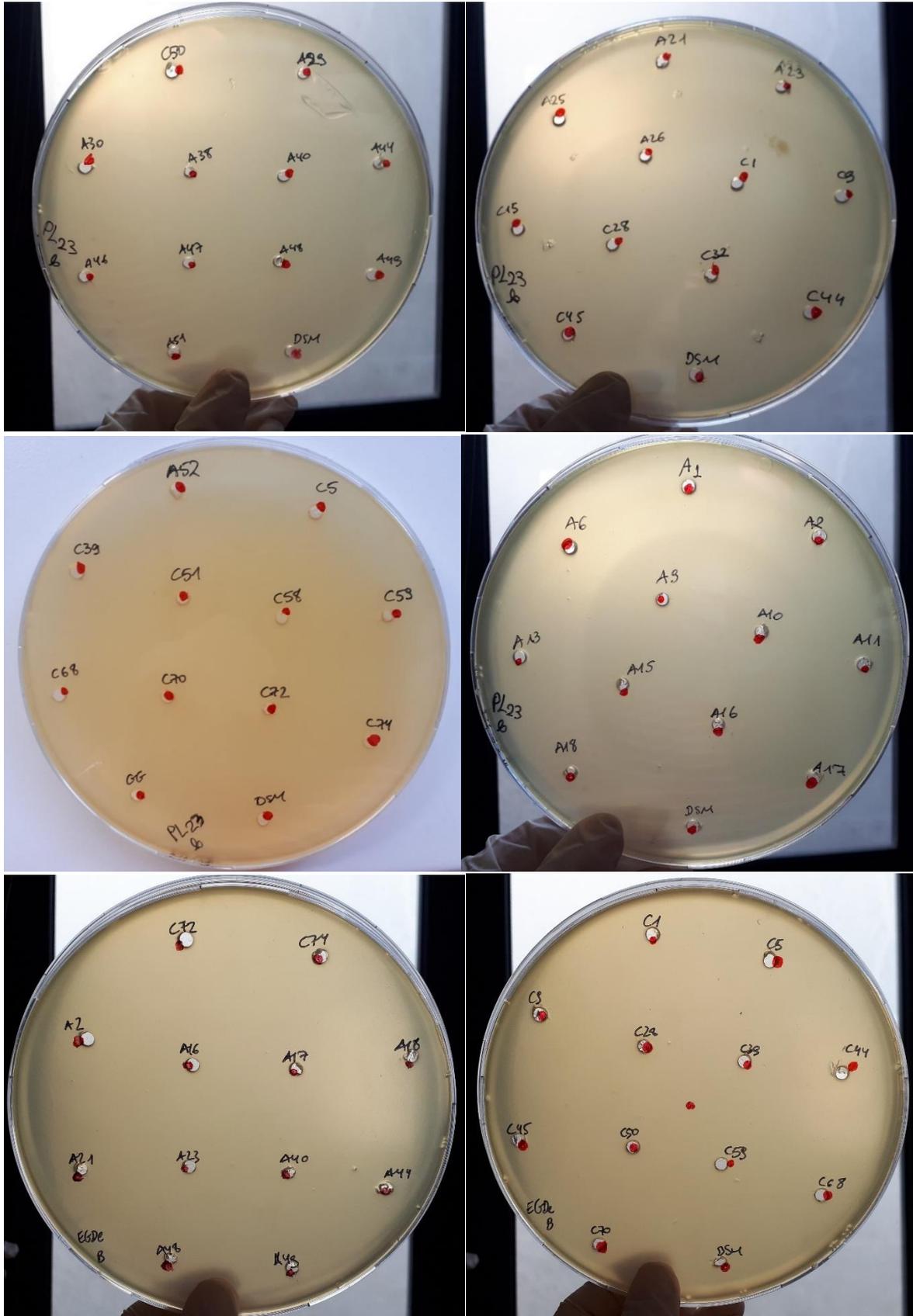
Εικόνα 42: Μελέτη της αντιλειτουργικής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL13, A επανάληψη.



Εικόνα 43: Μελέτη της αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL13, **B επανάληψη.**



Εικόνα 44: Μελέτη της αντιλisterιακής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL23, A επανάληψη.



Εικόνα 45: Μελέτη της αντιλειτουργικής δράσης των στελεχών λακτοβακίλλων A1 A2 A6 A9 A10 A11 A13 A15 A16 A17 A18 A21 A23 A25 A26 A29 A30 A38 A40 A44 A45 A46 A47 A48 A49 A51 A52 C1 C5 C9 C15 C28 C32 C39 C44 C45 C50 C51 C58 C59 C68 C70 C72 C74 GG DSM20079, έναντι του στελέχους *Listeria monocytogenes* PL23, B επανάληψη.

ΚΕΦ.3. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

A. Σχολιασμός αποτελεσμάτων ανάπτυξης λακτοβακίλλων σε πρεβιοτικά υποστρώματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, είναι εμφανές ότι διαφορετικά προβιοτικά στελέχη, ακόμη και αν ανήκουν στο ίδιο γένος (Λακτοβακίλλοι), εμφανίζουν διαφορές στην προτίμηση του θρεπτικού υλικού και κατά συνέπεια στην ανάπτυξή τους σε αυτό. Παρατηρούμε ότι όλα τα στελέχη αναπτύχθηκαν στα υποστρώματα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, τους FOS και την ινουλίνη, ενώ ορισμένα από αυτά, πχ. C59, C39, ANLB23, ANLB2 αναπτύχθηκαν περισσότερο στο FOS αντί στη γλυκόζη, ως πηγή άνθρακα. Δεν παρατηρήθηκαν στελέχη που να αναπτύσσονται καλύτερα στην ινουλίνη αντί στη γλυκόζη, ούτε στελέχη που να αναπτύσσονται καλύτερα στην ινουλίνη αντί στα FOS.

Στα τρυβλία που περιείχαν β-γλυκάνη ως υπόστρωμα, ορισμένα στελέχη αναπτύχθηκαν έντονα πχ. ANLB52, ANLB51 ANLB1, ANLB9, ANLB10, ANLB44, ANLB48, C68, άλλα λιγότερο πχ. ANLB6, ANLB11, ANLB46, ANLB47 ANLB49, ενώ κάποια δεν σημείωσαν καθόλου ανάπτυξη πχ. ANLB2, ANLB13, ANLB18, ANLB21, ANLB40, ANLB30, ANLB38, C1, C5. Εξαιτίας της πυκνότητας του συγκεκριμένου θρεπτικού υλικού, είναι σχετικά δύσκολη η ανίχνευση της ανάπτυξης των στελεχών σε αυτό καθώς και η αποτύπωσή της στις φωτογραφίες.

B. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΤΙΛΙΣΤΕΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

B.1. Σχολιασμός πρώτης μεθόδου ελέγχου αντιλisterιακής δράσης-Εμβολιασμός σε τρυβλία με την μέθοδο "spot inoculation"

Μετά την εικοσιτετράωρη αναερόβια επώαση, ελέγχοντας τα τρυβλία δεν παρατηρούμε εμφάνιση ξεκάθαρων διαυγών ζωνών γύρω από τα εμβολιασμένα σημεία. Αυτό πρακτικά δηλώνει ότι τα συγκεκριμένα στελέχη λακτοβακίλλων δεν εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση ενάντια στα στελέχη του *Listeria monocytogenes*, που εξετάστηκαν.

Ωστόσο, δεν είμαστε σε θέση να αποκλείσουμε εντελώς την πιθανότητα ύπαρξης κάποιας αντιμικροβιακής δράσης των υπό εξέταση στελεχών ακολουθώντας κάποια άλλη πειραματική μέθοδο. Για παράδειγμα, στην έρευνα των Mehran Moradi, Karim Mardani και Hossein Tajik (63), διαπιστώθηκε αντιλisterιακή δράση της βακτηριοσίνης (μεταβολικά προϊόντα των βακτηρίων που παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση) των *Lactobacillus acidophilus* LA5, *L. casei* 431 και *L. salivarius* που διερευνήθηκαν in vitro, τόσο σε συνθήκες καλλιέργειας όσο και σε μοντέλα τροφίμων. Η αντιβακτηριακή δράση όλων των εξεταζόμενων στελεχών συνδέθηκε κυρίως με την ένωση πυρρολο [1,2-α] πυραζίνη-1,4-διόνη και σε κάποιο βαθμό, στην παρουσία διαφορετικών οργανικών οξέων. Η βακτηριοσίνη των συγκεκριμένων στελεχών, ειδικά του *L. salivarius*, παρουσίασε δραστηριότητα αφαίρεσης βιοφίλμ στο *Listeria monocytogenes*.

Ίσως αν ακολουθούσαμε διαφορετική πειραματική μέθοδο, να εντοπίζαμε κάποια, έστω και ελάχιστη, αντιμικροβιακή δράση. Για το λόγο αυτό το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης έρευνας περιορίζεται στα στελέχη των λακτοβακίλλων και του *Listeria* που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και στην πειραματική μέθοδο «εμβολιασμού σε τρυβλία».

B.2. Σχολιασμός δεύτερης μεθόδου ελέγχου αντιλιστεριακής δράσης - Διάχυση άγαρ με τη μέθοδο "agar well diffusion assay"

Με την δεύτερη μέθοδο ελέγχου αντιλιστεριακής δράσης, επαληθεύσαμε και επιβεβαιώσαμε τα αποτελέσματα που είχαν προκύψει από την πρώτη. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκε ύπαρξη διαυγών ζωνών γύρω από τα πηγαδάκια με το υπερκείμενο της υγρής κυτταρικής καλλιέργειας του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους, γεγονός που υποδεικνύει ότι η λιστέρια αναπτύχθηκε ανεπηρέαστη ομοιόμορφα σε όλη την έκταση του τρυβλίου. Αυτό πρακτικά δηλώνει την απουσία κάποιου αντιλιστεριακού παράγοντα, άρα όπως και στην πρώτη μέθοδο, το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι ότι τα συγκεκριμένα προβιοτικά στελέχη δεν εμφανίζουν αντιλιστεριακή δράση έναντι στα συγκεκριμένα στελέχη.

Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό δεν μπορεί να γενικευτεί ως προς το σύνολο των λακτοβάκιλων, πόσο μάλλον ως προς το σύνολο των προβιοτικών μικροοργανισμών. Μάλιστα, οι H. Andreas Hartmann, Thomas Wilke και Ralf Erdmann σε αντίστοιχη μελέτη που διεξήγαγαν (64) με στόχο την ανάπτυξη νέων προϊόντων για την ενίσχυση της μικροβιακής ασφάλειας των τροφίμων, δοκίμασαν υπερκείμενα καλλιέργειας χωρίς κύτταρα (CFS) οκτώ ανταγωνιστικών βακτηριακών στελεχών για την αποτελεσματικότητά τους στην αναστολή της *Listeria monocytogenes* σε διαφορετικά τρόφιμα. Τα ανταγωνιστικά στελέχη αντιπροσώπευαν διαφορετικά στελέχη Λακτοβακίλλων, καθώς και ένα απομονωμένο *Staphylococcus sciuri* και όλα έδειξαν ισχυρή αναστολή του *L. monocytogenes* σε πλάκες άγαρ. Τα υπερκείμενα χωρίς κύτταρα ελήφθησαν μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων σε εκχύλισμα γλυκόζης (yeast extract-glucose broth). Σημαντική παρατήρηση ήταν πως σε όλες τις περιπτώσεις η αναστολή του *L. monocytogenes* ήταν μόνο παροδική και τα επιβιώσαντα ή ανθεκτικά βακτήρια άρχισαν να αναπτύσσονται μετά από παρατεταμένη αποθήκευση. Αυτά τα αποτελέσματα τονίζουν τη σημασία του προσεκτικού ελέγχου της αποτελεσματικότητας των βακτηριοσινών που προορίζονται να εφαρμοστούν έναντι επιλεγμένων ή μη βακτηριακών στόχων σε τρόφιμα. Επιπλέον, επισημαίνουν ότι οι δοκιμασμένες βακτηριοσίνες δεν είναι κατάλληλες για να διασφαλίσουν πλήρη αναστολή του *L. monocytogenes* σε ένα προϊόν διατροφής, εάν δεν εφαρμοστεί σε συνδυασμό με πρόσθετο συντηρητικό.

Κάθε στέλεχος, ακόμα και αν έχει κοινά χαρακτηριστικά με άλλα προβιοτικά στελέχη, είναι μοναδικό και διαθέτει ξεχωριστές ιδιότητες. Το ίδιο ισχύει και για τα διαφορετικά στελέχη λιστέριας. Για τον λόγο αυτό, το συμπέρασμα της παρούσας έρευνας περιορίζεται στην αλληλεπίδραση των συγκεκριμένων προβιοτικών στελεχών με τα συγκεκριμένα στελέχη λιστέριας. Οι ερευνητές που ασχολούνται με την μελέτη των προβιοτικών μικροοργανισμών, είναι αισιόδοξοι ως προς την πιθανή αντιμικροβιακή τους δράση και οι έρευνες συνεχίζονται.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] SEKIROV, I., RUSSELL, S. L., ANTUNES, L. C. & FINLAY, B. B. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, 90, 859-904.
- [2] KENNEDY, P. J., CRYAN, J. F., DINAN, T. G. & CLARKE, G. 2014. Irritable bowel syndrome: a microbiome-gut-brain axis disorder? *World J Gastroenterol*, 20, 14105-25., 859-904.
- [3] FERREIRA, C. M., VIEIRA, A. T., VINOLO, M. A., OLIVEIRA, F. A., CURI, R. & MARTINS FDOS, S. 2014. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J Immunol Res*, 2014, 689492.
- [4] KARLSSON, F., TREMAROLI, V., NIELSEN, J. & BACKHED, F. 2013. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes*, 62, 3341-9.
- [5] BISGAARD, H., LI, N., BONNELYKKE, K., CHAWES, B. L., SKOV, T., PALUDAN-MULLER, G., STOKHOLM, J., SMITH, B. & KROGFELT, K. A. 2011. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*, 128, 646-52 e1-5.
- [6] M. Azcarate-Peril, «The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: A putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer?», *Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, pp. 301(3):G401-24, September 2011.
- [7] Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66, 365-78.
- [8] Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J. & Knight, S. C. 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis*, 15, 300-10.
- [9] KRUIS W., FRIC P., POKROTNIEKS J., LUKAS M., FIXA B., KASCAK M., KAMM M. A., WEISMUELLER J., BEGLINGER C., STOLTE M., WOLFF C. & SCHULZE J. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, 53, 161723.
- [10] Rummel, F.M., et al., Clinical evidence for immunomodulatory effects of probiotic bacteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009. 48(2): p. 126-41
- [11] Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(42):15611-6. Epub 2006/10/13.
- [12] Claesson MJ, van Sinderen D & O' Toole PW. The genus *Lactobacillus* –a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol Lett* 2007. 269:22-28.
- [13] Morelli L, Cesena C, de Haen C, Gozzini L, 'Taxonomic *Lactobacillus*' composition of feces from human newborns during the first few days' *Microb Ecol* 1998. 35: 205-212.
- [14] Barrangou R, Lahtinen SJ, Ibrahim F, Ouwehand AC. Genus *Lactobacillus*. In: Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, Wright Av, editors. *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects*. 4th ed 2011.
- [15] Walker WA. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Annals of nutrition & metabolism*. 2013;63 Suppl 2:8-15. Epub 2013/11/15.
- [16] Siragusa S, De Angelis M, Calasso M, Campanella D, Minervini F, Di Cagno R, et al. Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions. *Journal of proteomics*. 2014;96:366-80. Epub 2013/11/16.
- [17] De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Harth H, Huys G, Daniel HM, Weckx S. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food microbiology*. 2014;37:11-29. Epub 2013/11/16.

- [18] Probiotic bacteria in dietetic products for infants: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. Agostoni et al. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004. 38:365-374
- [19] SGOURAS DN, PANAYOTOPOULOU EG, MARTINEZ GONZALEZ B PETRAKI K, MICHPOULOS S, MENTIS A. *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, 12:1378–1386
- [20] Gershwin, M.E., P. Nestel, and C.L. Keen, *Handbook of nutrition and immunity*. 2004, Totowa, N.J.: Humana Press. Xi, 365 p.
- [21] M. Azcarate-Peril, «The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: A putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer» *Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, pp. 301(3):G401-24, September 2011.
- [22] Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125, 1401-12.
- [23] Jürgen Schrezenmeier-Michael de Vrese, a.a., *The American Journal of Clinical Nutrition*, March 2009: p. 361S-364S, ajcn.org
- [24] Roberfroid M. B. (1999). Concepts in Functional Foods: The Case of Inulin and Oligofructose. *J.Nutr.* 129: 1398S-1401S
- [25] G. Gibson, «Prebiotics: new developments in functional foods» Oxford Chandos Publishing Limited, 2000.
- [26] Fuller R., House R. & Green R. (1999). Probiotics. In: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. Gibson G.R. & Roberfroid M. B. eds. P: 89-99
- [27] Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol* 1992, 72: 57-64
- [28] Kotzampassi K. Dietary fibres and prebiotics: of proven benefit or a new fad? *Annals Gastroenterol* 2006, 19: 225-227.
- [29] Macfarlane S, Macfarlane GT, Cummings JH. Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 2006, 24: 701-14
- [30] Macfarlane S. Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* 2008, 42: S 142-143.
- [31] Doyglas LC, Sanders ME. Probiotics and prebiotics in dietetics practise. *J Am Diet Assoc* 2008; 108: 510-521
- [32] Olano-Martin E., Mountzouris K. C., Gibson G.R. & Rastall R. A (2000) In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*, 83: 247-255. UK
- [33] D. Saulnier, «Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays» *Appl Environ Microbiol*, pp. 73(6):1753-65, 2007.
- [34] R. Palframan, «Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates in vitro» *Anaerobe*, pp. 8(5):287-92, 2002.
- [35] M. Roberfroid, «The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products» *J Nutr*, pp. 128:11-9, 1998.

- [36] E. Olano-Martin, «In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteri» *Br J Nutr.*, pp. 83(3):247-55, 2000.
- [37] M. Roberfroid, «Inulin-type fructans: functional food ingredients» *J Nutr*, pp. 2493S-2502S, 2007.
- [38] R. Crittenden, «Production, properties and applications of food grade oligosaccharides» *Trends in food Science and Technology*, pp. 7:353-61, 1996.
- [39] M. S. Shin, «Structural and biological characterization of aminated-derivatized oat beta- glucan» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 53(14):5554-8, 2005.
- [40] K. Mitsou Evdokia, «Prebiotic potential of barley derived b-glucan at low intake levels: A randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study,» *Food Research International*, p. 1086–1092, 2010.
- [41] K. Turunen, «Impact of beta-glucan on the faecal microbiota of polypectomized patients: A pilot study,» *Anaerobe*, pp. 403-406, 2011.
- [42] J. Volman, «Dietary modulation of immune function by beta-glucans» *Physiol Behav.*, pp. 23; 94(2):276-84, 2008.
- [43] K. Maki, «Effects of consuming foods containing oat b-glucan on blood pressure, carbohydrate metabolism and biomarkers of oxidative stress in men and women with elevated blood pressure,» *European Journal of Clinical Nutrition*, pp. 768-795, 2007.
- [44] X. Huang, «Diet high in oat β -glucan activates the gut-hypothalamic (PYY3–36-NPY) axis and increases satiety in diet-induced obesity in mice» *Mol Nutr Food Res*, pp. 1118-21, 2011.
- [45] E. Beck, «Oat beta-glucan increases postprandial cholecystokinin levels, decreases insulin response and extends subjective satiety in overweight subjects» *Mol Nutr Food*, pp. 1343-51, 2009.
- [46] Czop, «The Role of Beta.-Glucan Receptors on Blood and Tissue Leukocytes in Phagocytosis and Metabolic Activation» *Harvard Medical School*, pp. 5:286-296, 1986.
- [47] B. Knuckles, «Molecular characterization of barley b-glucan by size-exclusion chromatography with multiple-angle laser light scattering and other detectors» *Cereal Chem*, pp. 74(4):599-604, 1997.
- [48] J. Dexter, «Texture and color of pasta containing mill fractions from hull-less barley genotypes with variable content of amylose and fibre,» *Woodhead publishing Ltd, Cambridge Uk*, pp. 488-494, 2004.
- [49] Marconi, «Composition and utilization of barley pearling by-products for making functional pastas rich in dietary fiber and b-glucans» *Cereal Chemistry*, pp. 133-139, 2000.
- [50] P. Berglund, «Physicochemical and Sensory Evaluation of Extruded High-Fiber Barley Cereals» *Cereal Chem*, pp. 71(1):91-95, 1994.
- [51] A. Cavallero, «High (1-3, 1-4)-b-glucan barley fractions in breadmaking and their effects on human glycemic response» *Journal of Cereal Science*, pp. 59-66, 2002.
- [52] G. Inglett, «USDA's oatrim replaces fat in many food products» *Food Technology*, pp. 44,100, 1990.
- [53] H. Salovaara, «A yoghurt-like oat bran pudding: experiments and prospects» *Poster ICC'91 Symposium*, pp. 10-13, 10 June 1991.
- [54] Volikakis, «Effects of a commercial oat b-glucan concentrate on the chemical, physico-chemical and sensory attributes of a low-fat white-brined cheese product» *Food Research International*, pp. 83-94, 2004.

- [55] L. Morin, «Physical and sensory characteristics of reduced-fat breakfast sausages formulated with barley b-glucan» *Journal of Food Science*, pp. 2391-2396, 2002.
- [56] Farber, J. and Peterkin, P. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *American Society for Microbiology*, 55(3), pp.476-511.
- [57] Silk B., Date K., Jackson K., Pouillot R., Holt K., Graves L., Ong K., Hurd S., Meyer R., Marcus R., Shiferaw B., Norton D., Medus C., Zansky S., Cronquist A., Henao O., Jones T., Vugia D., Farley M. and Mahon B. (2012). Invasive Listeriosis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network
- [58] Μπερζιτζόγλου Ε, *Μικροβιολογία τροφίμων και πεπτικού συστήματος*, Παρισιανου, 2004.
- [59] Harwig, J., Mayers, P., Brown, B. and Farber, J. (1991). *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Control*, 2(2), pp.66-69
- [60] Vivant, A., Garmyn, D. and Piveteau, P. (2013). *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3.
- [61] Allerberger, F. and Wagner, M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1), pp.16-23
- [62] Gong H.S., Meng X.C., Wang H. (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China, *Food Control* 21 (2010) 89-86
- [63] Mehran Moradi, Karim Mardani, Hossein Tajik: Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models. *LWT - Food Science and Technology* 2019
- [64] H. Andreas Hartmann, Thomas Wilke, Ralf Erdmann: Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology* 2011 p.192-199