

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

*Studio delle caratteristiche probiotiche di lattobacilli
di origine vaginale per un loro utilizzo in alimenti
funzionali di genere*

Tesi in:

Laboratorio di Microbiologia Applicata

Relatore

Prof.ssa Francesca Patrignani

Presentata da

Elena Felici

Correlatori

Dott.ssa Danka Bukvicki

Dott. Giacomo Braschi

Sessione III

Anno Accademico 2017/2018

1. INTRODUZIONE	5
1.1 I batteri lattici	6
1.1.1 Evoluzione della definizione di batteri lattici	7
1.1.2 Classificazione tassonomica e principali caratteristiche dei LAB	8
1.2 Definizione di probiotico	10
1.2.1 Benefici dei probiotici	12
1.2.2 Tassonomia e caratteristiche dei principali LAB ad uso probiotico	12
1.2.2.1 Il genere <i>Lactobacillus</i>	17
1.2.2.1.1 Gruppo <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	17
1.2.2.1.2 Gruppo <i>Lactobacillus salivarius</i>	17
1.2.2.1.3 Gruppo <i>Lactobacillus reuteri</i>	18
1.2.2.1.4 Gruppo <i>Lactobacillus plantarum</i>	18
1.2.2.1.5 Gruppo <i>Lactobacillus casei</i>	19
1.2.2.2 Il genere <i>Streptococcus</i>	19
1.2.2.3 Il genere <i>Bifidobacterium</i>	20
1.3 I lattobacilli vaginali ad uso probiotico	22
1.3.1 La microflora vaginale	22
1.3.1.1 Mantenimento dell'equilibrio della microflora vaginale	25
1.3.1.2 Azione dell'acido lattico	27
1.3.2 I probiotici come prevenzione e cura delle disbiosi vaginali	30
1.3.3 Selezione e caratterizzazione dei batteri lattici vaginali ad uso probiotico	32
1.3.3.1 Proprietà di sicurezza	33
1.3.3.2 Proprietà funzionali	34
1.3.3.3 Proprietà tecnologiche	38
1.3.4 Esempio di applicazione di probiotici vaginali in prodotti lattiero caseari	39
2. OBIETTIVI	41
3. MATERIALI E METODI	44

3.1 Materiali	45
3.1.1 Ceppi microbici	45
3.1.2 Condizioni di crescita	46
3.2 Metodi	47
3.2.1 Valutazione della vitalità cellulare	47
3.2.2 Capacità di deconiugare i sali biliari	47
3.2.2.1 Acido taurodesossicolico	47
3.2.2.2 Procedura	47
3.2.3 Autoaggregazione cellulare	48
3.2.4 Idrofobicità	49
3.2.5 Digestione gastrica duodenale simulata	49
3.2.5.1 Ceppi microbici	49
3.2.5.2 Soluzioni	50
3.2.5.3 Procedura	51
3.2.6 Prove di adesione a cellule Caco-2	52
3.2.6.1 Ceppi microbici	52
3.2.6.2 Cellule Caco-2	53
3.2.6.3 Procedura	54
4. RISULTATI	55
5. CONCLUSIONI	68
6. BIBLIOGRAFIA	70

1. INTRODUZIONE

1.1 I batteri lattici

1.1.1 Evoluzione della definizione di batteri lattici

L'origine della definizione di batteri lattici (LAB) risale agli inizi del 1900. A partire dal 1857, quando Pasteur scoprì i meccanismi fermentativi, in particolare la fermentazione lattica, ebbero origine i primi studi sull'interazione tra questi microrganismi e l'ospite, nonché le indagini sul loro ruolo negli alimenti. Nel 1873, Lister isolò dal latte la prima coltura pura di *Bacterium lactis* (oggi *Lactococcus lactis*). Fu solo nel 1890 che vennero introdotte colture starter per la realizzazione di prodotti lattiero caseari, sia in Germania (Weigmann), che in Danimarca (Storch). Questo rappresentò un'importante svolta tecnologica perché permise di dare inizio alla produzione industriale di alimenti fermentati. Le prime definizioni di LAB includevano sia i batteri lattici nell'accezione attuale, che i coliformi, facendo riferimento alla loro capacità di coagulare il latte come caratteristica distintiva (Stiles e Holzpfel, 1996). Grazie a Beijerinck, nel 1901, vennero identificati i microrganismi del genere *Lactobacillus* come Gram positivi, portando all'esclusione dei coliformi dal gruppo dei LAB. Questi furono quindi definiti come “un gruppo naturale di organismi Gram positivi, immobili, non sporigeni, di forma bastoncellare o sferica, in grado di fermentare i carboidrati per formare principalmente acido lattico” (Orla-Jensen, 1919). Secondo questa definizione, i batteri lattici vennero divisi in sette generi: *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Microbacterium* e *Tetracoccus*. La distinzione venne fatta attraverso lo studio di forma, presenza di catalasi, capacità di ridurre i nitriti e tipologia di fermentazione, come è mostrato in Tabella 1.

Genere	Forma	Catalasi	Riduzione dei nitriti	Fermentazione	Generi attuali
<i>Betabacterium</i>	bastoncelli	-	-	Eterofermentanti	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Thermobacterium</i>	bastoncelli	-	-	Omofermentanti	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	bastoncelli	-	-	Omofermentanti	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	cocchi	-	-	Omofermentanti	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	cocchi	-	-	Eterofermentanti	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Microbacterium</i>	bastoncelli	+	+	Omofermentanti	<i>Brochotrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	cocchi	+*	+	Omofermentanti	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

Tabella 1: classificazione dei LAB secondo Orla-Jensen, 1919.

* i pediococchi possiedono delle pseudocatalasi, dando come risultato dei falsi positivi

Nel 1937, Sherman propose la prima classificazione sistematica del genere *Streptococcus*. Tra il 1987 e il 1984, vennero introdotti i generi *Lactobacillus* e *Enterococcus*, grazie allo studio delle loro caratteristiche molecolari (Schleifer e Kilpper-Baltz). Alla fine del Novecento, il progresso scientifico permise di approfondire la composizione cellulare e molecolare dei diversi microrganismi, consentendo di modificare e ampliare la classificazione tassonomica dell'epoca, basata esclusivamente sulle caratteristiche morfologiche e fisiologiche delle cellule. Tale approccio, detto filogenetico, si basa sul confronto tra le sequenze molecolari per ricostruire i rapporti evolutivi tra i vari organismi. Lo studio è rivolto soprattutto alle sequenze geniche codificanti RNA ribosomiale 16S, altamente conservato nei procarioti (Felis e Dellaglio, 2007).

1.1.2 Classificazione tassonomica e principali caratteristiche dei LAB

I batteri lattici sono microrganismi procarioti ubiquitari, appartenenti al regno dei batteri. Sviluppano naturalmente in substrati ricchi di carboidrati disponibili come le piante, gli alimenti (vegetali, cereali, vino, birra, prodotti lattiero caseari, frutta e succhi di frutta, prodotti carnei e ittici), ma anche lungo il tratto orale, respiratorio, gastrointestinale e genitale degli animali e dell'uomo (W. Liu et al., 2014). I LAB si collocano in entrambi i phyla in cui sono suddivisi i Gram positivi: *Firmicutes* e *Actinobacteria*. All'interno del *Firmicutes* i batteri lattici si trovano nella classe dei *Bacilli*, in particolare nell'ordine *Lactobacillales*. Quest'ultimo include i seguenti generi di LAB: *Alloiococcus*, *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Pediococcus*, *Symbiobacterium*, *Weissella* e *Vagococcus* (Horvath et al. 2009). Le loro molecole di DNA presentano un contenuto inferiore al 50% di guanina-citosina. I LAB appartenenti al phylum *Actinobacteria* sono collocati nel genere *Bifidobacterium* e sono formati da DNA contenente un ammontare di guanina-citosina superiore al 50% (Bjorkroth et al., 2016). In Figura 1 sono mostrate le relazioni filogenetiche all'interno dei Gram positivi, in riferimento al confronto tra le sequenze di DNA ribosomiale 16S.

I batteri lattici non presentano l'enzima catalasi, ma possono possedere delle pseudocatalasi. Generalmente non sono sporigeni. Dal punto di vista morfologico possono presentarsi sia come bacilli che come cocci. Sono microrganismi anaerobi, anche se tollerano basse concentrazioni di ossigeno (aerotolleranti). Esistono, sebbene rari, anche alcuni ceppi di LAB in grado di attuare la respirazione aerobica, essendo dotati di citocromi ma il loro metabolismo è principalmente di tipo fermentativo e si distingue in omofermentativo e eterofermentativo. Nel primo caso, vengono convertiti

zuccheri a sei atomi di carbonio in acido lattico, attraverso la via di Embden-Meyerhof-Parnas, o glicolisi. Nel secondo caso, oltre all'acido lattico come principale prodotto finale, si formano anche acetato, etanolo, CO₂, formiato e succinato come prodotti secondari. Questa via metabolica è chiamata via del fosfogluconato o fermentazione eterolattica (Kandler, 1983).

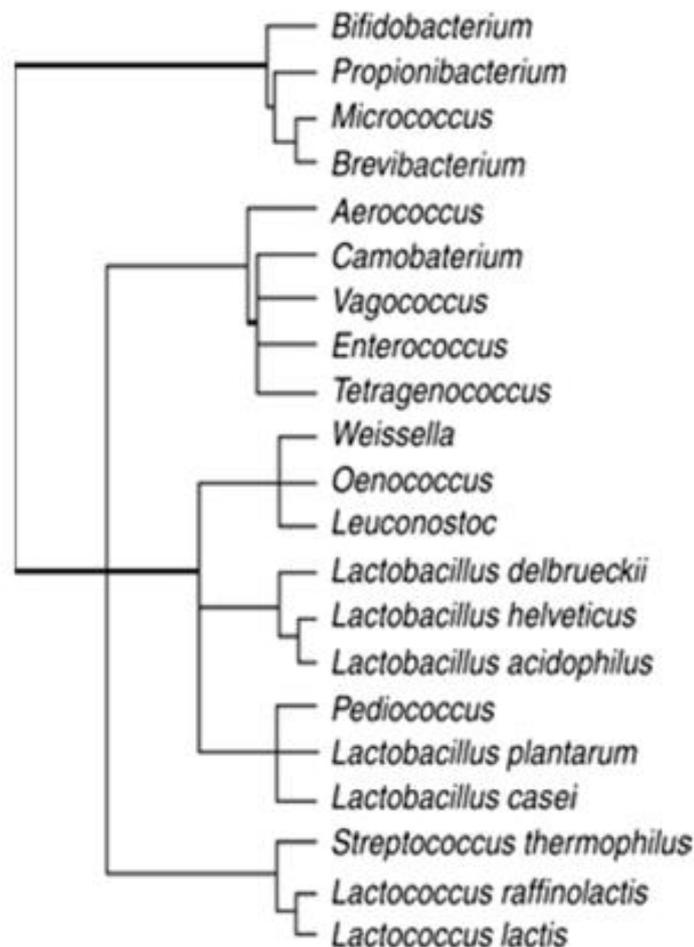


Figura 1: Dendrogramma che evidenzia la relazione filogenetica all'interno dei Gram positivi, basata sul confronto tra le sequenze di rRNA 16S. La distanza filogenetica non è mostrata in scala. (Bjorkroth et al., 2016).

1.2 Definizione di probiotico

La definizione di probiotico si è evoluta nel tempo in relazione ai progressi compiuti nello studio del loro meccanismo d'azione. Dal punto di vista etimologico, il termine “probiotico” significa “a favore della vita” e deriva dall'unione tra la preposizione latina “pro” e il nome greco “bios”. Metchnikoff fu il primo studioso ad effettuare osservazioni riguardanti gli effetti benefici dei probiotici sulla salute umana, durante i primi anni del Novecento. Egli suppose che i microrganismi responsabili del processo fermentativo dello yogurt, ovvero *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* fossero in grado di inibire i batteri patogeni intestinali, quindi di migliorarne l'equilibrio. Nel 1965, Lilly & Stillwell, indicarono come probiotici sostanze prodotte da alcuni batteri per stimolare la crescita di altri microrganismi, a seguito di osservazioni sulla crescita *in vitro*. Nel 1973, Fujii e Cook definirono i probiotici come composti in grado di aumentare la resistenza alle infezioni nell'ospite, ma non di inibire la crescita di altri microrganismi *in vitro*. Questa osservazione venne fatta in riferimento a studi svolti sulla resistenza dei topi esposti ad infezione da *Staphylococcus aureus*. Parker (1974) identificò con il termine probiotico “organismi o sostanze in grado di contribuire all'equilibrio della flora intestinale dell'ospite” (Hamilton-Miller et al., 2003). La definizione di probiotico più utilizzata fino ad oggi è quella data da Fuller nel 1989, che presentò i probiotici come “alimenti contenenti microrganismi vivi, in grado di conferire benefici all'ospite animale, attraverso il miglioramento del suo equilibrio microbico intestinale”. La definizione ufficiale, in uso dal 2001, di FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) e OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) stabilisce che “i probiotici sono microrganismi vivi, che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite.” Questa definizione è stata approvata anche dall'Associazione Scientifica Internazionale dei Probiotici e Prebiotici (ISAPP)

ed è quella attualmente accettata (Hill et al., 2014). Ogni microrganismo indicato come probiotico deve, innanzitutto, non essere dannoso per l'uomo, quindi idoneo al consumo. Identificare un microrganismo come sicuro significa che ne è stato riconosciuto lo “status di presunzione qualificata di sicurezza” (QPS), ovvero “*lo stato di sicurezza attribuito dall’Agenzia per la sicurezza alimentare in Europa (EFSA) a gruppi selezionati di microrganismi in base ad una valutazione comprovante l’assenza di rischi per la salute*” (Regolamento di Esecuzione 562/2012 (UE)). Un particolare ceppo è riconosciuto come sicuro e può essere utilizzato come additivo alimentare se presenta un’identità tassonomica ben definita, se è stato consumato per anni senza provocare danni all'uomo e se la mancanza di patogenicità è stata confermata da evidenze scientifiche. Inoltre, è necessario specificarne la destinazione d’uso (Eshetu Chilo et al., 2018). Oltre che essere riconosciuti come sicuri dall’EFSA, i probiotici sono anche “generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS)” dalla Food and Drug Administration (FDA). Una volta che ne è stata determinata la sicurezza per il consumo alimentare, ogni microrganismo in grado di apportare dei benefici all'uomo potrebbe essere un potenziale probiotico. Tuttavia, l’EFSA impone anche che gli effetti benefici siano validati attraverso prove scientifiche *in vivo*. I microrganismi più utilizzati per questo scopo appartengono al gruppo dei LAB. In Tabella 2 sono elencati i più importanti, per la maggior parte sono ceppi dei generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Altri microrganismi non appartenenti ai LAB ma considerati probiotici sono *Saccharomyces cerevisiae* e *S. boulardii*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Holzapfel et al., 2001).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Altri batteri	Altri
<i>spp.</i>	<i>spp.</i>	lattici	microrganismi
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. infantis*</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>acidilactici</i>	
<i>L. crispatus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces</i>
			<i>cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. longum</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>spp. bulgaricus</i>		<i>mesenteroides</i>	<i>boulardii</i>
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. gallinarum</i>		<i>Sporolactobacillus</i>	
		<i>inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>		<i>Streptococcus</i>	
		<i>thermophilus</i>	
<i>L. helveticus</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. salivarius</i>			
<i>L. oris</i>			

Tabella 2: Microrganismi riconosciuti come probiotici. (Holzapfel et al., 2001).

*Unificato a *B. longum*

1.2.1 Benefici dei probiotici

I benefici apportati all'uomo dai probiotici sono specifici per ogni ceppo e, se di molti si è compreso meccanismo di azione, altri sono tuttora studiati. In questo paragrafo verrà affrontato l'argomento in termini generali, mentre nei capitoli successivi saranno indagati in modo più specifico i benefici dei batteri considerati. Gli effetti dei probiotici riguardano il miglioramento del benessere intestinale, la prevenzione dei tumori, l'aumento della risposta immunitaria e la

riduzione del colesterolo nel sangue. Innanzitutto, il mantenimento dell'equilibrio intestinale è favorito dalla digestione del lattosio, attraverso la produzione dell'enzima microbico β -galattosidasi; questo riduce i sintomi dell'intolleranza nei soggetti che ne soffrono (Savaiano et al., 1984). Inoltre, tramite l'effetto barriera e la competizione tra batteri, i LAB ostacolano la colonizzazione dell'ambiente intestinale da parte dei patogeni, sia impedendone fisicamente l'adesione al lume, sia producendo sostanze inibenti. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus lactis* sono in grado di produrre delle batteriocine, proteine ad azione antimicrobica, in grado di agire contro i membri della stessa specie, o strettamente correlati filogeneticamente. Oltre alle batteriocine, vengono prodotti acido lattico, acido acetico e altri acidi organici, che svolgono un'azione antimicrobica indiscriminata rispetto alle batteriocine, inibendo anche i batteri appartenenti anche ai generi *Clostridium* e *Bacillus* (Kechagia et al., 2013). I LAB probiotici sono anche in grado di stimolare la produzione di immunoglobuline A, in questo modo, sfavoriscono le infezioni da Rotavirus e svolgono un'azione immunomodulante. Inoltre, degradano le nitrosammine, composti che si formano per reazione tra nitriti e ammine secondarie negli alimenti, ad elevata azione cancerogena (McIntosh, 1996). Quest'ultima proprietà è tipica, soprattutto, del genere *Lactobacillus*, che presenta una maggiore azione degradativa rispetto a *Streptococcus* e *Bifidobacterium* (Rowland et al., 1998). L'azione anticancerogena dei probiotici riguarda anche l'inattivazione di due enzimi, β -glucuronidasi e β -gluconidasi, che sono coinvolti nella conversione di composti procancerogeni in cancerogeni. I probiotici contribuiscono ad abbassare i livelli di colesterolo nel sangue, attraverso la degradazione degli acidi biliari che si originano a livello epatico (Mc Connell, 1995); indirettamente, quindi, sono in grado di prevenire lo sviluppo delle malattie cardiovascolari.

1.2.2 Tassonomia e caratteristiche dei principali LAB ad uso probiotico

1.2.2.1 Il genere *Lactobacillus*

Le specie microbiche più rilevanti per la nutrizione umana e per il settore alimentare fanno parte del genere *Lactobacillus*. Queste rivestono un'elevata importanza nella produzione degli alimenti fermentati, dove vengono impiegate sia come colture starter, sia per la conservazione dei prodotti. Inoltre, a questo genere appartiene la maggior parte dei microrganismi utilizzati come probiotici. In Figura 2 sono mostrate le relazioni filogenetiche tra le specie di *Lactobacillus*. In particolare, l'utilizzo combinato di modelli filogenetici e metodi molecolari differenti ha permesso di identificare 15 gruppi (riportati in Figura 3), ognuno costituito da varie specie, attraverso il sequenziamento del gene 16S di RNA ribosomiale (Salveti et al., 2012).

I lattobacilli non producono spore, sono catalasi negativi (anche se alcuni ceppi sono in grado di produrre delle pseudocatalasi), anaerobi e sono caratterizzati da forma bastoncellare, con dimensioni comprese tra 0,5-1,5 µm di larghezza e 1,5-8 µm di lunghezza. Appartenendo al phylum dei *Firmicutes*, presentano un basso contenuto di guanina e citosina nel DNA, non superiore al 50%, anche se in alcuni casi può raggiungere il 59.2%. Crescono tra i 2 e i 53 °C, a pH tra 3 e 8. Le condizioni ottimali per lo sviluppo sono rispettivamente di 30-40 °C e 5.5-6.2. Dal punto di vista nutrizionale, i lattobacilli necessitano di substrati ricchi in termini di carboidrati fermentescibili, amminoacidi, peptidi, vitamine, sali minerali e acidi grassi. Per questo motivo sviluppano naturalmente in frutta, vegetali, prodotti lattiero caseari, carni e ittici.

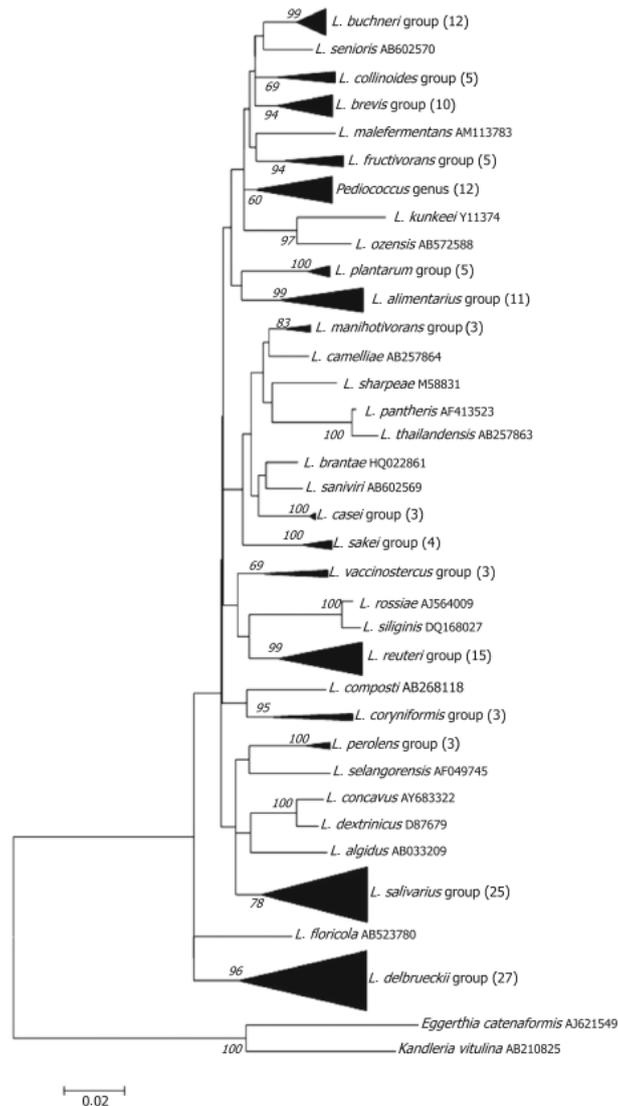


Figura 2: Relazioni filogenetiche all'interno del genere *Lactobacillus*, basate sul confronto tra le sequenze di rRNA 16S. (Salveti et al, 2012).

Sono, inoltre, parte della microflora endogena della cavità orale, dell'apparato gastrointestinale e genitale degli animali e dell'uomo (Salveti et al., 2012).

Possono essere classificati in tre categorie, a seconda di quali metaboliti sono rilasciati al termine del processo fermentativo. Il primo gruppo è costituito dagli omofermentanti obbligati, a partire dagli zuccheri a sei atomi di carbonio, producono solamente acido lattico attraverso la via Embden-Meyerhof-Parnas. Questi non possono fermentare i pentosi e il gluconato perché privi dell'enzima fosfochetolasi. Il secondo gruppo è quello degli eterofermentanti facoltativi, i quali convertono gli esosi in acido lattico tramite la glicolisi e i pentosi e il

1.2.2.1.1 Gruppo *Lactobacillus delbrueckii*

Il gruppo *Lactobacillus delbrueckii* è attualmente composto da 27 specie. *Lactobacillus gigeriorum*, *Lactobacillus equicursoris*, *Lactobacillus pasteurii*, *Lactobacillus hominis* e *Lactobacillus taiwanensis*, sono state recentemente aggiunte a quelle precedentemente indicate da Felis e Dallaglio nel 2007. All'interno di questo gruppo i probiotici attualmente impiegati sono *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gallinarum* e *Lactobacillus acidophilus* (Klein et al., 1998). *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii* e *Lactobacillus gasseri* colonizzano l'apparato genitale femminile, in particolare, costituiscono la microflora vaginale endogena. Recenti studi su *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus gasseri* hanno mostrato una spiccata attività antagonista sia verso i microrganismi patogeni e le specie microbiche che causano alterazione dei prodotti alimentari, sia nei confronti dei patogeni del tratto urogenitale (Siroli et al., 2017). Per questi motivi, le suddette specie sono oggetto di studio per essere applicati come probiotici per la produzione di alimenti di genere.

1.2.2.1.2 Gruppo *Lactobacillus salivarius*

Il gruppo *Lactobacillus salivarius* comprende attualmente 25 specie, 11 delle quali sono state identificate solo negli ultimi anni: *Lactobacillus aquaticus*, *Lactobacillus cacaonum*, *Lactobacillus ceti*, *Lactobacillus ghanensism*, *Lactobacillus sucicola*, *Lactobacillus hordei*, *Lactobacillus hayakitensis*, *Lactobacillus capillatus*, *Lactobacillus uvarum*, *Lactobacillus pobuzihi* e *Lactobacillus oeni*. Il gruppo è stato diviso inizialmente in due sottospecie: *Lactobacillus salivarius* var. *salicinus* e *Lactobacillus salivarius* var. *salivarius* (Salveti et al., 2012). Sono microrganismi che colonizzano la saliva umana, la mucosa intestinale e le feci (Heilig et al., 2002; Ahrne et al., 1998).

1.2.2.1.3 Gruppo *Lactobacillus reuteri*

Il gruppo *Lactobacillus reuteri* è composto da 15 specie (Felis e Dellaglio, 2007). *Lactobacillus alvi* e *Lactobacillus equigenerosi* sono quelle aggiunte più recentemente (Salveti et al., 2012). Questo gruppo è costituito prevalentemente da eterofermentanti obbligati. La specie *Lactobacillus reuteri* colonizza il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali e produce reuterina a partire dal glicerolo, un potente antimicrobico in grado di inibire la crescita di Gram positivi e Gram negativi, così come di lieviti, funghi e protozoi (Talarico et al., 1989). Nonostante la maggior parte dei LAB che formano la microflora vaginale appartengano a *Lactobacillus acidophilus*, fa parte del gruppo *Lactobacillus reuteri* la specie *Lactobacillus vaginalis*. Recentemente, questa specie è oggetto di studio per il suo potenziale probiotico negli alimenti di genere (Siroli et al., 2017).

1.2.2.1.4 Gruppo *Lactobacillus plantarum*

Le specie appartenenti al gruppo *Lactobacillus plantarum* colonizzano numerose nicchie ambientali, inclusi i prodotti lattiero caseari, la carne e vegetali. Per questo, sono tra i microrganismi responsabili del deterioramento dei prodotti alimentari come carne (Borcha et al., 1997), succo d'arancia (Alwazeer et al., 2002) o vino (Beneduce et al., 2004). Le specie di questo gruppo sono annoverate anche tra quelle costituenti la microflora del tratto gastrointestinale animale e umano. Inizialmente, facevano parte di questo gruppo solo tre specie: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus pentosus* (Felis e Dellaglio, 2007). A queste sono state aggiunte *Lactobacillus fabifermentans* e *Lactobacillus xiangfangensis* (Salveti et al., 2012). I membri di questo gruppo sono tutti eterofermentanti facoltativi. Il *Lactobacillus plantarum* è caratterizzato dalla produzione di un metabolita con proprietà antimicrobiche, chiamato plantaricina. Questa è in grado di modificare

il pH dell'ambiente e agisce contrastando i batteri patogeni intestinali.

1.2.2.1.5 Gruppo *Lactobacillus casei*

Lactobacillus rhamnosus, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* sono le specie più rilevanti nell'ambito dei probiotici. In particolare, è stato provato che la specie *Lactobacillus casei* diminuisca la durata delle infezioni da Rotavirus, che causa generalmente gastroenterite virale nei bambini, riduce l'incidenza di ricaduta nei casi di diverticolite e previene i disturbi intestinali, contribuendo a limitare la produzione delle tossine e inattivando molti composti cancerogeni che si formano nell'intestino. Inoltre, *L. casei* favorisce l'aumento della produzione dell'immoglobulina A e produce un'elevata quantità di acido lattico L (+), riducendo anche i problemi dovuti all'intolleranza al lattosio (Salminen et al., 1996). Il gruppo *Lactobacillus casei* è stato riclassificato numerose volte. Nel 1989, Collis et al. suggerirono *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* come unici membri del gruppo. Dellaglio et al. (1991) e Dicks et al. (1996) proposero l'esclusione di *Lactobacillus paracasei*.

1.2.2.2 Il genere *Streptococcus*

Il genere *Streptococcus* racchiude più di 60 specie, alcune note per la loro patogenicità. Questo genere è stato tra i primi ad essere studiato, perché è spesso causa dello sviluppo di malattie nell'uomo e negli animali. Il genere *Streptococcus* presenta microrganismi Gram positivi, immobili, che non possiedono l'enzima catalasi e sono omofermentanti. La sola specie utilizzata nell'industria alimentare è *Streptococcus thermophilus*, questa infatti ha un ruolo centrale nella produzione dei prodotti lattiero caseari. I ceppi appartenenti a questa specie sono "generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS)" e sono utilizzati come colture starter nella fermentazione dello yogurt, insieme a *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. In particolare, *Streptococcus thermophilus* produce acido formico, che stimola la crescita del lattobacillo.

Quest'ultimo, oltre a produrre i composti aromatici che concorrono a determinare il tipico flavour dello yogurt, svolge una spiccata attività proteolitica che permette allo streptococco di crescere nel latte (Holzapfel et al., 1997).

1.2.2.3 Il genere *Bifidobacterium*

Il genere *Bifidobacterium* fa parte della classe *Actinobacteria*, della sottoclasse *Actinobacteridia*, dell'ordine *Bifidobacteriales* e della famiglia *Bifidobacteriaceae*. Nonostante sia tradizionalmente inserito tra i LAB per il suo utilizzo nei prodotti alimentari e per la sua importanza nella nutrizione umana, questo genere è filogeneticamente lontano dai batteri lattici in senso stretto, ovvero quelli facenti parte dell'ordine *Lactobacillales* (Garrity et al., 2004). Il genere *Bifidobacterium* comprende 44 specie e 9 sottospecie. I bifidobatteri sono stati classificati per la prima volta nel 1957 (Dehenert), suddivisi in cinque gruppi secondo le caratteristiche morfologiche e secondo la capacità di ciascuno di fermentare 24 zuccheri. Felis e Dellaglio (2007) divisero questo genere in gruppi: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pullorum*, *Bifidobacterium boum*, *Bifidobacterium pseudolongum* e *Bifidobacterium asteroides*. I bifidobatteri sono Gram positivi, immobili, non sporigeni e non filamentosi. Si presentano di forma bastoncellare a Y o V, compresi tra 2 e 5 µm, singoli o in aggregati. Sono catalasi negativi (a parte le eccezioni di *Bifidobacterium indicum* e *Bifidobacterium asteroides* che sviluppano l'enzima se crescono in presenza di ossigeno), quindi anaerobi. Possiedono un metabolismo di tipo fermentativo e sono chemiorganotrofi. La fermentazione coinvolge l'enzima fruttosio-6-P-fosfochetolasi, attraverso il pathway metabolico sono prodotti acido lattico e acido acetico in rapporto 2:3 (Kandler, 1983). I bifidobatteri presentano un contenuto di guanina e citosina che oscilla tra 42 e 67% (Biavati and Mattarelli, 2001). Per quanto riguarda le condizioni di crescita, questo genere presenta un'elevata variabilità tra le specie

in termini di richieste nutrizionali, ad esempio, alcuni sono in grado di sintetizzare vitamine come tiamina, acido nicotinico, acido folico vitamina B12 e piridossina, mentre devono di introdurre riboflavina dall'ambiente (Deguchi et al. 1985); molte specie necessitano di sali di ammonio come fonte azotata (Hassinen et al. 1951), mentre alcune sono dotate di attività ureasica, quindi richiedono urea (Crociani e Matteuzzi, 1982). Il pH ottimale per la crescita è tra 6 e 7, sono acidotolleranti, ma non acidofili. La temperatura ottimale si trova tra 36 e 38 °C. I bifidobatteri colonizzano il tratto gastrointestinale di diversi animali, tra cui l'uomo. In particolare, sono stati identificati all'interno delle feci dei neonati lattanti *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* spp. *infantis*, *Bifidobacterium breve* spp. *parvulorum* e *Bifidobacterium longum*, che utilizzano come fonti carboniose gli zuccheri costituenti il colostro di cui si nutre l'ospite. Nell'adulto le specie più diffuse sono *Bifidobacterium adolescentis* e *Bifidobacterium longum* (Mitsuoka, 1984). Recentemente le specie di *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium infantis* sono state accorpate sotto al nome di *Bifidobacterium longum*, a seguito del riconoscimento di tre biotipi: *infantis*, *longum* e *suis* (Sakata et al., 2002). Le specie più utilizzate come probiotici sono *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium adolescentis* (Holzapfel et al., 2001).

1.3 I lattobacilli vaginali ad uso probiotico

1.3.1 La microflora vaginale

Indagando gli effetti dei probiotici sull'uomo, l'attenzione è stata tradizionalmente posta sul loro ruolo nella difesa e nel mantenimento del benessere gastrointestinale. Recentemente, si è sviluppato un interesse crescente nei confronti delle interazioni tra probiotici e microbioma vaginale. I microrganismi costituenti la microflora vaginale sono importanti sia per la preservazione dello stato di salute della donna, sia per la creazione di un ambiente favorevole nelle fasi di concepimento, essenziale per lo sviluppo di gravidanze sane. In particolare, sono state isolate delle comunità microbiche provenienti da nicchie precedentemente ritenute sterili, come seno, utero, tube di Falloppio e placenta, a conferma del ruolo fondamentale rivestito dalla flora endogena nel mantenimento del benessere femminile (Younes et al., 2017).

Per approfondire l'aspetto microbico dell'ecosistema vaginale, è necessario considerare, innanzitutto, l'ambiente in cui sviluppa naturalmente la flora batterica. Esso è costituito da un epitelio pluristratificato, squamoso e non cheratinizzato, il cui spessore è determinato dalla presenza di estrogeni. Questi ormoni controllano anche le secrezioni vaginali, composte per la maggior parte da 90-95% di acqua, sali organici e inorganici, mucina, urea, carboidrati, acidi grassi, albumine, lisozima, leucociti e immunoglobuline. Il pH vaginale si trova tra 4.0 e 4.5; l'elevata acidità è un fattore di selezione delle specie microbiche in grado di colonizzare questa nicchia ecologica. Sono le cellule epiteliali stesse a produrre acidi grassi, incluso l'acido lattico, contribuendo a mantenere un ambiente acido.

Il primo studio riguardante il microbiota vaginale risale al 1982 e venne svolto da Döderlein. All'epoca, si ipotizzò che questo microbioma fosse composto unicamente da lattobacilli, ma oggi è appurato che vi coesistono molti più generi batterici. Attualmente, i lattobacilli di Döderlein fanno parte del genere

Lactobacillus, sotto il nome di *Lactobacillus acidophilus* (Redondo-López et al., 1990). Numerosi studi hanno dimostrato che il microbiota vaginale delle donne in salute è formato sia da microrganismi aerobi che anaerobi, inoltre, la composizione della flora vaginale si modifica secondo la successione degli stadi dello sviluppo femminile. Durante la fase perinatale, gli estrogeni di derivazione materna inducono un ispessimento dell'epitelio vaginale, nelle cui cellule viene depositato glicogeno. Questo composto viene poi rilasciato durante l'esfoliazione delle cellule epiteliali, favorendo lo sviluppo di microrganismi in grado di fermentare il glucosio. Gli estrogeni vengono metabolizzati in fase postnatale, ciò causa un assottigliamento dell'epitelio della mucosa, andando a ridurre i microrganismi sviluppati in precedenza. Si crea, quindi, una nicchia ecologica ricca di aerobi e anaerobi facoltativi (Gregoire et al., 1971; Paavonen, 1982). I batteri anaerobi Gram negativi del genere *Veillonella*, *Bacteriodes* e *Fusobacterium*, alcuni anaerobi Gram positivi come *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Actinomyces* e *Bifidobacterium*, ed alcuni batteri aerobi come *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus viridans*, dominano l'ambiente vaginale durante l'infanzia. Nelle ragazze in fase prepuberale, i microrganismi presenti in quantità minore sono i lattobacilli, *Gardnella vaginalis* e *Prevotella bivia* (Randelovic et al., 2012). Nel momento in cui inizia la pubertà, grazie all'azione degli estrogeni, l'epitelio vaginale si ispessisce e i batteri in grado di fermentare il glucosio colonizzano di nuovo l'ambiente. La microflora vaginale, in questa fase, è simile a quella che caratterizza la donna adulta, in cui i lattobacilli sono predominanti (da 10^7 a 10^8 UFC). In Figura 4 sono riassunti gli aspetti principali che caratterizzano l'ambiente vaginale in ogni fase dello sviluppo. La microflora vaginale subisce frequenti variazioni anche durante il periodo mestruale, infatti, una certa specie può prevalere sulle altre a rotazione; al contrario, in menopausa la popolazione microbica risulta essere molto stabile, subendo poche variazioni in termini di equilibrio tra le varie specie. Nella donna in età fertile, sono

rappresentativi soprattutto *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* e *Lactobacillus iners*. In menopausa, a dominare il microbioma vaginale sono *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners*, *Gardnerella vaginalis* e specie dei generi *Prevotella*, *Candida*, *Gemella*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium* e *Mobiluncus* (Gupta et al., 2006).

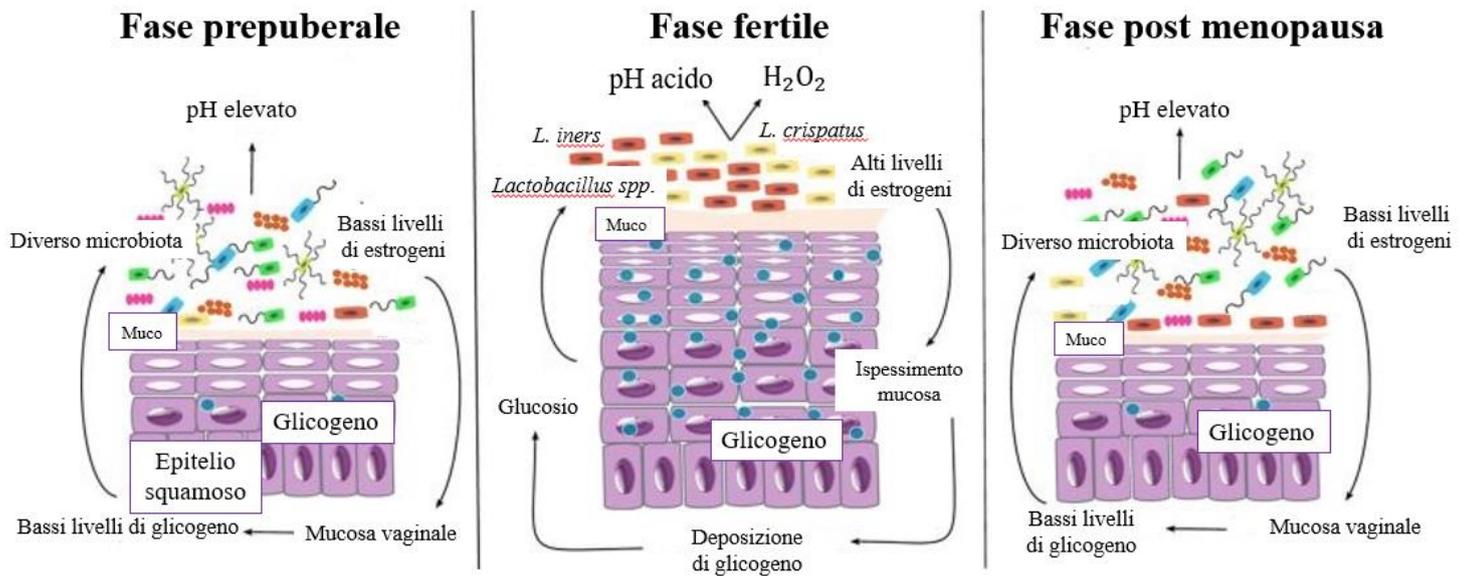


Figura 4: principali caratteristiche dell'ambiente vaginale e della microflora nelle fasi: prepuberale, fertile, post menopausa.

Oltre alla fase dello sviluppo in cui la donna si trova e al periodo mestruale, l'ecosistema vaginale può essere influenzato, anche se in misura minore, da fattori genetici e culturali (in termini di differenti pratiche igieniche che possono favorire determinati ceppi, piuttosto che decimarne altri). Le donne caucasiche presentano soprattutto colonie di *Lactobacillus crispatus*, mentre quelle ispaniche o africane sono colonizzate maggiormente da *Lactobacillus iners* (Ravel et al., 2011).

In generale, le specie di *Lactobacillus* che costituiscono la microflora vaginale si sono adattate per vivere nell'ambiente, presentando meccanismi metabolici differenti rispetto ai lattobacilli che normalmente colonizzano l'intestino; ad esempio, sono in grado di produrre proteine da stress o presentano geni che

codificano per il sistema tossina e antitossina (Macklaim et al., 2011). Inoltre, i lattobacilli vaginali presentano un genoma a minor contenuto di citosina e guanina e di dimensioni inferiori rispetto ai LAB che colonizzano i prodotti lattiero caseari e il tratto gastrointestinale. Questo permette di ipotizzare che essi abbiano sviluppato un adattamento di maggiore dipendenza dall'ospite rispetto alle specie di *Lactobacillus* che colonizzano altri ambienti. In particolare, i geni che codificano per il metabolismo e il trasporto di amminoacidi, coenzimi, nucleotidi, metaboliti secondari e lipidi risultano meno espressi nei LAB vaginali; al contrario, sono sovraespressi quelli implicati nel trasporto delle vescicole, nei meccanismi di sintesi dei ribosomi, nella divisione cellulare e nella sintesi proteica (Mendes-Soares et al., 2014).

1.3.1.1 Mantenimento dell'equilibrio della microflora vaginale

Il mantenimento dell'eubiosi vaginale, ovvero dell'equilibrio delle specie microbiche che colonizzano questo ambiente, è dovuto all'elevata presenza di lattobacilli. Le specie di *Lactobacillus* promuovono il benessere e la salute dell'ospite, inibendo la colonizzazione da parte di patogeni e prevenendo le infezioni genitali (Reid et al., 1996). In particolare, i microrganismi responsabili delle vaginosi batteriche sono ceppi appartenenti ai seguenti generi: *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Mobilincus*, *Sneathia*, *Leptotrichia*, *Mycoplasma* e *Clostridiales* (Onderdonck et al., 2016). I meccanismi tramite cui i LAB vaginali ostacolano lo sviluppo dei patogeni sono di varia natura:

1. Effetto barriera

I lattobacilli vaginali sono in grado di formare colonie che aderiscono alle cellule dell'epitelio vaginale, generando una barriera fisica che impedisce l'adesione dei patogeni, oltre che di interagire con i recettori cellulari.

L'adesione dei lattobacilli alle cellule epiteliali è mediata da carboidrati e glicoproteine (Andreu et al., 1995). È stato dimostrato che i LAB vaginali interferiscono con la colonizzazione, svolta dai batteri uropatogeni, delle cellule dell'epitelio vaginale *in vitro* (Chan et al., 1985; Reid et al., 1993). Per esempio, è stato osservato che i lattobacilli competono con *Candida albicans* e *Gardnerella vaginalis* per i recettori delle cellule vaginali. Per questi ultimi, i LAB presentano una maggiore affinità rispetto ai patogeni, che permette loro di contrastare la colonizzazione da parte di specie antagoniste (Boris et al., 2000). I patogeni di cui i LAB limitano la proliferazione, impedendone l'adesione al tessuto, sono *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Trichomonas vaginalis* e *Staphylococcus aureus* (Zarate et al., 2006).

2. Produzione di composti antimicrobici

I LAB rilasciano principalmente perossido di idrogeno, acido lattico e batteriocine che inibiscono lo sviluppo di altri microrganismi. La maggior parte dei lattobacilli vaginali è in grado di produrre e rilasciare H₂O₂, che svolge un'azione antimicrobica nei confronti dei patogeni *in vitro* e può aumentarne la sensibilità agli antibiotici. Ancora non è chiaro lo specifico meccanismo battericida *in vivo*, ma, sicuramente, questo composto contribuisce a proteggere l'ambiente vaginale (Sgibnev et al., 2016). Ad esempio, il perossido di idrogeno limita la proliferazione eccessiva di *Gardnerella vaginalis*, una delle principali cause di vaginosi batterica (Eschenbach et al., 1989). Le batteriocine sono definite come “sostanze prodotte dai batteri, di natura proteica, in grado di inibire lo sviluppo di ceppi della stessa specie o di specie filogeneticamente vicine” (Tagg et al., 1976). La produzione di queste molecole procura al LAB un vantaggio competitivo, utile per la colonizzazione dell'ecosistema vaginale. I lattobacilli vaginali possono produrre anche delle sostanze simili alle batteriocine, in termini di effetto antagonista verso le altre specie microbiche.

Queste agiscono in modo più generico rispetto alle batteriocine, inibendo sia funghi che Gram positivi e negativi (McGroarty et al., 1988).

3. Attività immunomodulante

I probiotici sono in grado di svolgere un'azione immunomodulante, inducendo la produzione di cellule immunocompetenti; queste sono in grado di scatenare una risposta immunitaria cellulare, in particolare, i linfociti T, e di produrre anticorpi, detti linfociti B.

Nel caso specifico di batteri lattici vaginali, la presenza di *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus jensenii* causa la riduzione della quantità di citochine ad attività proinfiammatoria, come IL-1 α e IL-8 (Kyongo et al., 2012). Nelle donne affette da batteriosi vaginale, la quantità di citochine IL-1 β è elevata, mentre quella di SLPI (Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor), un peptide antimicrobico, tende a diminuire. *Gardnerella vaginalis* agisce stimolando l'aumento della produzione delle citochine (IL-1 β , IL-8 e IL-6) e di sostanze antimicrobiche (come le defensine), stimolando la risposta proinfiammatoria (Mitchell e Marrazzo, 2014). Un altro esempio di questo tipo è rappresentato da *Lactobacillus iners*, che innalza la produzione di proteine SLPI, che hanno una spiccata attività contro il virus HIV (Nikolaitchouk et al., 2008). *Lactobacillus iners* ATCC 5195 svolge una funzione regolatoria dei PRR (Pattern-recognition receptors), implicati nelle funzioni fagocitosi ed endocitosi (Doerflinger et al., 2014).

1.3.1.2 Azione dell'acido lattico

I lattobacilli vaginali fermentano glucosio e maltosio, i prodotti della scissione del glicogeno da parte dell'enzima α -amilasi, rilasciando acido lattico (Spear et al., 2014). La produzione di questo composto contribuisce a mantenere acido il pH dell'ambiente, contrastando la proliferazione microbica di *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*,

Chlamydia trachomatis, virus HSV-2, causa dell'herpes genitale di tipo 2, e HIV-1 (Conti et al., 2009; Graver et al., 2001). Questo composto risulta essere il composto con maggiore azione antimicrobica, rispetto agli altri prodotti dai LAB. In normali condizioni di equilibrio, la microflora vaginale è formata soprattutto da ceppi del genere *Lactobacillus*, in particolare, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus jensenii*. Nel momento in cui si manifesta una disbiosi, il carico di lattobacilli subisce una notevole riduzione, portando allo sviluppo di una vaginosi batterica (Ravel et al., 2011). A seconda della specie che domina la flora vaginale, vengono raggiunti differenti livelli di acidità. In particolare, *Lactobacillus crispatus* è il maggiore produttore di acido lattico, seguito da *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii* e *Lactobacillus gasseri*.

- **Attività antibatterica**

L'acido lattico rilasciato nell'ambiente vaginale si presenta sia come isomero L che D; anche le cellule del tessuto epiteliale producono una percentuale di acido L-lattico, inferiore al 15% (Boskey et al., 2001). *Lactobacillus jensenii* produce unicamente l'isomero D, al contrario, *Lactobacillus iners* genera solo acido L-lattico, mentre *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus crispatus* possono generare entrambi i tipi di molecola. Alcuni studi hanno dimostrato che l'elevata protezione esercitata da *Lactobacillus crispatus* nei confronti degli uropatogeni è dovuta alla maggior efficacia dell'isomero D rispetto a quello L (Witkin et al., 2013). L'acido lattico protonato, ovvero la forma in cui si presenta a pH vaginale, è in grado di entrare nelle cellule batteriche senza richiedere l'azione del recettore che lega il lattato (GPR81), né dei trasportatori monocarbossilati (Ahmed et al., 2008). Una volta all'interno del citosol, l'acido lattico acidifica l'ambiente e interferisce con le normali funzioni cellulari, causando la morte della cellula batterica (Alakomi et al., 2000). Un esempio della capacità protettiva dei lattobacilli è rappresentato dall'azione contro *Candida albicans* e

Streptococcus di gruppo B, che possono causare rispettivamente candidosi vulvovaginali, morbilità e mortalità neonatale (Masey et al., 2008). Nonostante gli streptococchi del gruppo B siano produttori di acido lattico e acidotolleranti, i lattobacilli generano una quantità maggiore di questo composto e, abbassando il pH, lo rilasciano in forma protonata, inibendo lo sviluppo di questi patogeni (De Gregorio et al., 2014).

- **Attività virucida**

Studi recenti hanno dimostrato che la probabilità di sviluppare il virus HIV (Virus dell'Immunodeficienza Umana), trasmesso dal partner maschile, è inferiore nelle donne con microflora vaginale ricca di LAB. Inoltre, una prevalenza di LAB vaginali in donne già affette AIDS (Sindrome da Immunodeficienza Acquisita) può ridurre la capacità di trasmettere il virus al partner o al neonato durante il parto (Taha et al., 1998). L'acido lattico risulta possedere una capacità virucida verso HIV-1 quantitativamente maggiore e più rapida, rispetto a quella esercitata da HCl e acido acetico nello stesso mezzo (Aldunate et al., 2013). Entrambi gli isomeri contrastano il virus, sebbene l'acido L-lattico sia 17 volte più attivo contro il ceppo Ba-L. L'attività virucida, come quella antimicrobica, è espletata dalla forma protonata dell'acido lattico. L'inattivazione di HIV-1 è irreversibile, ma non conduce alla distruzione del virus né alla perdita della proteina di membrana gp120, una glicoproteina essenziale per l'infezione delle cellule ospiti, che si trova sulla superficie del virione. Questo suggerisce che l'inattivazione avvenga grazie all'unione di più fattori, che agiscono direttamente contro il funzionamento delle proteine virali, e indirettamente danneggiando l'integrità dei lipidi formanti il capsido (Lai et al., 2009). La presenza di LAB vaginali produttori di acido lattico abbassa anche il tasso di incidenza del virus dell'herpes simplex (HSV-1 e HSV-2). Infatti, i lattobacilli inibiscono il virus sia diminuendo la capacità di adesione alla membrana cellulare dell'ospite, sia bloccandone l'entrata e la replicazione

nella cellula, attraverso l'effetto antagonista svolto dall'acido lattico (Conti et al., 2009).

1.3.2 I probiotici come prevenzione e cura delle disbiosi vaginali

I disturbi ginecologici dovuti a disbiosi del microbiota vaginale, che colpiscono frequentemente le donne in età fertile, possono portare a vaginosi batteriche, a candidosi vulvovaginali e a vaginiti arobiche, oltre che a malattie sessualmente trasmissibili (Workowski e Berman, 2010). Come già precedentemente sostenuto, la vaginosi batterica è caratterizzata dalla riduzione delle colonie di *Lactobacillus*, che normalmente dominano l'ecosistema vaginale nella donna sana, e ad un aumento dei batteri anaerobi patogeni. Nel caso della vaginite aerobica, i lattobacilli sono sostituiti da enterococchi e streptococchi come, ad esempio, *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*. Infine, la candidosi vulvovaginale è causata da un'infezione dovuta ai lieviti, soprattutto da *Candida albicans* (30-35% dei casi) (Green et al., 2105). Il trattamento di queste patologie con la somministrazione di batteri probiotici può ristabilire il normale equilibrio della microflora, contribuendo al processo di guarigione.

Grazie alle proprietà benefiche dimostrate *in vitro*, i ceppi di *Lactobacillus* più utilizzati per questo scopo appartengono alle specie di *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus fermentum* (Hutt et al., 2016). Studi recenti hanno dimostrato che *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus vaginalis* e *Lactobacillus gasseri* sono in grado di svolgere un'azione anti-*Clamydia* e anti-*Candida* (Nardini et al., 2016; Parolin et al., 2015). I probiotici vaginali sono somministrati tramite capsule o tamponi per applicazione locale, contenenti i lattobacilli in forma liofilizzata; oppure, possono essere assunti per via orale, in un formato che ne permetta la sopravvivenza lungo il tratto gastrointestinale.

Oltre al microrganismo, può essere somministrato anche solo acido lattico per le sue proprietà antimicrobiche; spesso, il preparato è formato anche da glicogeno per stimolare anche la crescita dei lattobacilli già presenti (Andersch et al., 1986). Nella terapia delle vaginosi batteriche vengono spesso utilizzati probiotici formulati con uno o più ceppi di lattobacilli vaginali, a complemento del trattamento con antibiotici, oltre che per evitare che si ripresenti una disbiosi dopo la guarigione (Eriksson et al., 2005). Alcuni studi hanno dimostrato che i probiotici, assunti sia per via orale che applicati localmente, contribuiscono a ristabilire la salute di donne affette da diabete gestazionale, da infezioni batteriche e candidosi al tratto genito-urinario, oltre che da mastiti (Barrons e Tassone, 2008; Vazquez-Frenso et al., 2014; Tan et al., 2016). I LAB di origine vaginale sono tuttora studiati per identificare un metodo di somministrazione volto a massimizzare la loro azione probiotica. Oltre all'applicazione dei probiotici in preparati in grado di agire localmente, questi si possono somministrare anche per via orale, grazie alla loro capacità di passare dall'intestino al tessuto vaginale e di colonizzarlo; molti studi hanno dimostrato che questo ha un impatto positivo sul benessere dell'habitat vaginale e, quindi, sull'ospite (Vitali et al., 2012). L'efficacia di questi probiotici è stata indagata anche all'interno della matrice alimentare, per la produzione di alimenti funzionali. In particolare, un alimento funzionale è definito dalla Commissione sulla scienza degli alimenti funzionali in Europa (FUFLOSE) come “un prodotto che ha degli effetti benefici su una o più funzioni dell'organismo umano, apportando miglioramenti delle condizioni generali e fisiche o/e riducendo il rischio di sviluppare malattie. Deve presentarsi come alimento e deve esercitare il proprio effetto sulla base di un normale consumo”. Alcuni studi hanno dimostrato la capacità di questo tipo di alimento funzionale ad avere effetti positivi sulla flora vaginale e intestinale delle donne affette da HIV, oltre che di ridurre il tasso di malattie dell'apparato cardiovascolare in fase post menopausa e di migliorare la salute della pelle (Korzen-Bohr et al., 2006; Kimoto-Nira et

al., 2014; Farhangi et al., 2017). Tuttavia, condurre degli studi riguardanti i benefici dei probiotici sul benessere femminile è complesso per l'elevato numero di fattori implicati, come la scelta delle specie di *Lactobacillus* (anche non di origine vaginale), di diversi tipi di test e di campioni di popolazione (che spesso non sono omogenei), oltre che dall'incapacità di standardizzare il momento in cui si ritiene ristabilito lo stato di salute, ad esempio quando si definisce in remissione la vaginosi batterica (MacPhee et al., 2010).

1.3.3 Selezione e caratterizzazione dei batteri lattici vaginali ad uso probiotico

Come già riportato in precedenza, i probiotici hanno varie proprietà, come favorire l'equilibrio intestinale, la digestione e aumentare la biodisponibilità di certi nutrienti, oltre a stimolare il sistema immunitario. In particolare, facendo riferimento agli alimenti funzionali di genere, i lattobacilli probiotici agiscono per ristabilire l'equilibrio in caso di disbiosi vaginali. Le procedure per la selezione e la caratterizzazione di tali microrganismi sono le stesse utilizzate per gli altri probiotici. Gli studi riguardanti le basi della selezione di ceppi a maggior potenziale probiotico evidenziano che i microrganismi più efficaci per questo scopo sono di origine umana. Inoltre, è stato notato che un probiotico sviluppa e manifesta i propri effetti al massimo potenziale se inserito in un ambiente simile a quello da cui è stato isolato (Saarela et al., 2000).

Per poter essere applicati come probiotici nell'industria alimentare, i ceppi microbici devono presentare determinate proprietà di sicurezza, funzionalità e tecnologiche; queste sono riassunte in Tabella 3.

Parametri	Proprietà
Sicurezza	<ul style="list-style-type: none"> - Presenta una lunga storia di utilizzo sicuro negli alimenti - Non presenta virulenza, patogenicità e non produce tossine - Non trasferisce geni di antibioticoresistenza - Non causa infezione nei soggetti immunodepressi - Le attività metaboliche non producono composti dannosi per l'uomo - È sicuro anche nella fase successiva alla vendita
Funzionali	<ul style="list-style-type: none"> - Sopravvivenza nel tratto gastrointestinale - Adesione alle cellule del tessuto intestinale - Comprovati benefici sulla salute
Tecnologici	<ul style="list-style-type: none"> - Resistente ai fagi - Possibilità di processare, immagazzinare e produrre in larga scala il microrganismo

Tabella 3: caratteristiche di sicurezza, tecnologiche e funzionali che un ceppo deve presentare per essere utilizzato come probiotico

1.3.3.1 Proprietà di sicurezza

L'aspetto di sicurezza di un microrganismo utilizzato come probiotico, già affrontato nel paragrafo riguardante la definizione di probiotico, è il più importante e precede la determinazione della proprietà funzionali e tecnologiche. Il ceppo dev'essere ritenuto sicuro dall'EFSA per la sua applicazione alimentare, ovvero idoneo per il consumo umano; non deve produrre ammine biogene, composti cancerogeni, tossine, né spore. Queste ultime sono molto difficili da eliminare con trattamenti termici inferiori ai 100° C; il rischio per il consumatore risiede nella capacità della spora di generare una cellula vegetativa se posta in condizioni favorevoli, danneggiando l'ospite. Infine, il microrganismo non deve essere veicolo di trasferimento di geni di resistenza agli antibiotici (Capurso, 2016). EFSA impone anche un riconoscimento tassonomico del microrganismo che si vuole selezionare come probiotico, in quanto esistono numerose differenze tra i ceppi all'interno di una

stessa specie. Se un ceppo è riconosciuto come probiotico, non necessariamente tutti i microrganismi che appartengono alla stessa specie sono probiotici.

1.3.3.2 Proprietà funzionali

Per determinare se un microrganismo probiotico è in grado di esplicare le proprie proprietà benefiche sull'organismo vengono svolti specifici test *in vitro*, seguiti da studi sull'uomo, per determinare l'effettiva presenza di determinate caratteristiche funzionali. Devono essere considerati vari aspetti per la selezione di un probiotico:

1. Resistenza in ambiente acido e alla bile

È fondamentale che i probiotici giungano vivi e vitali fino all'intestino. Questo implica che, a seguito dell'assunzione per via orale, i ceppi siano in grado di sopravvivere nel passaggio attraverso lo stomaco, al contatto con il succo gastrico. Inoltre, la resistenza alla bile rappresenta un importante parametro per stabilire la capacità di sopravvivenza nell'intestino tenue (Fukushima et al., 1998). Risulta essenziale, quindi, che i LAB probiotici siano in grado di resistere in un ambiente acido (pH 3-4) e agli enzimi presenti nello stomaco, nel duodeno e nell'intestino tenue. Per testare la resistenza dei ceppi probiotici *in vitro*, i test prevedono il contatto con soluzioni a diversa concentrazione di bile, per indagarne successivamente la vitalità; inoltre, si mettono in atto degli studi di digestione gastrica duodenale simulata per verificare la sopravvivenza dei ceppi probiotici in ogni fase del percorso digestivo (Patrignani et al., 2019).

2. Adesione alle cellule epiteliali e persistenza nel tratto gastrointestinale

Uno dei requisiti più importanti, affinché un microrganismo possa apportare beneficio all'organismo ospite, è la capacità di colonizzare il tratto gastrointestinale. I batteri che presentano maggiore capacità di adesione, hanno elevata probabilità di manifestare a pieno gli effetti metabolici e

immunomodulatori; legandosi alle cellule dell'epitelio intestinale hanno, infatti, possono persistere più a lungo nel tratto intestinale, rispetto ai ceppi non adesi (Salminen et al., 1996). Inoltre, l'adesione promuove il contatto dei probiotici con il tessuto linfoide associato all'intestino, facilitando le interazioni con il sistema immunitario, sia a livello locale che sistemico. I ceppi con capacità di adesione risultano essere anche maggiormente idonei all'esclusione competitiva dei patogeni dal tessuto intestinale. Tuttavia, è necessario ricordare che LAB ampiamente utilizzati come probiotici, il cui effetto benefico nell'uomo è stato già comprovato, possono manifestare una bassa capacità di adesione agli enterociti. Ad esempio, pochi ceppi di *Lactobacillus acidophilus* aderiscono all'epitelio intestinale, nonostante siano tra i probiotici più utilizzati.

I due parametri che si utilizzano per determinare la capacità di adesione di un ceppo microbico sono idrofobicità e autoaggregazione. Queste proprietà sono indipendenti tra loro, ma sono correlate all'attitudine ad aderire alle pareti della mucosa intestinale. L'adesione cellulare si può indagare anche direttamente *in vitro*, utilizzando cellule Caco-2 e linee cellulari HT-29 (Coconnier et al., 1993; Bernet et al., 1994). Queste sono in grado di differenziare in enterociti, quindi possono essere utilizzate come modello del tessuto epiteliale dell'intestino tenue (Tuomola e Salminen, 1998). Esiste una variante di HT-29, HT-29-MTX, in grado di produrre muco (il gel che ricopre il tessuto intestinale), che viene utilizzata per le prove di adesione cellulare insieme alle linee cellulari sopraccitate (Tuomola, 1999). Per effettuare dei test di adesione al tessuto intestinale *in vivo*, vengono svolte delle biopsie, tramite colonscopia, in soggetti che hanno assunto probiotici per un determinato periodo di tempo. Questo tipo di studio risulta più accurato nel definire la capacità di adesione di un particolare ceppo probiotico, tuttavia, presenta dei limiti dettati dall'etica (Alander et al., 1997; Johansson et al., 1993).

3. Proprietà immunomodulanti

Studi sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che i batteri probiotici svolgono un'azione positiva sul sistema immunitario dell'ospite, come precedentemente sostenuto, tramite l'adesione all'intestino e l'interazione con il tessuto linfoide ad esso associato. Nel caso specifico di batteri lattici vaginali, gli studi sia *in vivo* che *in vitro*, riguardano la loro capacità di stimolare la produzione di citochine ad azione proinfiammatoria, che aumentano le difese dell'ospite contro i microrganismi patogeni. Per comprendere questo fenomeno, si tiene traccia della produzione di citochine modello, ritenute importanti marcatori biologici nei casi di infiammazione, piuttosto che di salute, dell'ambiente vaginale. Ad esempio, si considerano IL-8, IL-1RA e IL-1 come biomarkers indicativi di eubiosi vaginale (Fichorova et al., 2011 e 2015). Sebbene lo studio di questi marcatori biologici sia indicativo della capacità dei probiotici di influenzare la risposta immunitaria, ci sono numerose variabili che interagiscono all'interno del tratto genitale, una fra le più importanti è dovuta alle modificazioni fisiologiche che si susseguono nella donna (gravidanza, utilizzo di contraccettivi o ciclo mestruale).

4. Attività antimicrobica

I probiotici svolgono un'azione contro i patogeni attraverso esclusione competitiva e produzione di composti antimicrobici. Alcuni ceppi sono in grado di produrre batteriocine, che, tuttavia, sono composti in grado di inibire solo le specie filogeneticamente vicine alla specie produttrice. I microrganismi possono anche produrre perossido di idrogeno, acido lattico, acido acetico ed altri composti aromatici; questi hanno potere antimicrobico verso un più ampio spettro di microrganismi. La capacità di esclusione competitiva e di produzione di sostanze antimicrobiche contro i patogeni viene testata valutando *in vitro* gli aloni di inibizione, questo dopo aver messo a contatto la coltura probiotica con quella patogena, tramite piastramento. Ad esempio, è stata valutata la capacità

inibitoria di alcuni ceppi di LAB vaginali verso *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis* e *Listeria monocytogenes*. La maggior parte dei batteri lattici ha dimostrato attività antimicrobica contro i patogeni responsabili delle infezioni al tratto urinario e vaginale. In particolare, i ceppi più attivi appartengono alle specie di *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus crispatus* (Siroli et al., 2017).

5. Capacità di deconiugare i sali biliari

La bile permette di digerire e assorbire i grassi introdotti attraverso la dieta. A partire dal colesterolo, gli epatociti sono in grado di sintetizzare gli acidi biliari primari, che sono coniugati con taurina o con glicina prima di essere secreti, formando i sali biliari. Alcuni probiotici sono in grado di produrre un enzima, BHS (bile salt hydrolase), che idrolizza i sali biliari separando l'amminoacido dall'anello steroideo. Questo enzima è presente in varie specie batteriche che colonizzano il tratto gastrointestinale e genitale. Il metodo che si utilizza *in vitro* per determinare la capacità di deconiugare i sali biliari prevede l'utilizzo di piastre Petri con agar, in cui vengono seminati i ceppi e messi a contatto con i sali. Se dopo un determinato tempo di incubazione si forma un precipitato bianco opaco intorno alle colonie, significa che, a partire dall'acido taurocolico, taurochenodesossicolico o taurodesossicolico, si sono formati rispettivamente colato, chenodesossicolato o desossicolato (Corzo e Gilliland, 1999). L'attività dell'enzima BHS può ridurre il quantitativo di colesterolo assunto dall'ospite, in quanto i sali biliari deconiugati sono assorbiti più difficilmente rispetto a quelli coniugati, oltre ad essere meno efficienti nel promuovere la solubilizzazione e l'assimilazione dei lipidi nel lume intestinale. Un probiotico che presenta l'enzima BHS ha più probabilità di resistere e colonizzare l'intestino, oltre che apportare beneficio all'ospite. I LAB maggiormente utilizzati negli alimenti non sono in grado di deconiugare i sali biliari, tuttavia, questo non preclude

l'importanza del ruolo che rivestono come probiotici (Begley et al., 2006).

1.3.3.3 Proprietà tecnologiche

Una volta accertata la sicurezza dei ceppi e determinati gli aspetti funzionali, la priorità è rappresentata dalla definizione delle proprietà tecnologiche. Le principali variabili da tenere in considerazione sono molteplici, innanzitutto, il ceppo deve essere in grado di sopravvivere al processo industriale di preparazione dell'alimento. Questo implica la capacità di resistere ai fagi e alle basse temperature, sia di refrigerazione che di congelamento, in fase di stoccaggio. Se si utilizza un ceppo probiotico come starter o co-starter, questo deve fermentare il substrato in modo efficiente e non causare arresti della fermentazione, per ottenere un prodotto qualitativamente accettabile (Saarela et al., 2000). Dal momento in cui il probiotico si trova nell'alimento, deve mantenersi vivo e vitale fino al momento del consumo, per tutta la durata della shelf life; in particolare, la vitalità, alla data di scadenza del prodotto, deve essere pari ad almeno 10^6 - 10^7 UFC/g. Infine, il microrganismo considerato dev'essere compatibile con le caratteristiche organolettiche dell'alimento, ovvero non produrre off-flavours, ma piuttosto arricchire in positivo gli attributi sensoriali del prodotto (Patrignani et al. 2007). Lo studio svolto da Siroli et al. (2017), rappresenta uno degli esempi più recenti di caratterizzazione tecnologica di batteri vaginali, finalizzato all'applicazione di questi probiotici in prodotti lattiero caseari. Sono state valutate le proprietà tecnologiche di 17 ceppi di *Lactobacillus*, appartenenti alle specie di *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus vaginalis*. Dopo aver determinato le proprietà antagoniste ed antimicrobiche dei ceppi, come già evidenziato nel paragrafo relativo agli attributi funzionali, è stata analizzata la cinetica di fermentazione dei LAB in latte pastorizzato e la vitalità a temperature di refrigerazione. Infine, è stato valutato il profilo volatile, attraverso gascromatografia abbinata a spettrometro di massa, per identificare le molecole

aromatiche prodotte dai vari ceppi e determinarne la compatibilità organolettica con il prodotto. È stato dimostrato che i lattobacilli hanno un'attitudine tecnologica limitata, in quanto non sono in grado di acidificare il latte al di sotto di pH 5.0, oltre che essere caratterizzati da una bassa capacità di sopravvivenza a temperature di refrigerazione, con una riduzione di circa 2 log UFC/mL durante 28 giorni di stoccaggio. Questi due aspetti rendono i ceppi studiati poco idonei per l'applicazione come starter nei prodotti lattiero caseari. Tuttavia, potrebbero essere addizionati ad un'altra coltura starter, che conduca il processo fermentativo. Per quanto riguarda il profilo aromatico, è notevole la produzione di acido acetico, acido lattico e acidi organici a corta catena, a cui si deve una potente azione antimicrobica, oltre che diacetile, acetoino e acetaldeide, molecole volatili tipiche dello yogurt e dei latt fermentati. Questi risultati mostrano il potenziale dei ceppi considerati di contribuire a determinare un buon profilo organolettico del prodotto finale.

Gli studi riguardanti l'applicazione di lattobacilli vaginali in prodotti lattiero caseari sono tuttora innovativi, e per un loro utilizzo sarebbe necessario svolgere indagini ulteriori allestendo studi in vivo. Tuttavia i dati ottenuti fanno pensare ad un loro potenziale utilizzo per creare alimenti funzionali indirizzati al benessere femminile.

1.3.4 Esempio di applicazione di probiotici vaginali in prodotti lattiero caseari

Patrignani et al. (2019) hanno utilizzato un ceppo di *Lactobacillus crispatus* (BC4) per produrre squacquerone, un formaggio a pasta molle originario della Romagna. Questo prodotto rappresenta un alimento funzionale, in grado di manifestare effetti benefici sulla salute femminile. In particolare, lo scopo della ricerca è stato quello di proporre un'alternativa ai preparati nutraceutici o farmacologici contenenti probiotici. Il probiotico è stato inoculato come coltura

aggiuntiva a quella starter (*Streptococcus thermophilus*), il formaggio è stato, quindi, conservato a 4° C per un giorno, fino al raggiungimento di pH 5.15, poi per 18 giorni alla stessa temperatura. Inizialmente, il campione è stato sottoposto ad un'analisi microbiologica, che ha dimostrato una buona sopravvivenza del ceppo di *Lactobacillus crispatus* durante il periodo di stoccaggio, corrispondente a 7 UFC/g dopo 13 giorni di conservazione a temperature di refrigerazione. Questo dimostra la compatibilità di BC4 con la coltura utilizzata come starter e la conservazione di un carico cellulare idoneo durante la shelf life, per essere applicato come probiotico nell'alimento. L'attività dell'acqua del prodotto si è mantenuta costante, mentre il pH ha subito una diminuzione. In seguito, sono state valutate le capacità proteolitica e lipolitica di BC4 nello squacquerone, così come il profilo volatile e la texture, inoltre, sono stati svolti dei panel test per definire l'accettabilità organolettica del prodotto. È stato dimostrato che *Lactobacillus crispatus* influisce positivamente sul gusto, l'aroma, la cremosità e la texture dello squacquerone, attraverso l'attività lipolitica e proteolitica che svolge nel formaggio. È stata effettuata anche una simulazione di digestione gastrica duodenale *in vitro*, per testare la sopravvivenza del ceppo in condizioni simili a quelle *in vivo*. I dati raccolti hanno evidenziato la resistenza di BC4, sia nei confronti del succo gastrico, che della bile e del succo pancreatico.

Nonostante solo dei test *in vivo* possano confermare l'effettiva funzionalità dell'alimento, in termini di prevenzione e/o cura delle disbiosi vaginali, questo studio rappresenta il primo tentativo di creare uno squacquerone probiotico indirizzato al mantenimento del benessere femminile. L'innovazione risiede nell'utilizzo di un ceppo di *Lactobacillus crispatus* come probiotico in un alimento, una delle specie rappresentative della microflora vaginale in condizioni di salute, finora utilizzato solo nei preparati farmaceutici.

2. OBIETTIVI

2. Obiettivi

La mia tesi sperimentale si inserisce nell'ambito del progetto Alma Idea, volto alla selezione di un ceppo di *Lactobacillus* spp. di origine vaginale, da impiegarsi come coltura aggiuntiva per la formulazione di un alimento di genere in grado di contribuire al benessere femminile, prevenendo quindi l'insorgenza di eventuali infezioni senza rinunciare all'aspetto edonistico e, quindi, alla qualità organolettica e sensoriale dell'alimento stesso. Tuttavia, la selezione di una coltura microbica per la sua inclusione in una matrice alimentare non può prescindere dallo studio delle sue caratteristiche metaboliche, fisiologiche, funzionali, tecnologiche nonché da quelle legate alla sicurezza. Recentemente, uno studio condotto dal gruppo di microbiologia del campus di Cesena, ha evidenziato alcune importanti caratteristiche tecnologiche e di sicurezza di un pool di ceppi di lattobacilli, isolati da vagina di donna sana, di provata attività anti-Candida e con spiccate proprietà antimicrobiche anche verso patogeni di origine alimentare (Siroli et al., 2017). Questo studio ha messo in luce l'attitudine di ceppi di *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus vaginalis* e *Lactobacillus gasseri* a crescere in latte e a produrre specifici profili di molecole volatili; permettendo di selezionare alcuni ceppi nell'ambito delle specie considerate per la loro applicazione come colture aggiuntive nel settore lattiero caseario. Tuttavia, come sopra menzionato, per poter utilizzare queste colture per la formulazione di un alimento funzionale di genere è necessario selezionare ceppi anche di provata attività probiotica. Pertanto, in questo contesto, il principale obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di verificare sul pool di ceppi sopra menzionati alcuni importanti caratteri funzionali, quali la capacità di autoaggregazione, l'idrofobicità, la capacità di deconiugare i sali biliari, nonché la capacità di sopravvivere alla digestione gastrica duodenale simulata quando inoculati in latte conservato a 4°C. Inoltre, i ceppi considerati sono stati testati per la loro capacità ad aderire a cellule intestinali tipo Caco-2.

Le caratteristiche probiotiche considerate, sebbene condotte in vitro, sono considerate di fondamentale importanza per la selezione di ceppi ad uso probiotico. Ad esempio, la capacità di autoaggregazione e l'idrofobicità, sebbene indipendenti l'una dall'altra, possono rendere conto della successiva colonizzazione in ambiente intestinale da parte dei ceppi testati, così come le capacità adesive nei confronti di cellule Caco-2. D'altra parte, invece, la capacità di sopravvivere alla digestione gastrico simulata può dare informazioni importanti in merito alla capacità dei ceppi di resistere agli stress fisiologici che si presentano durante il processo digestivo.

3. MATERIALI E METODI

3. Materiali e metodi

3.1 Materiali

3.1.1 Ceppi microbici

Per la presente sperimentazione sono stati utilizzati 15 ceppi del genere *Lactobacillus*, appartenenti a tre specie altamente rappresentative dell'habitat vaginale (Parolin et al., 2015). Questi ceppi sono stati isolati da “tamponi vaginali ottenuti da donna caucasica tra i 18 e i 45 anni, che non presentava sintomi di infezioni vaginali o al tratto urinario” (Comitato Etico dell'Università di Bologna). I ceppi utilizzati sono riportati in Tabella 4.

<i>Lactobacillus crispatus</i>	BC1
	BC3
	BC4
	BC5
	BC6
	BC7
	BC8
	<i>Lactobacillus gasseri</i>
BC10	
BC11	
BC12	
BC13	
BC14	
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	BC16
	BC17

Tabella 4: Lattobacilli di origine vaginale utilizzati nella sperimentazione

3.1.2 Condizioni di crescita

Per permettere la crescita dei ceppi di *Lactobacillus gasseri*, di *Lactobacillus crispatus* e di *Lactobacillus vaginalis* è stato utilizzato il brodo de Man, Ragosa e Sharpe (MRS) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). Questo è un terreno di crescita non selettivo, in grado di soddisfare le elevate esigenze nutrizionali dei lattobacilli. La composizione del terreno è riportata in Tabella 5. Per la preparazione del brodo MRS, 52 g di preparato sono stati aggiunti a 1000 mL di acqua distillata. Il composto è stato poi sterilizzato a 121° C per 15 minuti in autoclave ed è stato aliquotato in provette sterili (15 mL). Le provette sono state inoculate a partire dal preparato liofilizzato, per poi essere inserite all'interno di giare per anaerobiosi da 2.5 litri (Anaerojar. Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). Per creare un ambiente anaerobico, sono stati utilizzati sacchetti AnaeroGen (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). I lattobacilli sono stati fatti crescere in queste condizioni, a 37° C per 24 ore.

Peptone	10.00 g/L
Estratto di carne	10.00 g/L
Estratto di lievito	5.00 g/L
Glucosio	20.00 g/L
Potassio fosfato bib.	2.00 g/L
Sodio acetato	5.00 g/L
Diammonio citrato	2.00 g/L
Magnesio solfato	0.20 g/L
Manganese solfato	0.05 g/L
Tween 80	1.00 mL

Tabella 5: Composizione del brodo MRS

3.2 Metodi

3.2.1 Valutazione della vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata tramite conta in piastra su terreno formato da 52 g/L di brodo MRS (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) addizionato di 18 g/L di Agar Technical (Agar no. 3) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). Dopo aver compiuto le diluizioni seriali a partire dal campione in provetta, precedentemente incubato a 37° C per 24 ore in condizioni anaerobiche, ogni piastra è stata inoculata con 100 µL. Le piastre, sempre seminate in duplicato, sono state conservate a 37° C per 48 ore, in anaerobiosi. Una volta terminato il periodo di incubazione nelle giare per anaerobiosi, è stata eseguita la conta delle colonie presenti.

3.2.2 Capacità di deconiugare i sali biliari

3.2.2.1 Acido taurodesossicolico

I sali biliari sono composti anfipatici prodotti dal fegato e rilasciati nel duodeno. Sono in grado di solubilizzare i lipidi e, per questo, rivestono un'importante funzione metabolica. L'acido taurodesossicolico è un sale biliare che si forma a partire da taurina e acido desossicolico. Attraverso la seguente procedura, è stato possibile valutare la presenza dell'enzima BHS nei lattobacilli di origine vaginale. Le piastre sono state preparate con MRS (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) addizionato di Agar Technical (Agar no. 3) (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), unito a 0.5 g/100 mL di acido taurodesossicolico (Taurodeoxycholic acid, sodium salt. Sigma, Milano, Italia) e a 0.37 g/L di CaCl₂.

3.2.2.2 Procedura

La capacità di deconiugare i sali biliari è stata indagata modificando la procedura di Mathara et al. (2008) ed è stata eseguita in triplicato. Le piastre

sono state inoculate con 100 μ L a partire dai ceppi cresciuti in brodo MRS (37° C per 24 ore, in anaerobiosi). In particolare, la semina su piastra è stata eseguita con striscio tramite ansa sterile. Le piastre sono state incubate in condizioni anaerobiche a 37° C per 48 ore, all'interno di giare per anaerobiosi. La capacità di deconiugare l'acido taurodesossicolico è stata valutata secondo la formazione di zone di precipitazione all'interno delle piastre Petri.

3.2.3 Autoaggregazione cellulare

La capacità di autoaggregazione delle cellule è stata analizzata attraverso il metodo di Mathara et al. (2008) e il test è stato eseguito in triplicato. I batteri sono stati fatti crescere in brodo MRS per 24 ore a 37° C, in condizioni di anaerobiosi. Le misurazioni, tramite spettrofotometro (modello 6705, Jenway. ST15 OSA, UK), sono state eseguite ad una lunghezza d'onda pari a 600 μ m. Inizialmente, sono stati prelevati 3 mL dalla provetta iniziale e inseriti in un falcon (15 mL). Il campione è stato poi centrifugato per separare le cellule dal brodo di coltura, a 60 000 RPM per 10 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 3 mL di soluzione fisiologica, utilizzando il vortex per 10 secondi. Immediatamente dopo la risospensione, sono stati prelevati 100 μ L e posti in una cuvetta con 900 μ L di fisiologica, per eseguire la prima misurazione dell'assorbanza. Una volta eseguita l'analisi al tempo 0, la capacità di autoaggregazione è stata misurata nell'arco di 5 ore a 37° C. In particolare, ogni ora, sono stati prelevati 100 μ L dalla sospensione e aggiunti a 900 μ L di soluzione fisiologica in una cuvetta. È stata, quindi, misurata l'assorbanza del campione ogni ora per cinque ore. La percentuale di autoaggregazione è espressa secondo la formula: $[1-(A_t/A_0)] \times 100$. A_t rappresenta la media dell'assorbanza ai tempi $t=1, 2, 3, 4, 5$ e A_0 l'assorbanza al tempo 0.

3.2.4 Idrofobicità

La capacità di aderire agli idrocarburi, ovvero l'idrofobicità dei ceppi presi in esame, è stata determinata secondo il metodo utilizzato da Vinderola e Reinheimer (2003). I batteri sono stati precedentemente fatti crescere in brodo MRS a 37° C per 24 ore, in condizioni anaerobiche. Il test è stato eseguito in triplicato. Le misurazioni dell'assorbanza con spettrofotometro (modello 6705, Jenway. ST15 OSA, UK), sono state eseguite ad una lunghezza d'onda pari a 560 µm. Dalla provetta contenente il campione, sono stati prelevati 3 mL e posti in un falcon da 15 mL. Questo è stato centrifugato a 60 000 RPM per 10 minuti ed è stato eliminato il surnatante. Il pellet è stato risospeso in soluzione fisiologica (3 mL) ed è stato successivamente diluito fino al raggiungimento del valore di assorbanza 1. La misura è stata eseguita tramite spettrofotometro, prelevando 1 mL dal campione e ponendolo all'interno di una cuvetta. Una volta che il campione è stato diluito fino a valore di assorbanza 1, ne sono stati prelevati 3 mL e posti in una vial, in cui sono stati aggiunti 0.6 mL di n-esadecano (n-Hexadecane. Sigma, Milano, Italia). Il campione è quindi stato miscelato tramite vortex per 4 minuti. Dopo un'ora di incubazione a 37° C, è stata misurata l'assorbanza del campione. La percentuale di idrofobicità è stata calcolata con la seguente formula: $\frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$, in cui A_0 rappresenta l'assorbanza al tempo 0 e A_t la misura a 560 µm dopo un'ora di incubazione a 37° C.

3.2.5 Digestione gastrica duodenale simulata

3.2.5.1 Ceppi microbici

Per la digestione gastrico duodenale simulata sono stati scelti 6 ceppi ritenuti maggiormente performanti, analizzando i dati ottenuti precedentemente attraverso i test di autoaggregazione cellulare ed idrofobicità. I ceppi scelti sono

mostrati in Tabella 6.

BC3	<i>Lactobacillus crispatus</i>
BC4	<i>Lactobacillus crispatus</i>
BC9	<i>Lactobacillus gasseri</i>
BC14	<i>Lactobacillus gasseri</i>
BC16	<i>Lactobacillus vaginalis</i>
BC17	<i>Lactobacillus vaginalis</i>

Tabella 6: ceppi utilizzati per la digestione duodenale simulata

3.2.5.2 Soluzioni

Per la seguente sperimentazione sono state utilizzate tre soluzioni. Queste simulano le tre tipologie di substrato con cui i lattobacilli vengono in contatto durante il processo digestivo, una volta assimilati insieme all'alimento.

- **Soluzione A:** è composta da 0.22 g/L di CaCl_2 , 16.2 g/L di NaCl , 2.2 g/L di KCl e 1.2 g/L di NaHCO_3 . La soluzione è stata sterilizzata e, in condizioni di sterilità, è stata addizionata pepsina, in modo da ottenere una concentrazione allo 0.6% (Pepsin from gastric porcine mucosa. Sigma, Milano, Italia). In particolare, a 25 mL di soluzione sono stati aggiunti 0.15 g di pepsina.
- **Soluzione B:** è formata da bile alla concentrazione di 1% (Bile extract porcine. Sigma, Milano, Italia). La soluzione in cui è disciolta la bile è basica, composta da tampone fosfato salino (PBS), costituito da 16.30 g di K_2HPO_4 e 0.9 g di KH_2PO_4 disciolti in 1 litro di acqua distillata. Il tampone fosfato salino è stato sterilizzato ed è stata aggiunta la bile. In particolare, 0.25 g di bile sono stati addizionati a 25 mL di PBS. Quindi, la soluzione è stata ulteriormente sterilizzata a freddo attraverso filtri 0.2 μm (Filtri siringa ABLUO, 33 mm. GVS S.p.A., Bologna, Italia).
- **Soluzione C:** è composta da bile 0.3% (Bile extract porcine. Sigma, Milano, Italia) e pancreatina 0.1% (Pancreatine from porcine pancreas. Sigma, Milano, Italia) disciolte in tampone fosfato salino. Il tampone fosfato

salino è stato sterilizzato, poi, in 25 mL di PBS sono stati aggiunti 0.075 g di bile e 0.025 g di pancreatina. Quindi, la soluzione è stata sterilizzata a freddo attraverso filtri 0.2 μm (Filtri siringa ABLUO, 33 mm. GVS S.p.A., Bologna, Italia).

3.2.5.3 Procedura

Al termine di ognuna delle fasi da cui è composta la simulazione gastrica duodenale, è stato svolto il campionamento attraverso diluizioni seriali e inoculo (100 μL) in piastre con terreno MRS addizionato di Agar Technical. Le piastre sono state incubate a 37°C, in condizioni anaerobiche, per 24 ore o 48 ore a seconda della resistenza mostrata dal ceppo. Tutta la sperimentazione è stata svolta in triplicato.

Inizialmente, sono stati preparati due campioni identici, contenenti latte UHT e inoculo. In ogni falcon (15 mL) sono stati inseriti 13 mL di latte UHT e 1.5 mL di inoculo di lattobacilli, fatti precedentemente crescere in provette di brodo MRS incubate a 37°C per 24 ore in condizioni anaerobiche. Il primo campione è stato utilizzato per svolgere la prova di digestione gastrica duodenale simulata immediatamente, il secondo è stato incubato a 4° C per 7 giorni. Questo è stato poi sottoposto alla stessa prova dopo una settimana di conservazione.

Innanzitutto, sono stati prelevati 10 mL dal campione costituito da latte e inoculo e uniti a 10 mL di soluzione A. A questo punto, è stato eseguito il primo campionamento, al tempo 0, ovvero quel momento della sperimentazione che simula la formazione del bolo in bocca, in questa fase, i risultati che si otterranno dalla conta microbica in piastra corrispondono alla carica microbica iniziale. Il pH del campione è abbassato a 3.0 aggiungendo 250 μL di acido cloridrico e controllando l'avvenuta acidificazione tramite piaccametro (Basic 20, Crison. Barcellona, Spagna). Inizialmente, la soluzione A simula la saliva umana. Nel momento in cui il pH è portato a 3.0 e la pepsina viene convertita in pepsinogeno, la soluzione assume la composizione del succo gastrico. A questo

punto, il campione è stato inserito in bagno termostatico (WB-WF bagno termostatico con scuotimento. Treviglio, Italia) alla temperatura di 37°C per 90 minuti. Terminata la fase di simulazione della digestione gastrica, è stato eseguito il secondo campionamento. Dopo l'esposizione dei lattobacilli alla soluzione A sono stati prelevati 2 mL dal campione e posti in provetta eppendorf per proseguire il test. Per separare le cellule dalla soluzione e dal latte, è stata utilizzata una centrifuga (CT15RE, Himac. Tokyo, Japan) a 12 000 RPM, per 4 minuti a 4° C. Dopo la prima centrifuga, eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 2 mL di fisiologica. Attraverso un secondo processo di centrifugazione nelle stesse condizioni, il pellet è stato risospeso in 2 mL di soluzione B, che simula la bile epatica. La provetta eppendorf contenente il campione è stata posta nel bagno termostatico a 37° C per 10 minuti, in modo da simulare la fase di shock duodenale della bile. Dal campione sono stati quindi prelevati 100 µL per il terzo campionamento e la restante parte è stata sottoposta a centrifugazione a 12000 RPM, per 4 minuti a 4°C. Una volta eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in soluzione fisiologica (1.9 mL) e centrifugato nelle stesse condizioni. È stata poi aggiunta la soluzione C, La soluzione C rappresenta il succo intestinale o enterico (shock intestinale). In questo caso, il tempo di incubazione nel bagno termostatico è di 90 minuti, alla temperatura di 37°C. Infine, è stato eseguito l'ultimo campionamento.

3.2.6 Prove di adesione a cellule Caco-2

3.2.6.1 Ceppi microbici

I ceppi utilizzati per le prove di adesione alle linee cellulari Caco-2 sono elencati in Tabella 7.

BC1	<i>Lactobacillus crispatus</i>
BC3	<i>Lactobacillus crispatus</i>
BC4	<i>Lactobacillus crispatus</i>

BC5	<i>Lactobacillus crispatus</i>
BC6	<i>Lactobacillus crispatus</i>
BC8	<i>Lactobacillus crispatus</i>
BC9	<i>Lactobacillus gasseri</i>
BC11	<i>Lactobacillus gasseri</i>
BC12	<i>Lactobacillus gasseri</i>
BC14	<i>Lactobacillus gasseri</i>
BC16	<i>Lactobacillus vaginalis</i>
BC17	<i>Lactobacillus vaginalis</i>

Tabella 7: ceppi utilizzati per le prove di adesione a cellule Caco-2

3.2.6.2 Cellule Caco-2

Per valutare la capacità dei ceppi di *Lactobacillus* di aderire all'epitelio intestinale, sono state utilizzate cellule Caco-2. Questa linea cellulare è derivata da adenocarcinoma del colon-retto umano e presenta la capacità di differenziare spontaneamente in cellule con caratteristiche tipiche degli enterociti, come la presenza di giunzioni occludenti (tight junctions) e l'espressione di attività enzimatiche di lattasi, N-amminopeptidasi, saccarasi-isomaltasi e dipeptilpeptidasi (Tor Lea, 2015). Per questo motivo, le cellule Caco-2 differenziate sono spesso utilizzate quale modello di barriera epiteliale intestinale. Le cellule Caco-2 per la seguente sperimentazione sono state coltivate in terreno DMEM high Glucose (Sigma, Milano, Italia) addizionato di 2 mM L-Glutammina (Sigma, Milano, Italia) e 20% v/v Siero Fetale Bovino (Sigma, Milano, Italia), in fiasche per colture cellulari (Corning, NY, USA), e mantenute in incubatore a 37°C con 5% CO₂. Le cellule vengono distaccate in modo meccanico, utilizzando un cell scraper.

Per ottenere colture di Caco-2 differenziate, le cellule sono state inoculate in fiasche o piastre multipozzetto alla densità di 10⁵ cellule/cm² e mantenute in coltura per 14-20 giorni, cambiando il terreno di coltura ogni 3-4 giorni.

Per effettuare le prove di adesione, le cellule Caco-2 sono fatte crescere su vetrini coprioggetto (precedentemente lavati e sterilizzati in autoclave), posti in multiplastre da 6 pozzetti, fino a differenziamento.

3.2.6.2 Procedura

I ceppi di lattobacilli vaginali sono stati inoculati a partire da sospensioni stock (in terreno MRS addizionato di 10% glicerolo, mantenute a -20°C) in 10 mL di brodo MRS e lasciati crescere a 37°C per 18 ore, in anaerobiosi (pre-inoculo). A partire da questo pre-inoculo, è stata allestita una seconda coltura con OD (600 nm) iniziale pari a 0.015, in 10 mL di terreno MRS. Tale coltura è stata fatta crescere a 37°C per 24 ore, in anaerobiosi. Al termine, la coltura è stata centrifugata a 20 000 RPM per 20 minuti per separare il pellet cellulare dal terreno esausto. Il pellet cellulare batterico è stato lavato una volta in soluzione fisiologica sterile addizionata di 0.05% cisteina, per poi essere risospeso nella stessa soluzione alla concentrazione di 5×10^8 cfu/mL.

Le cellule Caco-2 differenziate sono state trattate con cellule di lattobacilli applicando un rapporto 1:400, e mantenute in incubatore a 37°C con 5% CO₂ per un'ora. Al termine, i campioni hanno subito un doppio lavaggio con tampone PBS per eliminare i lattobacilli non adesi, fissati con metanolo per 10 minuti, e poi colorati con Giemsa 10% (Sigma, Milano, Italia). Dopo ulteriori tre lavaggi in PBS, i campioni sono stati fatti asciugare all'aria e poi osservati al microscopio ottico. L'adesione dei lattobacilli alle cellule Caco-2 è stata valutata mediante conta del numero di lattobacilli adesi/cellula Caco-2, considerando almeno 200 cellule Caco-2.

4. RISULTATI

4. Risultati

Durante il mio lavoro sperimentale 15 ceppi di *Lactobacillus* appartenenti alle specie *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus vaginalis*, isolati da vagina di donna sana, sono stati testati per la loro capacità di autoaggregazione, di idrofobicità, di deconiugare i sali biliari e di resistere a stress simulanti il processo digestivo durante la conservazione refrigerata in latte. Inoltre, i ceppi testati sono stati anche caratterizzati per la loro attitudine ad aderire a cellule Caco-2 di adenocarcinoma del colon-retto umano.

In Figura 5 e 6 sono riportati i risultati inerenti alle prove di autoaggregazione e idrofobicità, rispettivamente, dei ceppi inoculati in terreno M.R.S. ad un livello compreso tra 8 e 9 log UFC/mL. Come si evince dalla Figura 5, i ceppi dotati di maggiore capacità autoaggregante sono: *Lactobacillus crispatus* BC1 (90.86%), *Lactobacillus crispatus* BC8 (98.49%), *Lactobacillus gasseri* BC9 (98.49%), *Lactobacillus gasseri* BC10 (82.43%), *Lactobacillus crispatus* BC7 (69.17%), *Lactobacillus gasseri* BC14 (74.87%), *Lactobacillus vaginalis* BC16 (70.14%) e *Lactobacillus vaginalis* BC17 (71.74%). I ceppi di *Lactobacillus crispatus* BC3 e BC4 hanno mostrato una percentuale di autoaggregazione pari a 62.4% e 56.52% rispettivamente, mentre i restanti ceppi hanno mostrato percentuali inferiori al 40%. Per quanto concerne l'idrofobicità, i ceppi *Lactobacillus crispatus* BC3 (92.8%), *Lactobacillus gasseri* BC9 (96.23%), *Lactobacillus gasseri* BC14 (79.32%), *Lactobacillus vaginalis* BC16 (79.83%) e BC17 (89.08%) hanno evidenziato, anche in questo caso, elevate percentuali. I ceppi *Lactobacillus crispatus* BC4 e *Lactobacillus gasseri* BC11 hanno presentato valori di idrofobicità pari al 74.57% e 73.70%, rispettivamente. I restanti ceppi hanno mostrato livelli di idrofobicità inferiori al 50%. L'analisi di questi fattori, secondo i dati della letteratura (Tabanelli et al., 2013; Schillinger et al., 2005; Del Re et al., 2000), risulta molto importante dal momento che l'idrofobicità e l'autoaggregazione sono correlate positivamente alla capacità dei batteri di

aderire alle cellule epiteliali e di colonizzarne l'intestino umano, sebbene diversi meccanismi siano coinvolti nelle potenzialità adesive dei microrganismi tra cui anche la capacità di produrre esopolisaccaridi (Patrignani et al., 2018). In particolare, si considera che l'idrofobicità possa conferire al microrganismo un vantaggio competitivo, importante per la sua permanenza nel tratto gastrointestinale umano (Tabanelli et al., 2013). In questo senso, alcuni dei ceppi da me testati hanno mostrato elevati livelli di idrofobicità, superiori al 70%.

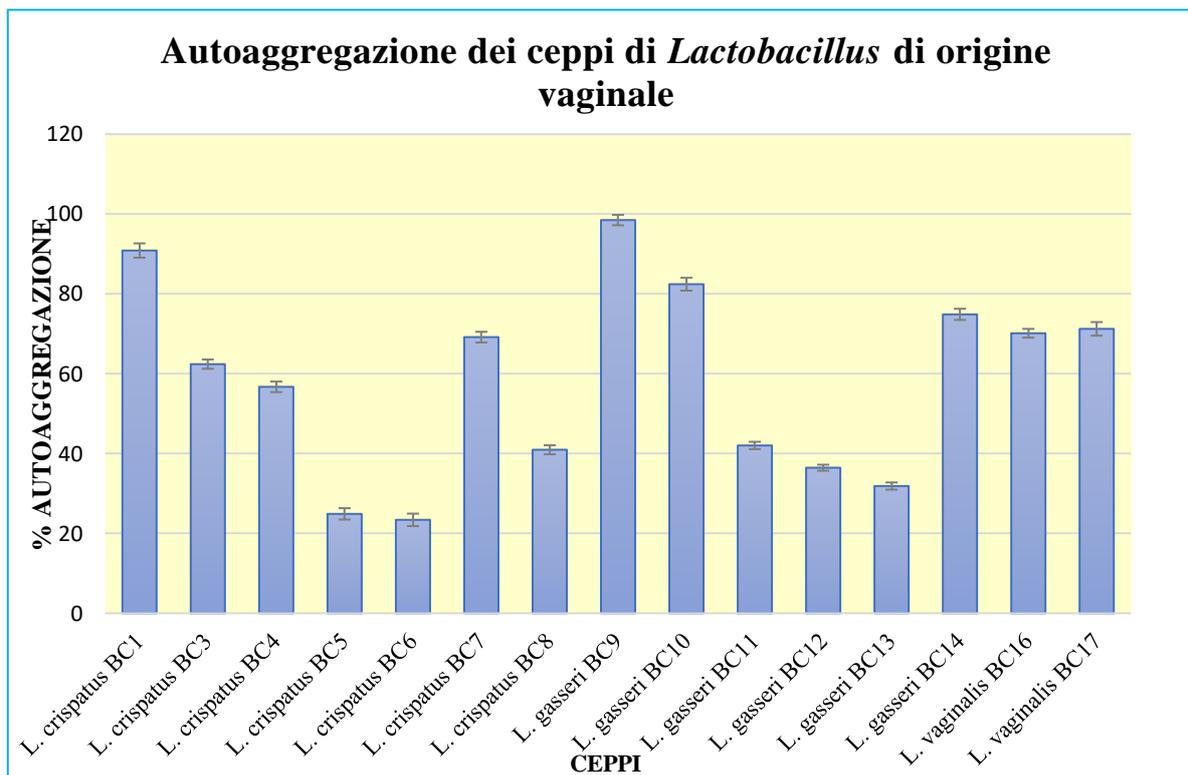


Figura 5: Percentuale di autoaggregazione cellulare dei 15 ceppi di *Lactobacillus* spp. di origine vaginale testati

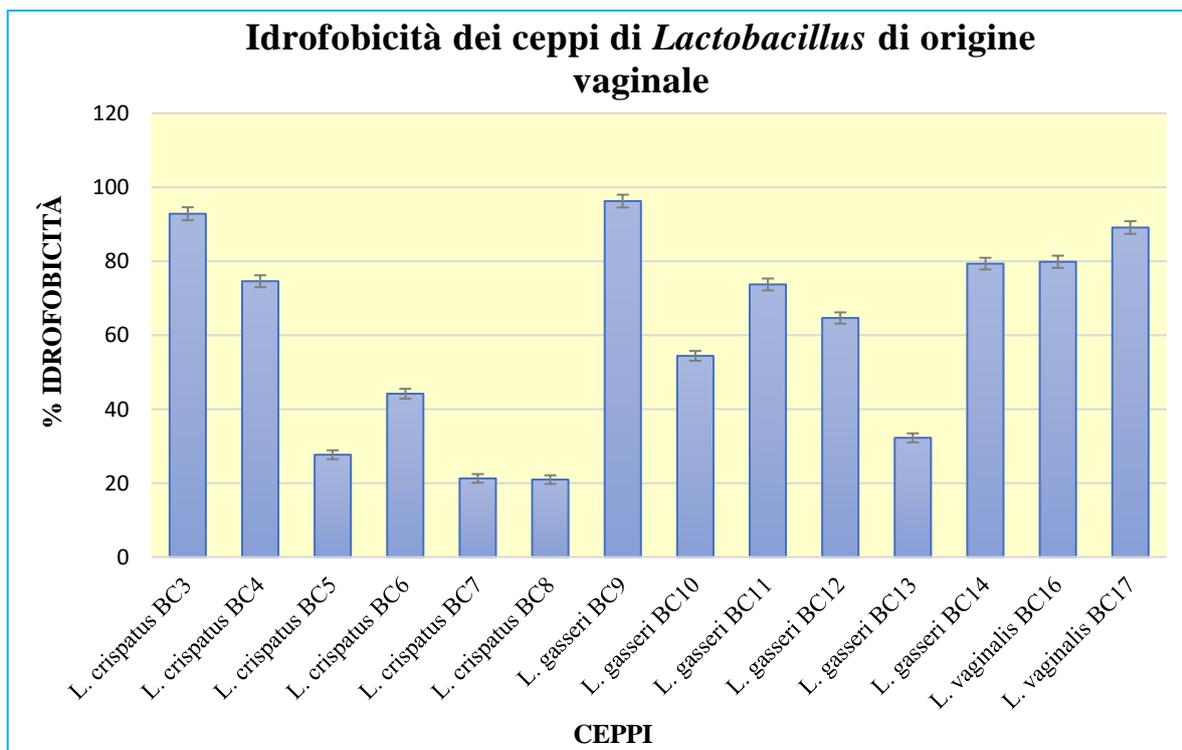


Figura 6: Percentuale di idrofobicità dei 15 ceppi di *Lactobacillus* spp. di origine vaginale testati

Per quanto concerne la capacità di deconiugare i sali biliari, solo alcuni dei ceppi studiati hanno mostrato questa proprietà. I sali biliari sono composti anfipatici prodotti dal fegato e rilasciati nel duodeno. Sono in grado di solubilizzare i lipidi e, per questo, rivestono un'importante funzione metabolica. Tuttavia, la natura anfipatica è responsabile della forte attività antimicrobica, che determina danno alle membrane e stress ossidativo (Bernstein et al., 1999). La superficie cellulare dei microrganismi rappresenta il primo target fisico d'azione della bile. I sali biliari sono in grado di modulare l'espressione di proteine di membrana in batteri enterici (Sánchez et al., 2006), di influenzare la composizione lipidica in *Bifidobacterium* (Gómez-Zavaglia et al., 2002) e di compromettere la funzionalità della membrana cellulare in *Lactobacillus* (Taranto et al., 2003, 2006). I meccanismi di inibizione della crescita sono probabilmente correlati alla dissipazione del potenziale di membrana (Kurdi et al., 2006). Ai fini di contrastare la tossicità della bile, in *Bifidobacterium* è stato riportato il coinvolgimento di diversi meccanismi cellulari, quali espulsione dei sali biliari attraverso proteine multidrug resistance (Price et al., 2006) e

incrementata attività BSH (bile salt hydrolase), (Noriega et al., 2006). Nel mio lavoro di tesi, quest'ultima attività enzimatica è stata testata in piastra su terreno M.R.S. addizionato di acido taurodesossicolico (5g). L'acido taurodesossicolico è un sale biliare che si forma a partire da taurina e acido desossicolico. I probiotici che possiedono l'enzima BHS, presente in varie specie batteriche che colonizzano il tratto gastrointestinale e genitale hanno più probabilità di resistere e colonizzare l'intestino, oltre che apportare benefici all'ospite. In particolare, come mostrato in Tabella 8, i ceppi *Lactobacillus crispatus* BC4, BC6, BC7 e BC8 hanno evidenziato questa peculiarità.

Ceppi	Attività enzima BHS
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC1	X
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC3	X
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC4	✓
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC5	X
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC6	✓
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC7	✓
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC8	✓
<i>Lactobacillus gasseri</i> BC9	X
<i>Lactobacillus gasseri</i> BC10	X
<i>Lactobacillus gasseri</i> BC11	X
<i>Lactobacillus gasseri</i> BC12	X
<i>Lactobacillus gasseri</i> BC13	X
<i>Lactobacillus gasseri</i> BC14	X
<i>Lactobacillus vaginalis</i> BC16	X
<i>Lactobacillus vaginalis</i> BC17	X

Tabella 8: Capacità di deconiugare i sali biliari

Per valutare la capacità dei ceppi di *Lactobacillus* ad aderire all'epitelio intestinale, sono state utilizzate cellule Caco-2. Questa linea cellulare è derivata da adenocarcinoma del colon-retto umano e presenta la capacità di differenziare spontaneamente in cellule con caratteristiche tipiche degli enterociti, come la presenza di giunzioni occludenti (tight junctions) e l'espressione di attività enzimatiche di lattasi, N-amminopeptidasi, saccarasi-isomaltasi e

dipeptilpeptidasi. Per questo motivo, le cellule Caco-2 differenziate sono spesso utilizzate quale modello di barriera epiteliale intestinale (Tor Lea, 2015).

I dati relativi alle capacità adesive dei ceppi considerati sono riportati in Tabella 9 e sono espressi come numero di cellule di lattobacilli su cellule Caco-2. In Figura 7 e 8 è mostrata, invece, l'adesione dei batteri alle cellule epiteliali, come si presentava al microscopio. I ceppi considerati erano caratterizzati da valori di adesività che oscillavano tra 0.15 e 5.14 (cellule batteriche/cellule Caco2). Secondo l'approccio sviluppato da Candela et al (2005), la capacità da parte di un battere di aderire ad un monolayer epiteliale tipo Caco-2 può essere valutata come alta (> 40 cellule batteriche/Caco-2 cell), media (5–40 cellule batteriche/Caco-2 cell), e bassa capacità adesiva (< 5 cellule batteriche/Caco-2 cell). Tra i ceppi da me testati solo *Lactobacillus crispatus* BC8 ha presentato un valore di adesività pari a 5.14 ed era caratterizzato da alti valori di autoaggregazione pari a 98.49%. *Lactobacillus vaginalis* BC17 che ha mostrato adesività pari a 2.32 presentava, invece, elevate proprietà idrofobiche, pari a 89.08%. La capacità di aderire alla mucosa intestinale è considerata uno dei principali criteri di selezione nell'individuazione di potenziali probiotici (Duari et al 2011), in quanto tale caratteristica consente ai ceppi di persistere a livello intestinale (Morelli et al., 1997) ed esercitare effetti benefici sulla salute dell'ospite più a lungo. Inoltre, l'assunzione di ceppi dotati di buone capacità adesive permette all'ospite di ridurre il quantitativo di cellule da assumere quotidianamente. I fattori che incidono sulle capacità adesive di un ceppo microbico sono sicuramente molteplici e non sempre facili da spiegare. L'adesione cellulare è considerata, infatti, un fenomeno complesso tra la superficie da colonizzare e membrana cellulare dove le caratteristiche di superficie di quest'ultima, come l'idrofobicità, la sua carica e la capacità di movimento incidono significativamente sull'adesione alle cellule epiteliali intestinali (Shinde et al. 2019). Studi recenti hanno dimostrato come alcune proteine di superficie, legate alla parete cellulare mediante un legame non

covalente, o le proteine associate al cosiddetto S-layer giocano un ruolo fondamentale nei meccanismi di adesione cellulare da parte di microrganismi probiotici (Do Carmo et al., 2018). Va inoltre sottolineato che le conoscenze relative all'adesione di probiotici derivano per lo più da studi in vitro, che mimano in maniera davvero parziale la complessità dell'ecosistema intestinale. Il fissaggio convenzionale dei tessuti intestinali, che comporta distacco e perdita di muco superficiale, e l'impiego di linee cellulari incapaci di produrre muco, costituiscono un grosso limite sperimentale e pongono notevoli dubbi sull'importanza e sul significato fisiologico dell'adesione epiteliale (Corthésy et al., 2007). Infatti, sebbene le cellule epiteliali impiegate nella mia sperimentazione siano ampiamente utilizzate in prove in vitro, esse presentano ridotta o assente produzione di muco se comparate alle linee cellulari HT-29, LS174T (Jung et al., 2015; Gonzalez et al., 2018).

Ceppi	Valore di adesività	Deviazione standard
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC1	0.63	0.21
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC3	0.45	0.19
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC4	0.24	0.09
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC5	0.43	0.17
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC6	0.74	0.21
<i>Lactobacillus crispatus</i> BC8	5.14	2.29
<i>Lactobacillus gasseri</i> BC9	0.26	0.1
<i>Lactobacillus gasseri</i> BC11	0.27	0.11
<i>Lactobacillus gasseri</i> BC12	0.75	0.23
<i>Lactobacillus gasseri</i> BC14	0.15	0.06
<i>Lactobacillus vaginalis</i> BC16	0.34	0.16
<i>Lactobacillus vaginalis</i> BC17	2.32	1.17

Tabella 9: Capacità di adesione dei ceppi di lattobacilli testati alle cellule Caco-2 (cellule batteriche/cellule Caco-2). Il valore di adesività tra Caco-2 e lattobacilli è espresso tramite un rapporto di 1:400.



Figura 7: Adesione delle cellule di *Lactobacillus* alle cellule Caco-2. Immagine ricavata tramite microscopio elettronico.



Figura 8: Adesione delle cellule di *Lactobacillus* alle cellule Caco-2. Immagine ricavata tramite microscopio elettronico.

Nell'ultima prova condotta, è stata studiata la capacità di *Lactobacillus gasseri* BC9, *Lactobacillus crispatus* BC3, *Lactobacillus crispatus* BC4, *Lactobacillus gasseri* BC14, *Lactobacillus vaginalis* BC16 e *Lactobacillus vaginalis* BC17 a sopravvivere durante il processo digestivo umano simulato quando inoculati in latte conservato a temperatura di refrigerazione. I ceppi sopramenzionati sono stati inoculati in latte a livello compreso tra 7 e 9 log UFC/mL e sottoposti a digestione gastrica, shock duodenale ed intestinale. La capacità di resistere a questo tipo di stress è stata valutata sia dopo l'inoculo in latte che dopo 7 giorni di conservazione a +4°C. In generale, tutti i ceppi testati hanno mostrato grande resistenza al tipo di stress adottato, compreso quello gastrico. I risultati ottenuti dalla digestione gastrica duodenale simulata sono mostrati in Figura 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

Solo il ceppo *Lactobacillus vaginalis* BC16 ha mostrato, in seguito all'esposizione a valori di acidità simulanti lo stomaco umano, un decremento di circa un ciclo logaritmico rispetto al valore di inoculo iniziale (da 8 log UFC/mL a 7 log UFC/mL). D'altra parte, anche altri autori hanno evidenziato anche con metodi più sofisticati di quelli utilizzati in questa sperimentazione (SHIME), come lo stress gastrico incida significativamente rispetto a quello duodenale o intestinale, sul decremento di vitalità (Patrignani et al., 2019).

Come si evince dalla Figura 11, dopo una settimana di conservazione del latte inoculato a temperatura di refrigerazione, il ceppo *Lactobacillus gasseri* BC9 ha mostrato un decremento di vitalità rispetto all'inoculo iniziale, passando da 7 log UFC/mL a 6 log UFC/mL, mostrando comunque maggior sensibilità alle condizioni di stoccaggio adottate piuttosto che allo stress gastrico. I ceppi *Lactobacillus crispatus* BC3, *Lactobacillus crispatus* BC4, *Lactobacillus gasseri* BC14 e *Lactobacillus vaginalis* BC16 hanno mostrato un significativo mantenimento della vitalità sia in conservazione, che in seguito all'applicazione dello stress simulato, come mostrato in Figura 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

Diversamente, il ceppo *Lactobacillus vaginalis* BC17 ha evidenziato una

riduzione significativa in seguito allo stress gastrico simulato, da 7 log UFC/mL a 5 log UFC/mL, senza ulteriori perdite in termini di vitalità. In generale, il decremento di vitalità in seguito allo stress gastrico applicato è stato contenuto in ogni caso, dal momento che sono stati considerati valori di acidità gastrica pari a 3. Tuttavia, l'applicazione di tale stress ha sicuramente indotto una maggior resistenza da parte dei ceppi testati alle condizioni di stress successivo (Tabanelli et al., 2013; Chung et al., 2006). Inoltre, la matrice latte in cui si sono effettuati i test ha esplicitato sicuramente un effetto protettivo nei confronti della perdita di vitalità da parte dei ceppi, controbilanciando gli effetti negativi dello stoccaggio refrigerato. È noto, infatti, che la capacità di resistere alle basse temperature durante la conservazione di un prodotto alimentare e mantenere, quindi, un'alta vitalità sia uno dei criteri di selezione per i ceppi ad uso probiotico e funzionale. Infatti, per esplicare un effetto positivo sull'ospite devono necessariamente essere presenti almeno a livelli di 7 log UFC/g.

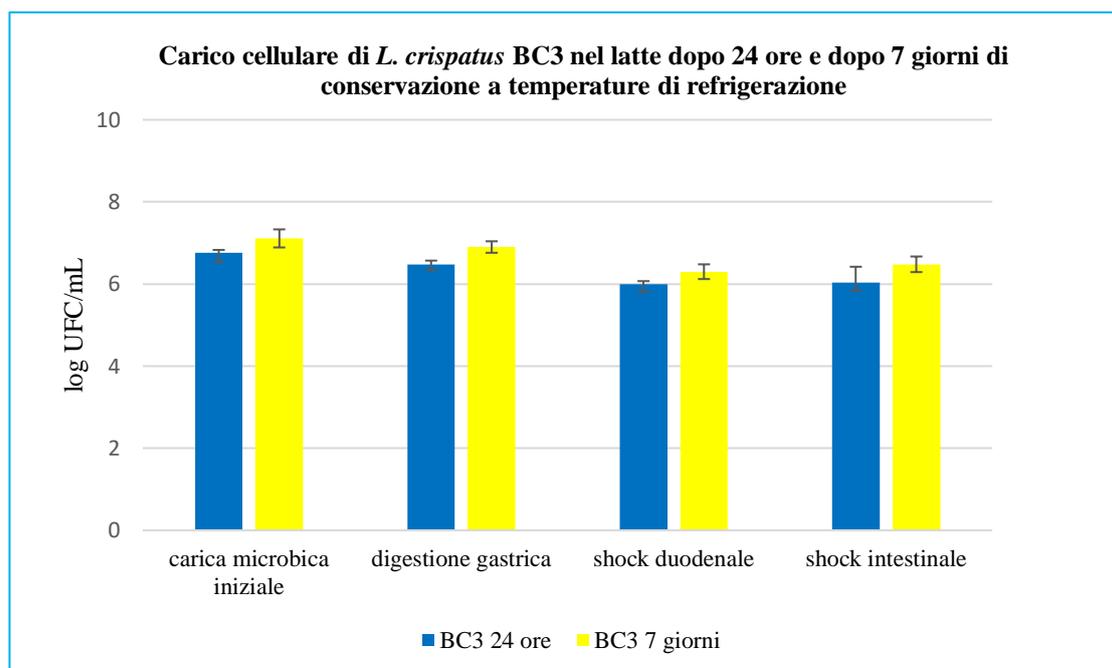


Figura 9: Vitalità di *Lactobacillus crispatus* BC3 in latte durante la digestione gastrica duodenale simulata condotta dopo 24 ore e dopo 7 giorni di stoccaggio a temperature di refrigerazione.

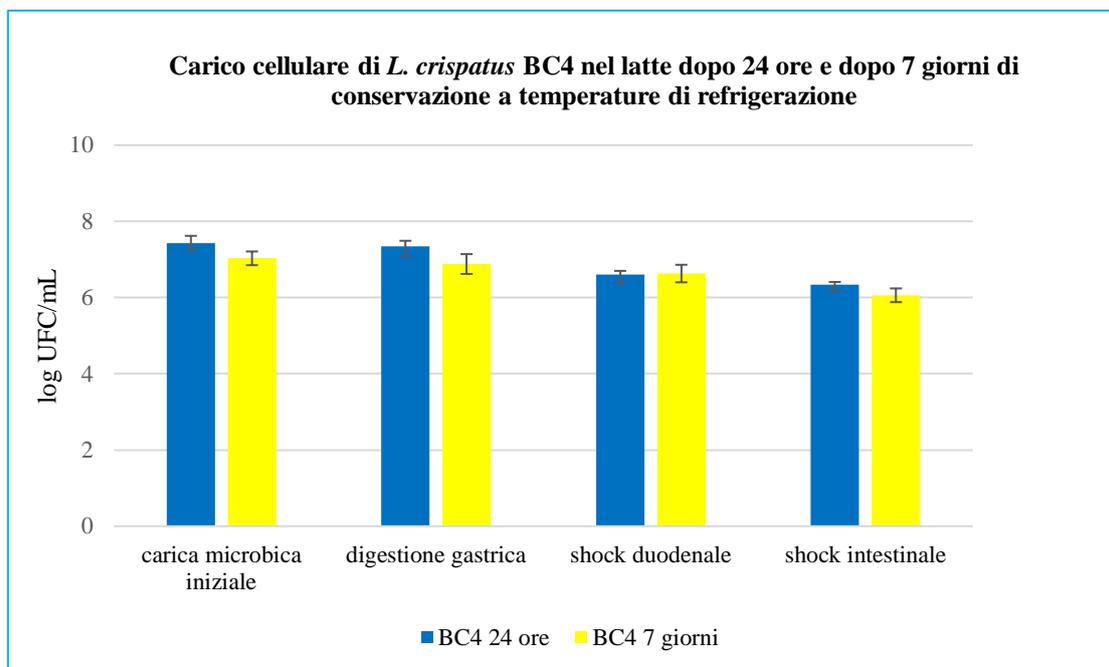


Figura 10: Vitalità di *Lactobacillus crispatus* BC4 in latte durante la digestione gastrica duodenale simulata condotta dopo 24 ore e dopo 7 giorni di stoccaggio a temperature di refrigerazione.

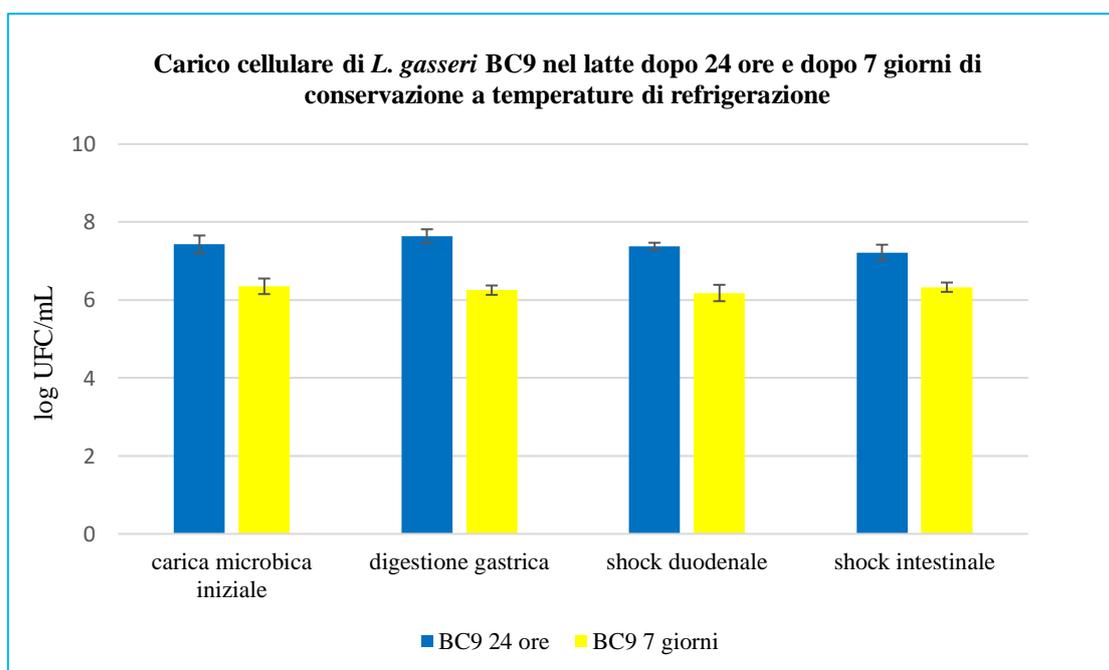


Figura 11: Vitalità di *Lactobacillus gasseri* BC9 in latte durante la digestione gastrica duodenale simulata condotta dopo 24 ore e dopo 7 giorni di stoccaggio a temperature di refrigerazione.

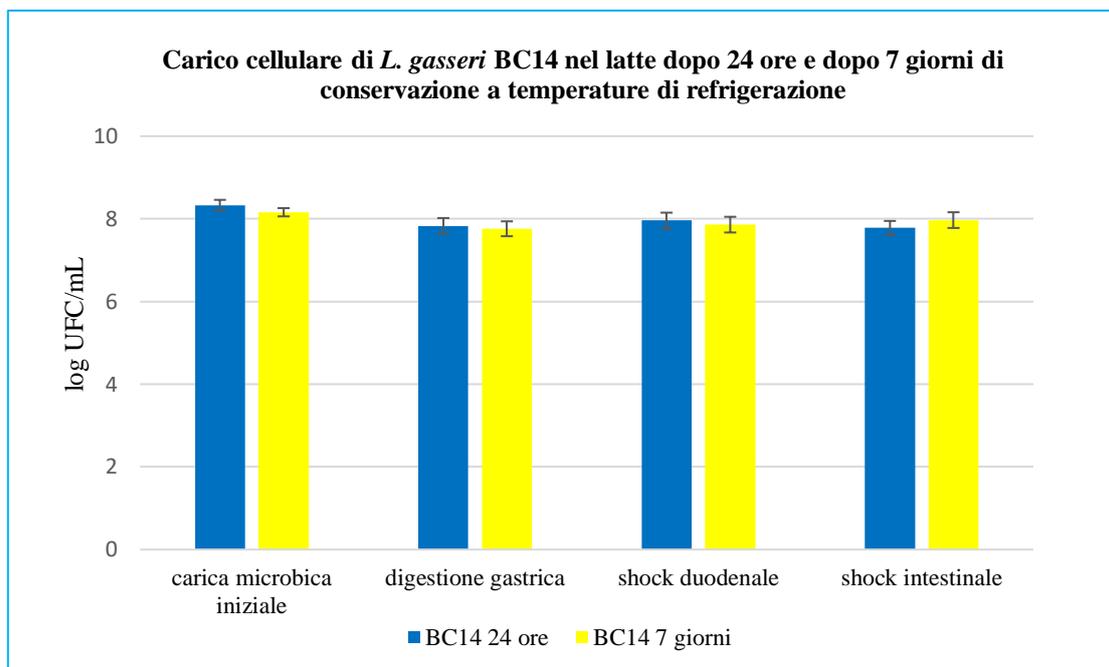


Figura 12: Vitalità di *Lactobacillus gasseri* BC14 in latte durante la digestione gastrica duodenale simulata condotta dopo 24 ore e dopo 7 giorni di stoccaggio a temperature di refrigerazione.

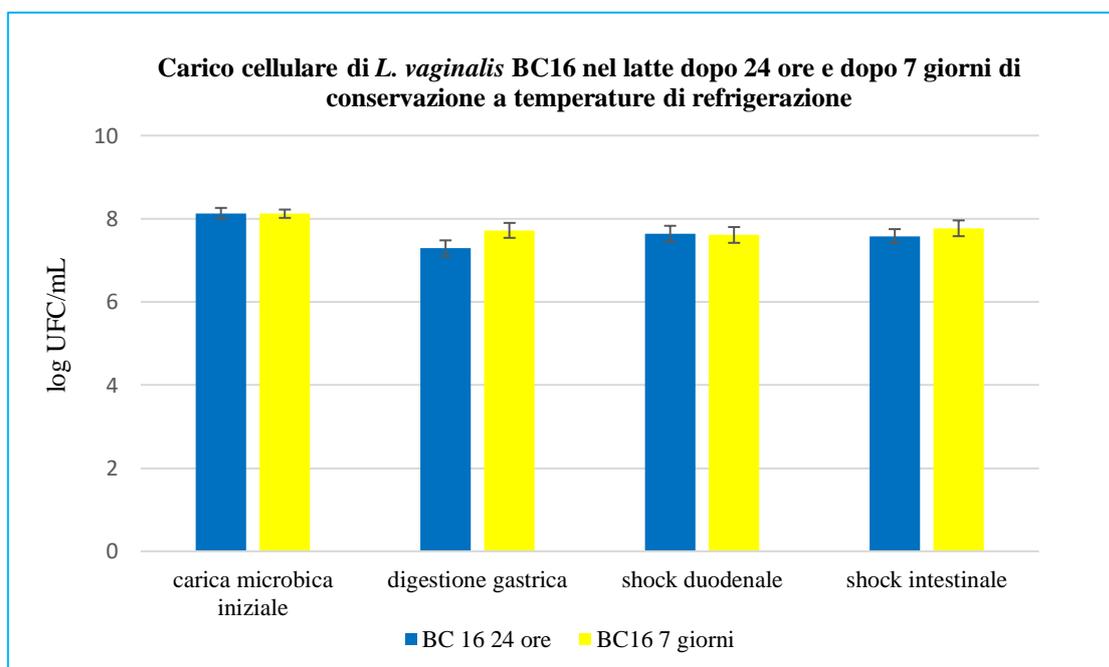


Figura 13: Vitalità di *Lactobacillus vaginalis* BC16 in latte durante la digestione gastrica duodenale simulata condotta dopo 24 ore e dopo 7 giorni di stoccaggio a temperature di refrigerazione.

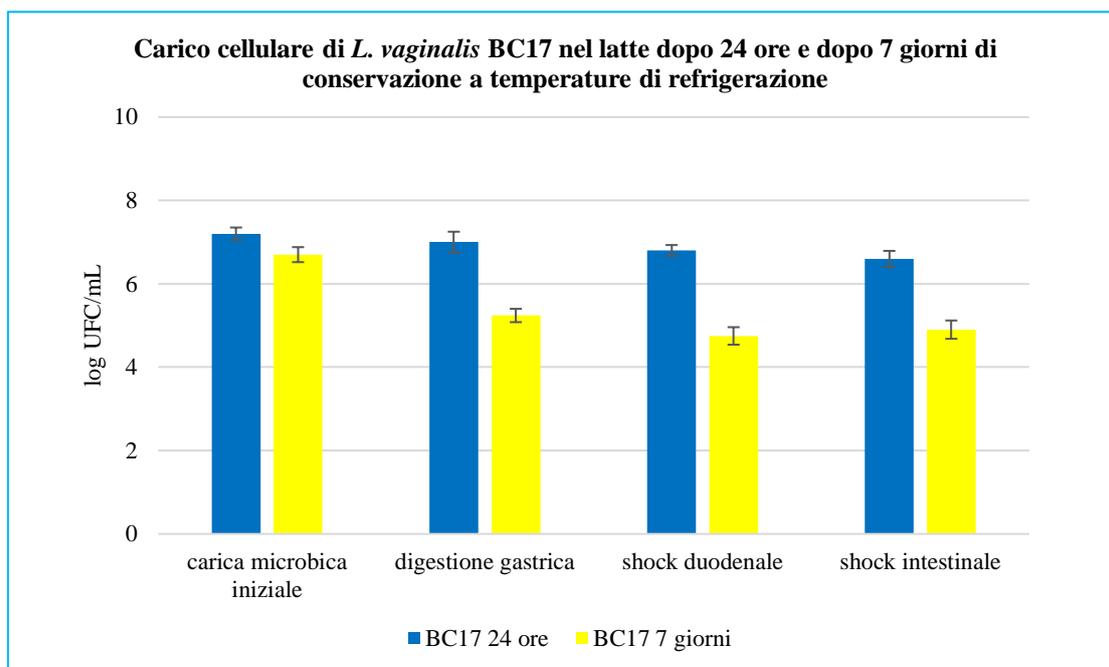


Figura 14: Vitalità di *Lactobacillus vaginalis* BC17 in latte durante la digestione gastrica duodenale simulata condotta dopo 24 ore e dopo 7 giorni di stoccaggio a temperature di refrigerazione.

5. CONCLUSIONI

5. Conclusioni

I risultati ottenuti nell'ambito di questa sperimentazione hanno permesso di caratterizzare da un punto di vista funzionale i ceppi di *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus vaginalis* e *Lactobacillus gasseri* di origine vaginale permettendo di selezionare i ceppi più promettenti per una loro inclusione come probiotici in un alimento di genere pensato per il benessere femminile. I dati ottenuti hanno evidenziato come i ceppi *Lactobacillus crispatus* BC3, *Lactobacillus gasseri* BC9, *Lactobacillus gasseri* BC14, *Lactobacillus vaginalis* BC16 e *Lactobacillus vaginalis* BC17 fossero caratterizzati da elevati valori di idrofobicità e autoaggregazione. Inoltre, i test effettuati hanno evidenziato come i ceppi di *Lactobacillus crispatus* BC4, BC6, BC7 e BC8 fossero caratterizzati da importanti attività enzimatiche (BHS) in grado di modulare il metabolismo lipidico e permettere la sopravvivenza dei batteri considerati alle condizioni stringenti del tratto gastro intestinale. Per quanto riguarda la resistenza dei ceppi durante la digestione gastrica simulata, sia testata subito dopo l'inoculo in latte che dopo la conservazione nella stessa matrice a temperature di refrigerazione per 7 giorni, il decremento di vitalità è stato contenuto per tutti i ceppi, mostrando, pertanto, una buona resistenza anche dopo l'esposizione a valori di acidità gastrica pari a 3. I ceppi *Lactobacillus crispatus* BC8 e *Lactobacillus vaginalis* BC17 erano anche caratterizzati da medie capacità di adesione a cellule epiteliali intestinali. Sebbene le prove ottenute in vitro dovranno essere confermate mediante prove *in vivo*, i dati di questa tesi rappresentano un importante tassello per la formulazione di un alimento di genere concepito come strategia alimentare per risolvere e prevenire problematiche inerenti al benessere femminile.

6. BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografia

Ahmed K., Tunaru S., Offermanns S. (2009). *GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors*. Trends in Pharmacological Sciences, n. 30, pp. 557-62.

Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I.M. (2000). *Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, n. 5, pp. 2001-2005.

Alander M., Korpela R., Saxelin M., Vilpponen-Salmela T., Mattila-Sandholm T., von Wright A. (1997). *Recovery of Lactobacillus rhamnosus GG from human colonic biopsies*. Letters in Applied Microbiology, n. 24, pp. 361 –364.

Aldunate M., Tyssen D., Johnson A., Zakir T., Sonza S., Moench T., Cone R., Tachedjian G. (2013). *Vaginal concentrations of lactic acid potently inactivate HIV*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, n. 68, pp. 2015-2025.

Andersch B., Forssman L., Lincoln K., Torstensson P. (1986). *Treatment of bacterial vaginosis with an acid cream: a comparison between the effect of lactate-gel and metronidazole*. Gynaecological and Obstetric Investigation, n. 21, pp. 19-25.

Andreu A., Stapleton A.E., Fennell C.L., Hillier S.L., Stamm W.E. (1995). *Hemagglutination, adherence and surface properties of vaginal Lactobacillus species*. Journal of Infectious Diseases, n. 171, pp. 1237–1243.

Barrons R., Tassone D. (2008). *Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review*. Clinical Therapeutics, n. 30, pp. 453–468.

Begley M, Hill C., Gahan C.G.M. (2006). *Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, n. 3, pp. 1729–1738.

Bernet M.F., Brassart D., Neeser J.R., Servin A.L. (1994). *Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria*. Gut, n. 35, pp. 483 – 489.

Bernstein H., Payne C.M., Bernstein C., Schneider J., Beard S.E. (1999). *Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein malfolding by the bile salt, deoxycholate*. Toxicology Letters, n. 108, pp. 37-46.

Bjorkroth J., Koort J. (2016). *Lactic acid bacteria: taxonomy and biodiversity*. In: Fuquai W., Fox P.F., McSweeney P.L., *Encyclopedia of Dairy Sciences*, ed. 2. Londra: Elsevier. Vol. 1, pp. 45–48.

Borisa S., Barbés C. (2000). *Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens*. Microbes and Infection, n. 2, pp. 543–546.

Boskey E.R., Cone R.A., Whaley K.J., Moench T.R. (2001). *Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source*. Human Reproduction, n. 16, pp. 1809-1813.

Candela M., Seibold G., Vitali B., Lachenmaier S., Eikmanns B.J. et al. (2005). *Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: Competition between bifidobacteria and enteropathogens*. Research in Microbiology, n. 156, pp. 887–895.

Capurso L. (2016). *I probiotici*. Recenti Progressi in Medicina, n. 107, pp. 267-277.

Chan R.C.Y., Reid G., Irvin R.T., Bruce A.W., Costerton J.W. (1985). *Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by Lactobacillus whole cells and cell wall fragment*. Infection and Immunity, n. 47, pp. 84–89.

Chilo E. (2018). *Review article: Current Role of Probiotics in Food Safety and Health*. Indo American Journal of Pharmaceutical Science, n. 5, suppl. 11, pp. 11729-11740.

Chung H.J., Bang W., Drake M.A. (2006). *Stress Response of Escherichia coli*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, n. 5, pp. 52-64.

Coconnier M.H., Lievin V., Bernet-Camard M.F., Hudault S., Servin A.L. (1997). *Antibacterial effect of the adhering human Lactobacillus acidophilus strain LB*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, n. 41, pp. 1046 –1052.

Conti C., Malacrino C., Mastromarino P. (2009). *Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal lactobacilli*. Journal of Physiology and Pharmacology, n. 60, suppl. 6, pp. 19–26.

Corthésy B., Gaskins H.R., Mercenier A. (2007). *Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system*. The Journal of Nutrition, n. 137, pp. 781-790.

Corzo G., Gilliland S.E. (1999). *Bile salt hydrolase activity of three strains of Lactobacillus acidophilus*. Journal of Dairy Science, n. 82, pp. 472–480.

De Gregorio P.R., Juarez Tomas M.S., Leccese Terraf M.C., Nader- Macias M.E. (2014). *In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections*. Journal of Medical Microbiology, n. 63, pp. 685-696.

De Vriesa M.C., Vaughan E.E., Kleerebezema M., De Vos W.M. (2006). *Review article: Lactobacillus plantarum—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract*. International Dairy Journal, n. 16, pp. 1018–1028.

Del Re B., Sgorbati B., Miglioli M., Palenzona D. (2000). *Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum*. Letters in Applied Microbiology, n. 31, suppl. 6, pp. 438-442.

Dellaglio F., Felis G.E. (2005). *Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria*. In: Tannock G. W., *Probiotics and prebiotics: scientific aspects*. Norfolk: Caister Academic Press. Pp. 25–50.

Do Carmo F.L.R., Rabah H., De Oliveira R.D., Gaucher C.F., Cordeiro B. F., Da Silva S.H., Le Loir Y., Jan V.A.G. (2018). *Extractable Bacterial Surface Proteins in Probiotic–Host Interaction*. Frontiers in Microbiology, vol. 9, n. 645, pp. 200-214.

Doerflinger S.Y., Throop A.L., Herbst-Kralovetz M.M. (2014). *Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner*. Journal of Infectious Disease, n. 209, pp. 1989–1999.

Duary R.K., Rajput Y.S., Batish V.K., Grover S. (2011). *Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells*. Indian Journal of Medical Reseach, n. 134, pp. 664-671.

Eriksson K., Carlsson B., Forsum U., Larsson P.G. (2005). *A double-blind treatment study of bacterial vaginosis with normal vaginal lactobacilli after an open treatment with vaginal clindamycin ovules*. Acta Dermato-Venereologica, n. 85, pp. 42-46.

Eschenbach D. A., Davick P. R., Williams B. L., Klebanoff S. J., Young-Smith K., Critchlow C. M., Holmer K. K. (1989). *Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis*. Journal of Clinical Microbiology., n. 27, pp. 251–256.

Farhangi M.A., Javid A.Z., Sarmadi B., Karimi P., Dehghan P. (2017). *A randomized controlled trial on the efficacy of resistant dextrin, as functional food, in women with type 2 diabetes: Targeting the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune system*. Clinical Nutrition, n. 37, pp. 1216-1223.

Fichorova R.N, Lai J.J., Schwartz J.L., Weiner D.H., Mauck C.K., Callahan M.M. (2011). *Baseline variation and associations between subject characteristics and five cytokine biomarkers of vaginal safety among healthy non-pregnant women in microbicide trials*. Cytokine, n. 55, pp. 134–140.

Fichorova R.N., Mendonca K., Yamamoto H.S., Murray R., Chandra N., Doncel G.F. (2015). *A quantitative multiplex nuclease protection assay reveals immunotoxicity gene expression profiles in the rabbit model for vaginal drug safety evaluation*. Toxicology and Applied Pharmacology, n. 285, pp. 198–206.

Fooks L.J., Fuller R., Gibson G.R. (1999). *Prebiotics, probiotics and human gut microbiology*. International Dairy Journal, n. 9, pp. 53-61.

Fredricks D.N., Fiedler T.L., Marrazzo J.M. (2005). *Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis*. The New England Journal of Medicine, n. 353, pp. 1899-1911.

Fukushima Y., Kawata Y., Hara H., Terada A., Mitsuoka T. (1998). *Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children*. International Journal of Food Microbiology, n. 42, pp. 39 –44.

Garcia-Gonzalez N., Prete R., Battista N., Corsetti A. (2018). *Adhesion Properties of Food-Associated Lactobacillus plantarum Strains on Human Intestinal Epithelial Cells and Modulation of IL-8 Release*. *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, n. 2392, pp. 330-340.

Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G. (2004). *Taxonomic outline of the procaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology*, ed. 2. New York: Springer. Pp. 1-399.

Gomez-Zavaglia A., Kociubinski G., Pérez P., Disalvo E., De Antoni G. (2002). *Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology*, n. 93, pp. 794-799.

Graver M. A., Wade J. J. (2011). *The role of acidification in the inhibition of Neisseria gonorrhoeae by vaginal lactobacilli during anaerobic growth*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, n. 10, pp. 1-5.

Green K.A., Zarek S.M., Catherino W.H. (2015). *Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract*. *Fertility and Sterility.*, n. 104, pp. 1351–1357.

Gregoire A.T., Kandil O., Ledger W. J. (1971). *The glycogen content of human vaginal epithelial tissue*. *Fertility and Sterility*, n. 22, pp. 64–68.

Gupta S., Kumar N., Singhal N., Kaur R., Manektala U. (2006). *Vaginal microflora in postmenopausal women on hormone replacement therapy*. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, n. 49, pp. 457–461.

Hamilton-Miller J.M.T., Gibson G.R., Bruck W. (2003). *Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'*. *British Journal of Nutrition*, n. 90, p. 845.

Hammes W.P., Hertel C. (2009). *Genus I. Lactobacillus Beijerinck, 1901*. In: De

Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K.H., Whitman W.B., *Bergey's manual of systematic bacteriology*, ed. 2. Berlin: Springer. Vol. 3, pp. 465–510.

Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U. (2001). *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition*. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73, n. 2, pp. 365–373.

Holzapfel W.H., Haberer P., Snelb J., Schillinger U., Huis int Veld J.H.J. (1998). *Overview of gut flora and probiotics*. International Journal of Food Microbiology, n. 41, pp. 85-101.

Horvath P., Coûté-Monvoisin A.C., Romero D.A., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R. (2009). *Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes*. International Journal of Food Microbiology, n. 131, pp. 62–70.

Hutt P., Lapp E., Stsepetova J., Smidt I., Taelma H., Borovkova N., Oopkaup H., Ahelik A., Roop T., Hoidmets D., Samuel K., Salumets A., Mändar R. (2016). *Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains*. Microbial Ecology in Health and Disease, n. 27, pp. 484-495.

Johansson M.L., Molin G., Jeppson B., Nobaek S., Ahrne S., Bengmark S. (1993). *Administration of different Lactobacillus strains in fermented oatmeal soup. In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora*. Applied and Environmental Microbiology, n. 59, pp. 15 –20.

Jung T.H., Park J.H., Jeon W.M., Han K.S. (2015). *Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway*. Nutrition Research and Practice, n. 9, suppl. 4, pp. 343–349.

Kandler O. (1983). *Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek, n. 49, pp. 209-224.

Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N., Fakiri E.M. (2013). *Health benefits of probiotics: a review*. ISRN Nutrition, vol. 2013, pp. 1-7.

Kimoto-Nira H., Nagakura Y., Kodama C., Shimizu T., Okuta M., Sasaki K., Koikawa N., Sakuraba K., Suzuki C., Suzuki Y. (2014). *Effects of ingesting milk fermented by Lactococcus lactis H61 on skin health in young women: a randomized double-blind study*. Journal of Dairy Science, n. 97, pp. 5898–5903.

Korzen-Bohr S., O'Doherty Jensen K. (2006). *Heart disease among post-menopausal women: Acceptability of functional foods as a preventive measure*. Appetite, n. 46, suppl. 2, pp. 152–163.

Kurdi P., Kawanishi K., Mizutani K., Yokota A. (2006). *Mechanism of growth inhibition by free bile acids in Lactobacilli and Bifidobacteria*. Journal of Bacteriology, n. 188, pp. 1979-1986.

Kyongo J.K., Jespers V., Goovaerts O., Michiels J., Menten J., Fichorova R.N., Crucitti T., Vanham G., Arien K.K. (2012). *Searching for lower female genital tract soluble and cellular biomarkers: defining levels and predictors in a cohort of healthy Caucasian women*. PLoS One, n. 7, pp. 943-951.

Larsen B., Monif G.R.G. (2001). *Understanding the Bacterial Flora of the Female Genital Tract*. Clinical Infectious Diseases, n. 32, pp. 69–77.

Lea T. (2015). *Caco-2 Cell Line*. In: Verhoeckx K. et al. (eds). *The Impact of Food Bioactives on Health*. Svizzera: Springer. Pp. 103-111.

Macklaim J.M., Gloor G.B., Anukam K.C., Cribby S., Reid G. (2011). *At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of Lactobacillus*

iners AB-1. Proceedings of National Academic of Sciences, n. 108, suppl. 1, pp. 4688–4695.

MacPhee R.A., Hummelen R., Bisanz J.E., Miller W.L., Reid G. (2010). *Probiotic strategies for the treatment and prevention of bacterial vaginosis*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, n. 11, pp. 2985-2995.

Maisey H.C., Doran K.S., Nizet V. (2008). *Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence*. Expert Reviews in Molecular Medicine, n. 10, pp. 1-27.

Malin M., Suomalainen H., Saxelin M., Isolauri E. (1996). *Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with Lactobacillus GG*. Annals of Nutrition and Metabolism, n. 40, pp. 137–145.

Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.K., Holzapfel W.H. (2008). *Functional characteristics of Lactobacillus spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya*. International Journal of Food Microbiology, n. 126, pp. 57–64.

Mattia A., Merker R. (2008). *Regulation of probiotic substances as ingredients in foods: premarket approval or "Generally Recognized as Safe" notification*. Clinical Infectious Diseases, n. 46, pp. 115–118.

McGroarty J. A., Reid G. (1988). *Detection of Lactobacillus substance that inhibits Escherichia coli*. Can. J. Microbiol., n. 34, pp. 974–978.

McIntosh G.H. (1996). *Probiotics and colon cancer prevention*. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, n. 5, pp. 48-52.

Mendes-Soares H., Suzuki H., Hickey R.J., Forney L.J. (2014). *Comparative functional genomics of Lactobacillus spp. reveals possible mechanisms for specialization of vaginal lactobacilli to their environment*. Journal of

Bacteriology, n. 196, pp. 1458–1470.

Mitchell C., Marrazzo J. (2014). *Bacterial vaginosis and the cervicovaginal immune response*. American Journal of Reproductive Immunology, n. 71, pp. 555–563.

Morelli L., Cesena C., Lucchini F., Callegari M.L. (1997). *Role of cell aggregation protein in adhesion in vitro and in vivo*. In: Novel Methods for Probiotic Research, 2nd Workshop FAIR CT96-1028, PROBDEMO, p. 63. Technical Research Centre of Finland, Espoo.

Nardini P., Palomino, R.A.N., Parolin C., Laghi L., Foschi C., Cevenini R., Vitali B., Marangoni A. (2016). *Lactobacillus crispatus inhibits the infectivity of Chlamydia trachomatis elementary bodies, in vitro study*. Scientific Reports, n. 6, pp. 24-38.

Nikolaitchouk N., Andersch B., Falsen E., Strömbeck L., Mattsby-Baltzer I. (2008). *The lower genital tract microbiota an in relation to cytokine, SLPI and endotoxin levels: application of checkerboard DNA–DNA hybridization (CDH)*. APMIS, n. 116, pp. 263–277.

Noriega L., Cuevas I., Margolles A., De los Reyes-Gavilán C.G. (2006). *Deconjugation and bile salts hydrolase activity by Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile*. International Dairy Journal, n. 16, pp. 850-855.

Onderdonk A.B., Delaney M. L., Fichorova R.N. (2016). *The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis*. Clinical Microbiology Reviews, vol. 29, n. 2, pp. 223–238.

Osset J., Bartolomé R. M., García E., Andreu A. (2001). *Assessment of the capacity of Lactobacillus to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells*. Journal of Infectious Diseases, n. 183,

pp. 485–491.

Paavonen J. (1982). *Physiology and ecology of the vagina*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, vol. 14, suppl. 40, pp. 31-35.

Parolin C., Marangoni A., Laghi L., Foschi C., Palomino R.A.N., Calonghi N., Cevenini R., Vitali B. (2015). *Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-Candida activity*. PLoS ONE, vol. 10(6), pp. 1-17.

Patrignani F., Modesto M., Michelini S., Sansosti M.S, Serrazanetti D.I., Qvirist L., Siroli L., Camprini L., Mattarelli P., Lanciotti R. (2018). *Technological potential of Bifidobacterium aesculapii strains for fermented soymilk production*. Food Science and Technology, n. 89, pp. 689–696.

Patrignani F., Siroli L., Parolin C., Serrazanetti D.I., Vitali B., Lanciotti R. (2019). *Use of Lactobacillus crispatus to produce a probiotic cheese as potential gender food for preventing gynaecological infections*. PLoS ONE, n. 14, suppl. 1, pp. 1-19.

Phukan N., Parsamand T., Brooks A. E., Nguyen T. N., Simoes-Barbosa A. (2013). *The adherence of Trichomonas vaginalis to host ectocervical cells is influenced by lactobacilli*. Sexually Transmitted Infections, n. 89, pp. 455–459.

Price C.E., Reid S.J., Driessen A.J., Abratt V.R. (2006). *The Bifidobacterium longum NCIMB 702259T ctr gen codes for a novel cholate transporter*. Applied and Environmental Microbiology, n. 72, pp. 923-926.

Randelovic G., Mladenovic V., Ristic L., Otasevic S., Brankovic S., Mladenovic-Antic S., Bogdanovic M., Bogdanovic D. (2012). *Microbiological aspects of vulvo-vaginitis in prepubertal girls*. European Journal of Pediatrics, vol. 171, pp. 1203–1208.

Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S., McCulle S.L.,

Karlebach S., Gorle R., Russell J., Tacket C.O., Brotman R.M., Davis C.C., Ault K., Peralta L., Forney L.J. (2011). *Vaginal microbiome of reproductive-age women*. Proceedings of the National Academy of Sciences, n. 108, suppl. 1, pp. 4680-4687.

Redondo-López V., Cook R.L., Sobel J.D. (1990). *Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacteria microflora*. Review of Infectious Diseases, n. 12, pp. 856–872.

Regolamento di Esecuzione (UE) n. 562/2012 della Commissione del 27 giugno 2012, che modifica il regolamento (UE) n. 234/2011 relativamente ai dati specifici necessari alla valutazione dei rischi degli enzimi alimentari.

Reid G., McGroarty J.A., Tomczek L., Bruce A.W. (1996). *Identification and plasmid profiles of Lactobacillus species from the vagina of 100 healthy women*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, n. 15, pp. 23–26.

Reid G., Servin A.L., Bruce A.W., Busscher H.J. (1993). *Adhesion of three Lactobacillus strains to human urinary and intestinal epithelial cells*. Microbios, n. 75, pp. 57–65.

Rowland I.R., Rumney C.J., Coutts J.T., Lievens L.C. (1998). *Effect of Bifidobacterium longum and inulin in gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats*. Carcinogenesis, n. 19, pp. 281-285.

Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Mattila-Sandholm T. (2000). *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties*. Journal of Biotechnology, n. 84, pp. 197 –215.

Salminen S., Isolauri E., Salminen E. (1996). *Probiotics and stabilisation of the gut mucosal barrier*. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, n. 5, pp. 53– 56.

Sánchez B., De los Reyes-Gavilán C.G., Margolles A. (2006). *The F1F0-*

ATPase of Bifidobacterium animalis is involved in bile tolerance. Environmental Microbiology, n. 8, pp. 1825-1833.

Savaiano D.A., Abdelhak AbouElanouar D.A.G., Smith D.E., Levitt M.D. (1984). *Lactose malabsorption from yoghurt, pasteurised yoghurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. The American Journal of Clinical Nutrition, n. 40, pp. 1219-1223.*

Schiffrin E.J., Rochat F., Link-Angler H., Acschlimann J.M., Donnet-Hughes A. (1995). Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science, n. 78, pp. 491–497.*

Schillinger U., Guigas C., Holzapfel W.H. (2005). *In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. International Dairy Journal, n. 15, pp. 1289–1297.*

Schubert K., Olde Damink S.W.M., von Bergen M., Schaap F.G. (2017). *Interactions between bile salts, gut microbiota, and hepatic innate immunity. Immunological Reviews, n. 279, pp. 23–35.*

Sgibnev A., Kremleva E. (2016). *Influence of hydrogen peroxide, lactic acid, and surfactants from vaginal lactobacilli on the antibiotic sensitivity of opportunistic bacteria. Probiotics and Antimicrobial Proteins, n. 9, pp. 131–141.*

Shinde T., Madhur R.V.D. Shastri, Perera A. P., Tristram S., Stanley R., Eri R. (2019). *Probiotic Bacillus coagulans MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. Journal of Functional Foods, n. 52, pp. 100–108.*

Siroli L., Patrignani F, Serrazanetti D.I., Parolin C., Palomino R. A. N., Vitali B., Lanciotti R. (2017). *Determination of Antibacterial and Technological*

Properties of Vaginal Lactobacilli for their Potential Application in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, n. 166, pp. 1-12.

Spear G.T., French A.L., Gilbert D., Zariffard M.R., Mirmonsef P., Sullivan T.H., Spear W.W., Landay A., Micci S., Lee B.H., Hamaker B.R. (2014). *Human alpha-amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by Lactobacillus.* *Journal of Infectious Diseases*, n. 210, 1019-1028.

Stiles M.E., Holzapfel W.H. (1996). *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy.* *International Journal of Food Microbiology*, n. 36, pp. 1- 29.

Tabanelli G., Patrignani F., Vinderola G., Reinheimer J.A., Gardini F., Lanciotti R. (2013). *Effect of sub-lethal high pressure homogenization treatments on the in vitro functional and biological properties of lactic acid bacteria.* *LWT - Food Science and Technology*, n. 53, pp. 580-586.

Tagg J. R., Dajani A. S., Wannamaker L. W. (1976). *Bacteriocins of gram-positive bacteria.* *Bacteriological Reviews*, n. 40, pp. 722–756.

Taha T.E., Hoover D.R., Dallabetta G.A., Kumwenda N.I., Mtimavalye L.A., Yang L.P., Liomba G.N., Broadhead R.L., Chipangwi J.D., Miotti P.G. (1998). *Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV.* *AIDS*, n. 12, pp. 1699-1706.

Talarico T.L, Dobrogosz W.J. (1989). *Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by Lactobacillus reuteri.* *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, n.5, vol. 33, pp. 674-679.

Tan Y., Leonhard M., Ma S., Schneider-Stickler B. (2016). *Influence of culture conditions for clinically isolated non-albicans Candida biofilm formation.* *Journal of Microbiological Methods*, n. 130, pp. 123–128.

Taranto M.P., Fernández-Murga M.L., Lorca G., de Valdez G.F. (2003). *Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of Lactobacillus reuteri*. Journal of Applied Microbiology, n. 95, pp. 86-91.

Taranto M.P., Pérez-Martínez G., Font de Valdez G. (2006). *Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration*. Research in Microbiology, n. 157, pp. 720-725.

Tomotari M. (1984). *Taxonomy and Ecology of Bifidobacteria*. Bifidobacteria Microflora, vol. 3(1), pp. 11-28.

Tuomola E.M., Salminen S.J., (1998). *Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures*. International Journal of Food Microbiology, n. 41, pp. 45 –51.

Vazquez-Fresno R., Llorach L., Marinic J., Tulipani S., Garcia-Aloy M., Espinosa-Martos I., Jiménez E., Rodriguez J.M., Andres-Lacueva C. (2014). *Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis*. Pharmacological researches, n. 87, pp.160-165.

Vitali B., Cruciani F., Baldassarre M.E., Capursi T., Spisni E., Valerii M.C., Candela M., Turrone S., Brigidi P. (2012). *Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion*. BMC Microbiology, n. 12, pp. 1-14.

Wenjun L., Huili P., Heping Z. and Yimin C. (2014). *Lactic acid bacteria fundamental and practice*. Edizione 1, Svizzera: Springer. Cap. 2, pp. 103-203.

Witkin S.S., Mendes-Soares H., Linhares I.M., Jayaram A., Ledger W.J., Forney L.J. (2013). *Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections*. MBio, n. 4, pp. 1-7.

Workowski K. A., Berman, S. (2010). *Sexually transmitted diseases treatment guidelines*. MMWR Recommendations and Reports, n. 59, pp. 1–110.

Yahfoufi N., Mallet J., Graham E., Matar C. (2018). *Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation*. Current Opinion in Food Science, n. 20, pp. 82–91.

Younes J. A., Lievens E., Hummelen R., van der Westen R., Reid G., Petrova M.I. (2017). *Women and Their Microbes: The Unexpected Friendship*. Trends in Microbiology, n. 1490, pp. 1-17.

Zarate G., Nader-Macias M. E. (2006). *Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells*. Letters in Applied Microbiology, vol. 43, pp. 174–180.