



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

NMBU Veterinærhøgskolen
Institutt for parakliniske fag
Mattrygghet

Fordypningsoppgave 2023, 15pt
Fordypning Produksjonsdyr og mattrygghet

Positive og negative effekter av probiotika hos mennesker

Positive and negative effects of probiotics in humans

Idun Gjøby
Kull 2018

Marina Elisabeth Aspholm og Yngvild Wasteson

Innholdsfortegnelse

SAMMENDRAG	4
SUMMARY	4
FORKORTELSER	5
1 INNLEDNING	6
1.1 MATERIALER OG METODER	6
1.2 PROBIOTIKA	7
1.2.1 Hva er probiotika?	7
1.2.2 Probiotikas historie	7
2 TARMENS NATURLIGE MIKROBER	8
2.1 OPPBYGNING AV TARMFLORAEN	8
2.2 TARMFLORAENS FUNKSJONER	8
2.2.1 Fordøyelse	8
2.2.2 Immunforsvar	9
3 PROBIOTIKAS EGENSKAPER	9
3.1.1 Så hvorfor trenger vi probiotika når vi har vår naturlige tarmflora?	9
3.1.2 Hvilke funksjoner har probiotiske bakterier i tarmen?	10
4 TARMFLORAENS UTVIKLING	10
4.1.1 Hos spedbarn	10
4.1.2 Fra spedbarn til voksent menneske	12
5 BRUK AV PROBIOTIKA TIL MENNESKER	12
5.1 PROBIOTIKA TIL SPEDBARN?	13
5.1.1 Risikovurdering av probiotika til barn under ett år i Norge	13
5.1.2 Hvordan brukes probiotika til spedbarn i dag?	13
6 POSITIVE EFFEKTER VED BRUK AV PROBIOTIKA	14
6.1 AKUTT GASTROENTERITT	14
6.2 ANTIBIOTIKA-ASSOSIERT DIARÉ (AAD)	14
6.3 NEONATAL SEPSIS OG NEKROTISERENDE ENTEROCOLITT (NEC)	14
6.4 IRRITABEL BOWEL SYNDROME (IBS)	15
6.5 SPEDBARNSKOLIKK	15
6.6 OPPSUMMERING AV POSITIVE EFFEKTER AV PROBIOTIKA	15
7 NEGATIVE EFFEKTER VED BRUK AV PROBIOTIKA	17
7.1 SEPSIS	17
7.2 ENDOKARDITT	17
7.3 GASTROINTESTINAL ISKEMI	18
7.4 ALLERGISKE REAKSJONER	18
7.5 ANTIBIOTIKARESISTENS	18
7.6 OPPSUMMERING NEGATIVE EFFEKTER	19
8 PROBIOTISKE PREPARATER PÅ MARKEDET	20
Tabell 3: Oversikt over ulike probiotiske preparater og deres innhold av bakterier	20

9	LABFORSØK 1	21
9.1	RESULTATER	25
9.2	DISKUSJON	27
10	LABFORSØK 2	33
10.1	RESULTATER	34
10.2	DISKUSJON	35
11	AVSLUTNING	36
11.1	TAKK TIL BIDRAGSYTERE	36
12	REFERANSER	37

Sammendrag

Tittel: Positive og negative effekter av probiotika hos mennesker

Forfatter: Idun Gjøby

Veileder: Marina Elisabeth Aspholm og Yngvild Wasteson, institutt for parakliniske fag

I de senere årene har markedet for probiotiske preparater opplevd betydelig vekst, parallelt med den økende interessen rundt probiotika. Probiotika representerer et komplekst og lovende område innen medisinsk forskning. Den tilgjengelige forskningen tyder på at probiotika har mange positive helseeffekter både til bruk ved forebyggende behandling og som behandling av ulike tilstander og sykdommer. Forskningen viser spesielt positive effekter assosiert ved forebygging og behandling av: akutt gastroenteritt, antibiotika-assosiert diaré, neonatal sepsis, nekrotiserende enterocolitt, irritable bowel syndrome og spedbarnskolikk. Det er også viktig å merke seg at probiotika i enkelte, men sjeldne tilfeller, kan forårsake alvorlig sykdom hos immunsvake og alvorlig syke individer. Imidlertid er det viktig å erkjenne kompleksiteten i tarmfloraens dynamikk og hvordan den påvirkes av blant annet individuelle faktorer som helsestatus, genetikk og kosthold. Denne variasjonen gjør det utfordrende å generalisere probiotikas effekter til hver enkelt person. Videre forskning er nødvendig for å avdekke hvilke spesifikke kombinasjoner og doseringer som er mest effektive for å forebygge og behandle enkelte sykdommer.

Summary

Title: Positive and negative effects of probiotics in humans

Author: Idun Gjøby

Supervisors: Marina Elisabeth Aspholm and Yngvild Wasteson, Department of Paraclinical Science

In recent years, the market for probiotic supplements has experienced significant growth, in parallel with the increasing popularity of probiotics. Probiotics represent a complex and promising field in medical research. Available research suggests that probiotics have many positive health effects, both in preventive treatment and in the treatment of various conditions and disease. Research particularly indicates positive effects associated with prevention and treatment of acute gastroenteritis, antibiotic-associated diarrhea, neonatal sepsis, necrotizing enterocolitis, irritable bowel syndrome and infantile colic. It is important to note that some

rare cases, probiotics can cause severe illness in immunocompromised and severely ill individuals. However, recognizing the complexity of the dynamics of the gut flora and how it is influenced by factors such as individual health status, genetics and diet is crucial. This variation makes it challenging to generalize the effects of probiotics to each individual. Further research is needed to uncover specific combinations and dosages that are most effective in preventing and treating certain diseases.

Forkortelser

AAD	Antibiotika-assosiert diaré
AD	Atopisk dermatitt
EFSA	European Food Safety Authority
FAO	Food and Agriculture Organization (FNs organisasjon for ernæring og landbruk)
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IBS	Irritable Bowel Syndrome
Maldi-ToF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight
MRS-agar	Man, Rogosa, and Sharpe-agar
MT	Mattilsynet
NEC	Nekrotiserende enterocolitt
QPS	Qualified Presumption of Safety
VKM	Vitenskapskomiteen for mat og miljø
WHO	World Health Organisation (Verdens helseorganisasjon)

1 Innledning

Markedet og interessen for probiotiske produkter har økt kraftig de siste årene. Til tross for den økende populariteten eksisterer det motstridende kliniske resultater knyttet til effektene. Probiotika utgjør en kompleks gruppe, som inkluderer mange ulike slekter og stammer av bakterier og sopp. Denne mangfoldigheten skaper en utfordrende situasjon, da det blir komplisert å trekke klare konklusjoner om deres effekter på helse hos mennesker. Denne litteraturstudien tar for seg både positive og negative effekter av ulike probiotiske bakterier og sopp hos spedbarn, og gir en omfattende gjennomgang, belysning og oppsummering av disse aspektene. Hensikten er å sammenfatte den tilgjengelige forskningen på området, og gi innsikt i den komplekse problemstillingen rundt bruken av probiotika hos spedbarn.

1.1 Materialer og metoder

Studien er i hovedsak et litteraturstudie som innledningsvis tar for seg definisjon og historien til probiotika, etterfulgt av tarmens naturlige mikroorganismer og utvikling, og deretter presentasjon av artikler og litteratur om effektene av probiotika hos spedbarn. Avslutningsvis tar fordypningsoppgaven for seg to lab-forsøk hvor innhold av to probiotiske preparater er undersøkt.

Metodene for studien er litteratursøk i søkemotorene PubMed og GoogleScholar, med ulike kombinasjoner av søkeordene «probiotics», «effects», «infant», «neonate», «newborn», «premature», «caesarean section», «microbiota», «bifidobacterium» og «lactobacillus». Dette var utgangspunktet i begynnelsen av prosessen for å finne aktuelle artikler. Søkeordene ble brukt i flere kombinasjoner. I tillegg ble også artikler funnet via referanselisten i andre artikler.

For grunnleggende bakgrunnsinformasjon er ikke publiseringsdato brukt som eksklusjonskriterium, men for litteratur om effekter av probiotika har fokus vært utgivelser publisert de siste 10-15 årene. Årsaken til dette er at forskning på dette fagfeltet har utviklet seg mye i løpet av denne perioden.

1.2 Probiotika

1.2.1 Hva er probiotika?

Probiotika er definert av FNs organisasjon for ernæring og landbruk (FAO) og Verdens helseorganisasjon (WHO) som levende mikroorganismer som i rimelige mengder kan være helsefremmende for verten de tilføres (Lyons et al., 2020). Mange kjenner probiotika i form av melkesyrebakterier i kommersielle produkter som Biola, Cultura, kefir og yoghurt. Realiteten er at probiotika inkluderer en lang rekke av ulike bakterie- (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, noen *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*) og gjær-slekter (*Saccharomyces*) (Kothari, D. et al., 2019). De slektene som tradisjonelt sett er mest brukt i probiotika-produkter og som det er mest forsket på er *Lactobacillus* og *Bifidobacterium*, hvor noen av de viktigste artene inkluderer: *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *L. rhamnosus* (vanligste i USA), *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* og *L. salivarius* (Lyons et al., 2020). Hvor Infloran (en kombinasjon av *L. acidophilus* og *B. bifidum*) er blant de mest undersøkte probiotika-produktene i USA (Patel & Underwood, 2018).

Prebiotika og probiotika er to begreper som ofte forveksles. Denne oppgaven omhandler probiotika, det er derfor viktig å ha klart for seg begrepenes betydning. Prebiotika er mat som gir næring til tarmbakteriene våre og på denne måten gir støtte til en sunn tarmflora, mens probiotika er helsefremmende bakterier som tilføres tarmen via maten vi spiser (SNL, 2021b). Både prebiotika og probiotika er viktig for å opprettholde en sunn tarmhelse.

1.2.2 Probiotikas historie

Hippokrates, levde fra 460 f.Kr – 377 f.Kr (SNL, 2021a), er den første kjente personen som uttalte seg om tarmfloraen og dens påvirkning på mennesker, med uttalelsene: «death sits in the bowel» og «bad digestion is the root of all evil». Men det var ikke før 1857 at Louis Pasteur, kjemiker og bakteriolog, oppdaget fermentering. Han skjønnte at gjærceller kunne omdanne sukker til alkohol og karbondioksid. Og at vin, med hjelp av mikroorganismer, ble omgjort til eddiksyre (UiO, 2011). Élie Metchnikoff, mikrobiolog, begynte å undersøke positive effekter av bakterier fremstilt ved fermentering på menneskehelse. I 1953 ble ordet probiotika innført av den tyske forskeren Werner Kollath, med definisjonen «active substances that are essential for a healthy development of life». Senere, i 1965, ble

definisjonen endret av Daniel M. Lilly og Rosalie H. Stillwell til «substances secreted by one organism which stimulate the growth of another» (Lilly & Stillwell, 1965). Og senest i 1992 kom definisjonen, av Fuller, som ligner definisjonen som vi i dag kjenner best til «a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance» (Gasbarrini et al., 2016).

2 Tarmens naturlige mikrober

For å forstå hvilke effekter probiotika kan ha, er det nyttig å ha kunnskap om og forstå hvordan tarmens naturlige tarmflora er bygget opp, og hva dens funksjoner er.

2.1 Oppbygning av tarmfloraen

Tarmfloraen hos voksne mennesker består av så mange som 100 billioner mikroorganismer (Shu et al., 2019), som omfatter over 1500 forskjellige arter. Disse inkluderer både bakterier, virus, sopp, protister og archaea (Gomaa, 2020). Bakteriene kan klassifiseres i fire overordnede grupper som inkluderer 98% av tarmens mikrober: Proteobacteria (*Escherichia ssp.*, *Enterobacteriaceae ssp.*, *Shigella ssp.*), Actinobacteria (*Bifidobacterium ssp.*), Firmicutes (*Lactobacillus ssp.*, *Streptococcus ssp.*) og Bacteroidetes (*Bacteroides ssp.*). Sammensetningen av disse bakteriene endrer seg gjennom livet.

Tarmfloraen hos nyfødte domineres av Proteobacteria, etter noen uker dominerer Actinobacteria, og i en alder av to-tre år begynner tarmfloraen å ligne tarmfloraen til et voksent menneske, hvor Firmicutes og Bacteroidetes dominerer (Shu et al., 2019). Hvor kommer alle disse bakteriene fra, og hvilke faktorer påvirkes de av? Det er mange faktorer som påvirker tarmfloraen vår, inkludert fødselsmetode (vaginal fødsel vs keisersnitt), ernæring i spedbarnsperioden (morsmelk vs morsmelkerstatning), diett/livsstil, fysisk aktivitet, antibiotikabruk, vaksiner, røyking og eksponering for patogener og andre miljøbakterier.

2.2 Tarmfloraens funksjoner

2.2.1 Fordøyelse

Kroppen vår trenger energi for å leve. Energi finnes i karbohydrater, fett og proteiner, som vi får i oss fra maten vi spiser. For å nyttiggjøre seg av energien i disse molekylene er vi

avhengige av en fungerende fordøyelse. Tarmfloraen er en viktig del av fordøyelsen, og sørger blant annet for nedbrytning og omsetning av næringsstoffer. I tillegg bidrar tarmfloraen til utvikling av tarmtotter, produksjon av proteiner som bidrar til transport av suktermolekyler i tarmepitelet og til utvikling av kapillærer i tarmveggen. En godt balansert sammensetning av bakterier i tarmen er derfor viktig for en velfungerende fordøyelse. Noen vanlige årsaker til forstyrrelser av tarmfloraen er sykdom, anatomiske forhold eller antibiotikabehandling (SNL, 2020; SNL, 2022b).

2.2.2 Immunforsvar

Tarmfloraen spiller også en viktig rolle som en del av immunforsvaret vårt. Slimhinnen i tarmen blir kontinuerlig eksponert for mikroorganismer fra maten vi får i oss. Tarmfloraen utgjør en beskyttende barriere ved å fysisk okkupere plass i tarmen og utnytte tilgjengelige næringsstoffer, som gjør det vanskeligere for patogene mikroorganismer å etablere seg. Tarmfloraen har flere viktige roller som er viktig for immunforsvaret. Blant annet stimulerer tarmfloraen til utvikling av Peyerske flekker, som er områder i tarmen med høy tetthet av hvite blodceller. I tillegg bidrar tarmfloraen til en rekke reaksjoner som fører til økt produksjon av antistoffer, og til produksjon av kortkjedete fettsyrer som gir energi til tarmcellene og som har betennelsesdempende effekter (SNL, 2022b).

3 Probiotikas egenskaper

3.1.1 Så hvorfor trenger vi probiotika når vi har vår naturlige tarmflora?

Tarmfloraen er en svært viktig bidragsyter for utvikling og optimalisering av immunforsvaret vårt. Forstyrrelser av tarmfloraen (dysbiose) er assosiert med utvikling av blant annet matallergier (Shu et al., 2019), inflammatorisk tarmsykdom (IBD), overvekt og diabetes (Gomaa, 2020). Som vi nå vet, påvirkes tarmfloraen vår av mange komponenter, og det er derfor mange årsaker til eventuell dysbiose. En av de viktigste komponentene for utvikling av tarmfloraen er oralt inntak av bakterier, som spedbarn via morsmelk eller morsmelkerstatning og senere i livet via maten vi spiser. Hos mennesker med dysbiose (av ulike årsaker), vil det derfor være hensiktsmessig å tenke at tilskudd med probiotika vil kunne bidra til å utvikle og opprettholde en gunstig sammensetning av bakterier for å gi verten et godt utgangspunkt for immunsystemet i tarmen. Siden tarmfloraen hele tiden er under påvirkning og dermed under

endring, vil det være hensiktsmessig å tro at sammensetningen av bakteriene som tilføres vil ha mye å si for hvilken effekt man vil få.

3.1.2 Hvilke funksjoner har probiotiske bakterier i tarmen?

De probiotiske bakteriene har en rekke funksjoner i tarmen, men det finnes mange ulike typer, og hver av dem har sine spesialiteter. Sammen har de følgende funksjoner i tarmen:

1. Oppregulering av gener som gir cellebeskyttende egenskaper.
2. Nedregulering av betennelsesfremmende genekspressjon.
3. Sørge for syrning av tarmmiljøet ved å produsere butyrat (smørsyre) og andre kortkjedete fettsyrer. Dette gir et miljø med lavere pH og mindre oksygen, noe som gjør det vanskeligere for patogener som blant annet *Enterobacteriaceae ssp.* å formere seg der.
4. Bidrar til å styrke epitelbarrieren i tarmen ved å kontrollere epitelcelle proliferasjon.
5. Konkurransen med andre mikrober ved å binde seg til epitelceller og tarmslimhinnen, og sørge for at andre mikrober ikke kan feste seg der.
6. Regulering av cellulær immunitet og Th1:Th2-balanse.

(Patel & Underwood, 2018) (Shu et al., 2019) (Gomaa, 2020)

4 Tarmfloraens utvikling

4.1.1 Hos spedbarn

4.1.1.1 Fødselen

Den største kilden til bakterier for nyfødte barn som er født vaginalt er nettopp selve fødselen. Fødselsmetoden spiller en viktig rolle for hvilke bakterier et spedbarn utsettes for, og eksponeringen har stor innflytelse på hvordan tarmfloraen utvikler seg.

Bakteriefloraen på den vaginale slimhinnen påvirkes av hormoner som produseres gjennom graviditeten. De bakteriene som dominerer på slimhinnen ved fødsel er *Lactobacillus ssp.* (*L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* og *L. johnsonii*), *Clostridier*, *Bacterioidales* og *Actinomycetales*. Ved vaginal fødsel vil barnet eksponeres for disse bakteriene, og tarmfloraen vil videre påvirkes på bakgrunn av dette.

Barn som fødes med keisersnitt går glipp av denne eksponeringen, men blir derimot eksponert for bakterier som finnes på morens hud. Disse bakteriene inkluderer *Staphylococcus*, *Corynebacterium* og *Propionibacterium ssp.*. Resultatet av keisersnitt som fødselsmetode er lavere mikrobiologisk variasjon, og dermed lavere motstandsdyktighet mot patogene bakterier (Adak & Khan, 2019).

På grunn av kompleksiteten bak sammensetningen av tarmfloraen er det vanskelig å si noe om hvilke bakterier som dominerer på et generelt grunnlag, men i en studie gjort på 88 amerikanske spedbarn innen 16 timer etter fødselen, ble de vanligste artene i tarmfloraen identifisert til *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* og *Bacteroides vulgatus* (Bittinger et al., 2020).

4.1.1.2 Morsmelk

Morsmelk er bygget opp av mange komponenter: næringsstoffer (vann, karbohydrater, proteiner, lipider, vitaminer og mineraler), bioaktive stoffer (immunoglobuliner, HMOs, hvite blodceller, antimikrobielle peptider, MiRNAs) og kommensale bakterier (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*). Sammensetningen av morsmelk er viktig av mange grunner. For eksempel vil mengden karbohydrat (laktose) påvirke bakterieveksten. Sammensetningen av næringsstoffene er derfor også viktig for å opprettholde et optimalt nivå av bakterier i melka.

For barn som er født vaginalt er morsmelk den nest største kilden til tilførsel av bakterier til tarmen. For barn som er født med keisersnitt er derimot morsmelken hovedkilden.

Hovedårsaken til dette er rett og slett mangel på direkte kontakt med vagina, men det viser seg også at mengden bakterier i morsmelka de første 16 dagene av laktasjonen er høyere hos mødre som har gjennomgått keisersnitt, med økt mengde *Streptococcus ssp.*, og lavere nivåer av *Bifidobacterium ssp.* (Khodayar-Pardo et al., 2014).

Morsmelkens sammensetning påvirkes av mange faktorer. Før trodde man at morsmelk var en steril væske, og at bakteriene i morsmelken stammet fra kontaminering fra huden til mor. I senere tid har man funnet ut at morsmelken i utgangspunktet inneholder en rekke bakterier som raskt etablerer seg i tarmen og som er en stor bidragsyter til etablering av barnets naturlige tarmflora. Morsmelkens sammensetning påvirkes av flere faktorer som genetik, demografi, helse, diett, fødselsmetode, eksponering for mikrober (Lyons et al., 2020) og antibiotikabruk hos mor (Korpela et al., 2018).

Hos spedbarn er *Bifidobacterium ssp.* viktige komponenter i tarmfloraen. Noe av grunnen til dette er at bakteriene finnes i morsmelk. I tillegg inneholder morsmelken oligosakkarider som

er viktig næring for disse bakteriene. Siden spedbarn hovedsakelig får i seg næring fra melk, tar det derfor ikke lang tid før Bifidobakterier dominerer tarmfloraen deres, hvor overvekten av bakteriene er artene *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum* og *B. breve*. For de spedbarnene som får morsmelkerstatning, har det vist seg at tarmfloraen inneholder mindre andel av *Bifidobacterium ssp.* enn hos de spedbarnene som kun får morsmelk (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017). I tillegg til *Bifidobacterium ssp.* er også *Lactobacillus ssp.* viktige komponenter hos spedbarn som ammer, mens hos spedbarn som får morsmelkerstatning dominerer *Clostridium*, *Granulicatella*, *Ctirobacter*, *Enterobacter* og *Bilophila* (Adak & Khan, 2019).

4.1.2 Fra spedbarn til voksent menneske

Bakteriegruppen Proteobacteria dominerer tarmfloraen hos nyfødte, som inkluderer bakterieslektene *Escherichia ssp.* og *Shigella ssp.*. Etterfulgt av *Bifidobacterium ssp.* som tilhører bakteriegruppen Actinobacteria. I en alder av 3 til 4 måneder er det *Bifidobacterium ssp.* som dominerer, og nivåene kan nå helt opp til og høyere enn 90% av den totale bakteriepopulasjonen i tarmen. Senere vil introduksjon til fast føde bidra til økning av bakterieslektene Bacteroides og Firmicutes, som inkluderer *Lactobacillus ssp.* og *Clostridium ssp.*. Når barnet er rundt 2-3 år vil tarmfloraen ha utviklet seg så mye at den minner om tarmfloraen til et voksent menneske. Da er det Firmicutes (*Enterobacteriaceae ssp.*, *Lactobacillus ssp.*, *Streptococcus ssp.*) og Bacteroidetes (*Bacteroides ssp.*) som dominerer. Og andelen av *Bifidobacterium ssp.* er til sammenligning estimert til å være rundt 4% hos voksne individer (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017). Det er likevel viktig å huske at tarmfloraen er dynamisk og endrer seg på bakgrunn av mange faktorer, og at sammensetningen derfor kan varierer stort mellom individer.

5 Bruk av probiotika til mennesker

De bakterieslektene som oftest brukes som probiotika i dag er *Lactobacillus ssp.* og *Bifidobacterium ssp.*. Noen arter av disse bakterieslektene har fått status GRAS (Generally Recognized As Safe) av FDA (Food and Drug Administration), noen av disse har oppnådd status som QPS (Qualified Presumption of Safety) som er gitt av European Food Safety Authority (EFSA). Følgende arter har oppnådd QPS-status: *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* og *B. longum*. Det betyr at disse artene regnes som trygge å

tilsette i mat av EFSA. Selv om artene regnes som trygge har kun enkelte stammer blitt undersøkt for positive helseeffekter. I de fleste tilfeller hvor ulike stammer er undersøkt, mangler det fremdeles nok forskning til å kunne konkludere med hvilke helseeffekter de gir. Noe av utfordringene ligger i at bakteriestammene ofte gis sammen med andre mikroorganismer eller prebiotika (karbohydrater), som gjør at det er vanskelig å skille på hvilken effekt som kommer av en enkelt bakteriestamme (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017).

5.1 Probiotika til spedbarn?

5.1.1 Risikovurdering av probiotika til barn under ett år i Norge

Effektene av probiotika har lenge vært studert, også for spedbarn, både av forskere og av næringsmiddel- og legemiddelindustrien. Vitenskapskomiteen for mat og miljø (VKM) jobber stadig med risikovurdering ved bruk av probiotika til barn under ett år. Arbeidet er omfattende fordi det finnes utallige bakteriestammer som regnes som probiotiske, hvor variasjonen av egenskaper hos de ulike er stor. Dette gjør at hver enkelt bakteriestamme må vurderes separat. Siden spedbarn ikke har en etablert tarmflora, og et immunsystem som enda ikke er ferdig utviklet, vil de være ekstra sårbare og all påvirkning av tarmflora bør gjøres med stor forsiktighet. Konklusjonen til VKM angående de bakteriestammene som er undersøkt er at vi vet for lite om langtidseffektene til at vi kan si noe om sikkerheten ved bruk til små barn. Mattilsynet (MT) har derfor fattet vedtak om at de undersøkte bakteriestammene ikke kan omsettes til barn under ett år på det norske markedet. De undersøkte bakteriestammene er *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei F19*, *Bifidobacterium lactis Bb12* og *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)* (Mattilsynet, 2012).

5.1.2 Hvordan brukes probiotika til spedbarn i dag?

Noen av de vanligste stammene av probiotiske bakterier som brukes til spedbarn i verden i dag er *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis* og *B. breve*, i tillegg til *Lactobacillus reuteri* og *L. rhamnosus* og *Saccharomyces boulardii*.

Blant de mest studerte bruksområdene finner vi behandling av antibiotika- og *Clostridium-difficile*-assosiert diaré, effekter på «inflammatory bowel disease» (IBD) og «irritable bowel syndrome» (IBS), og forebyggende behandling av sepsis og nekrotiserende enterokolitt. Etablering av en sunn og frisk tarmflora på et tidlig tidspunkt i livet er viktig for hvordan tarmfloraen utvikler seg. All form for påvirkning av tarmfloraen til et spedbarn skal gjøres

med stor forsiktighet da det potensielt vil kunne gi vedvarende konsekvenser senere i livet. Ved manglende tilførsel av bakterier tidlig i livet (for eksempel på grunn av gjennomgått keisersnitt eller manglende tilførsel av morsmelk), vil spørsmålet om tilførsel av probiotika være aktuelt.

6 Positive effekter ved bruk av probiotika

Siden definisjonen av probiotika er «levende mikroorganismer som i rimelige mengder kan være helsefremmende for verten de tilføres», forventes det at alle probiotiske preparater skal ha positive effekter. Men er det egentlig slik? De positive effektene har ofte størst fokus, og en rekke positive effekter har blitt forsket på. Noen av indikasjonene med sterkest assosiasjon til positive effekter er forebygging og/eller behandling av følgende sykdommer:

6.1 Akutt gastroenteritt

Flere studier viser at enkelte preparater kan redusere varigheten av akutt gastroenteritt med omtrent ett døgn hos barn og voksne, særlig de preparatene som inneholder *Lactobacillus rhamnosus*, *Saccharomyces boulardii* (Feizizadeh et al., 2014) og andre *Lactobacillus*-arter (Szajewska et al., 2013). Mens andre studier viser ingen positive effekter ved bruk av *Lactobacillus rhamnosus* (LGG eller R001) alene eller i kombinasjon med *Lactobacillus helveticus* R0052 (Freedman et al., 2018).

6.2 Antibiotika-assosiert diaré (AAD)

Antibiotika-assosiert diaré er en relativt hyppig forekommende bivirkning av antibiotikabehandling, som rammer omtrent 11% av alle barn som har vært gjennom en antibiotikakur (Liu et al., 2018). I en meta-analyse basert på 30 studier fra Kina med totalt 7225 deltagere viste resultatene at forebyggende behandling med probiotika (*Bifidobacterium* *ssp.* alene eller i kombinasjon med andre probiotiske bakterier) gir en betydelig lavere risiko (66% mindre sjans) for å utvikle ADD (Xu et al., 2017).

6.3 Neonatal sepsis og nekrotiserende enterocolitt (NEC)

Neonatal sepsis og nekrotiserende enterocolitt er tilstander som typisk rammer premature spedbarn og kan føre til alvorlig sykdom og i verste fall død. En stor studie (4556 nyfødte) som ble gjennomført på ammende spedbarn i India viste at en kombinasjon av *Lactobacillus*

plantarum PP 11-217 (probiotika) og fruktooligosakkarider (prebiotika) ga økt beskyttelse mot sepsis hos nyfødte (Panigrahi et al., 2017). En annen studie gjennomført i England på svært premature barn (1310 nyfødte) viste at *Bifidobacterium breve* BG-001 ikke ga noen signifikant effekt ved forebygging av nekrotiserende enterocolitt (Costeloe et al., 2016). En tredje studie (over 5000 nyfødte) konkluderte med *Lactobacillus ssp.* alene, eller i kombinasjon med *Bifidobacterium ssp.* ga redusert forekomst av nekrotiserende enterocolitt (AlFaleh & Anabrees, 2014).

6.4 Irritabel bowel syndrome (IBS)

IBS er en kronisk tarmforstyrrelse som påvirker tykktarmen (kolon) og kan gi symptomer som magesmerter, diaré, forstoppelse og oppblåsthet. Tilstanden har uklar etiologi og kan være påvirket av mange faktorer, men forstyrrelser i tarmfloraen kan være en av årsakene. Positive effekter på IBS er assosiert med enkelte probiotiske kombinasjons preparater med *Bifidobacterium ssp.*, *Lactobacillus ssp.* og *Streptococcus ssp.*, og individuelle probiotiske bakterier som *Lactobacillus plantarum* DSM 9843, *Escherichia coli* DSM17252 og *Streptococcus faecium*. Hvilke kombinasjoner, arter og stammer som har best effekt er likevel fremdeles uklart (Ford et al., 2018).

6.5 Spedbarnskolikk

Spedbarnskolikk er en tilstand hos spedbarn, ofte mellom 3 uker til 3 måneder gamle, hvor barnet er urolig og gråter uavbrutt i minimum 3 timer per dag uten en åpenbar grunn. Årsakene er ikke fullt forstått, men antas å ha sammenheng med mage-tarmproblemer. To meta-analyser konkluderte med at bruk av probiotika hos spedbarn med kolikk, som også fikk morsmelk, reduserte uro og gråt med omtrent 1 time per dag, ved 2 ukers behandling med probiotika (Liu et al., 2018). To andre studier gjort på spedbarn som fikk morsmelkerstatning viste ingen reduksjon i uro og gråt ved bruk av *Lactobacillus rhamnosus* GG (Fatheree et al., 2016) og *Lactobacillus reuteri* (Sung et al., 2014).

6.6 Oppsummering av positive effekter av probiotika

Forskning på effektene av probiotika har de siste 25 årene skutt i været. Søk på PubMed begrenset til de siste 25 årene gir 21 808 treff, hvorav 9 997 av publikasjonene er utgitt de siste 5 årene (25.10.23). Det finnes en rekke forskning som viser indikasjon på positive effekter ved bruk av probiotika, både forebyggende og som behandling. De mest studerte og

dokumenterte positive effektene er knyttet til akutt gastroenteritt, antibiotika-assosiert diaré, neonatal sepsis, nekrotiserende enterocolitt, irritable bowel syndrome og spedbarnskolikk. Andre tilstander og sykdommer hvor probiotika i enkelte studier er assosiert med positive effekter er i forbindelse med laktose-intoleranse (Almeida et al., 2012; He et al., 2008), *Clostridium difficile*-assosiert diaré (Plummer et al., 2004), forebygging av dysbiose (Waller et al., 2011), ulcerøs kolitt (Ishikawa et al., 2011), tarmkreft (Rafter et al., 2007), atopisk dermatitt (Sistek et al., 2006), allergi (Singh et al., 2013) og eksem (Dotterud et al., 2010). Det er likevel nødvendig med ytterligere forskning for å fastslå hvilke probiotiske bakterier som, i kombinasjon og doseringer, er mest effektive for forebygging og behandling av ulike sykdommer.

Tabell 1: Oppsummering av de mest dokumenterte positive effektene av probiotika

Tilstand	Probiotika	Effekt	Referanse
Akutt gastroenteritt	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Saccharomyces boulardii</i> og andre Lactobacillus-arter	Reduserer varighet med omtrent 1 døgn	(Feizizadeh et al., 2014) (Szajewska et al., 2013)
Antibiotika-assosiert diaré	<i>Bifidobacterium ssp.</i> alene eller i kombinasjon med andre probiotiske bakterier	Reduserer forekomst med opp mot 66% ved forebyggende behandling	(Xu et al., 2017)
Neonatal sepsis	<i>Lactobacillus plantarum</i> PP 11-217 (i kombinasjon med prebiotika)	Redusert forekomst ved bruk som forebyggende behandling	(Panigrahi et al., 2017)
Nekrotiserende enterocolitt	<i>Lactobacillus ssp.</i> alene, eller i kombinasjon med <i>Bifidobacterium ssp.</i>	Redusert forekomst ved bruk som forebyggende behandling	(AlFaleh & Anabrees, 2014)
IBS	<i>Bifidobacterium ssp.</i> , <i>Lactobacillus ssp.</i> , <i>Streptococcus ssp.</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 9843, <i>Escherichia coli</i> DSM17252 <i>Streptococcus faecium</i>	Reduksjon av symptomer ved bruk som behandling	(Ford et al., 2018)
Kolikk hos spedbarn som får morsmelk	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Reduserer varighet av kolikksymptomer med omtrent 1 time per dag	(Schreck Bird et al., 2017)

7 Negative effekter ved bruk av probiotika

Selv om probiotika vanligvis anses som trygt, kan inntak av probiotika i enkelte tilfeller føre til negative helseeffekter. I og med at forekomsten av negative effekter er sjeldent, er det viktig å ha kjennskap til hvilke konsekvenser det kan få for den enkelte. Det er blant annet rapportert om tilfeller av diaré, oppblåsthet og forstoppelse, allergiske reaksjoner, og infeksjoner med spredning av bakteriene til blodet (sepsis).

7.1 Sepsis

Sepsis, eller blodforgiftning, er en alvorlig systemisk tilstand hvor bakterier eller sopp har havnet i blodet. Tilstanden er svært kritisk, og rammer hyppigere utsatte grupper, som for eksempel premature spedbarn. Faktorer som kan bidra til økt risiko er blant annet dysbiose, svekket immunforsvar, bruk av bredspektret antibiotika eller andre medisiner (Kothari, D. et al., 2019).

Til tross for at probiotika betraktes som gunstige mikroorganismer, har det blitt dokumentert tilfeller hvor bakteriene har utløst sepsis. Noen av de dokumenterte tilfellene er to tilfeller av bakteriemi hos spedbarn med kort tarm-syndrom ved bruk av *Lactobacillus rhamnosus* GG (De Groote et al., 2005; Kunz et al., 2004), to tilfeller av bakteriemi hos nyfødte ved bruk av *Bifidobacterium longum* (Bertelli et al., 2014), ett tilfelle av alvorlig sepsis hos prematurt spedbarn ved bruk av *Escherichia coli* NISSLE strain 1917 (Guenther et al., 2010).

7.2 Endokarditt

Endokarditt er betennelse i hjertet som vanligvis oppstår som følge av spredning av bakterier eller sopp via blodbanen. Tilstanden er svært alvorlig og kan få fatale konsekvenser uten rask behandling. Selv om endokarditt ikke er en vanlig komplikasjon som følge av bruk av probiotika, finnes det enkelttilfeller hvor dette likevel er tilfellet. Noen av tilfellene som er registrert er hos en 30 år gammel mann med revmatisk hjerteklaffsykdom (*Lactobacillus plantarum*) (Shinar et al., 1984), to 53 og 47 år gamle immunosupprimerte pasienter (*Lactobacillus casei*) (Fradiani et al., 2010; Zé-Zé et al., 2004), en 77 år gammel pasient med prostatakreft (Franko et al., 2013) og en 48 år gammel mann med hjertesykdom (Encarnacion et al., 2016).

7.3 Gastrointestinal iskemi

Gastrointestinal iskemi er en tilstand hvor blodtilførselen til mage-tarmkanalen er redusert eller fullstendig blokkert. Dette fører til redusert oksygentilførsel til vevet, og kan dermed gi betydelige skader. I en studie med pasienter med akutt pankreatitt, ble probiotika brukt som del av behandlingen hos omtrent halvparten av pasientene. Hele 9 av totalt 152 pasienter (5,9%) som ble behandlet med probiotika utviklet gastrointestinal iskemi, sammenlignet med 0 av 144 som ikke fikk probiotika (Besselink et al., 2008).

7.4 Allergiske reaksjoner

Allergiske reaksjoner forekommer som et resultat av at kroppens immunforsvar overreagerer på ufarlige stoffer (allergener). Noen av de mest vanlige allergenene er pollen, støv, pels og diverse matvarer. Ved kontakt med allergener vil kroppen til en allergisk person frigjøre immunstoffer (histamin) som medfører utvikling av milde til alvorlige symptomer. Vanlige symptomer kan være nysing, rennende nese, kløende øyne, utslett, astma med mer (SNL, 2022a). Atopisk dermatitt (AD) er en kronisk inflammatorisk hudsykdom som har blitt forsøkt behandlet med probiotika hos barn, noe som har vist seg å ha positiv effekt. Behandlingen er på en annen side forbundet med høyere risiko for utvikling av allergisk rhinitt og mer alvorlig astma enn de som ikke ble behandlet med probiotika (Kalliomäki et al., 2001; Kothari, Damini et al., 2019).

7.5 Antibiotikaresistens

Med antibiotikaresistens menes evnen bakterier eller andre mikroorganismer har til å motvirke effekten av antibiotika, som tidligere har vært effektiv mot dem.

Antibiotikaresistens oppstår over tid, og forekomsten øker ved feildosering og feilaktig bruk. Årsaken til dette er at de mest motstandsdyktige mikroorganismene kan overleve, og videre formere seg. På denne måten vil resistens gradvis utvikles (FHI, 2012). Tilfeller av horisontal gen-overføring av antibiotikaresistens fra probiotiske bakterier til patogene mikrober er registrert. Dette skyldes blant annet at enkelte stammer av *Lactobacillus ssp.* har gener som er motstandsdyktige mot flere typer bredspektret antibiotika (Zheng et al., 2017).

7.6 Oppsummering negative effekter

Selv om probiotika generelt sett betraktes som trygt og gunstig ved bruk er det nødvendig å være forsiktig ved valg av type probiotika og dosering. Dette gjelder særlig ved bruk til utsatte pasienter med nedsatt immunsystem, økt tarmpermeabilitet eller alvorlige sykdommer (Fijan, 2014). Det er verdt å merke seg at probiotika i sjeldne tilfeller kan føre til sykdom. Blant de mest forekommende negative effektene finner vi enkelttilfeller av sepsis hos hjerteopererte pasienter, anafylaktiske allergiske reaksjoner hos sensitive individer, systemisk soppbakteriemi hos eldre immunsvekkede pasienter og økt risiko for genoverføring av antibiotikaresistens til patogene mikroorganismer (Kothari, Damini et al., 2019).

Tabell 2: Oppsummering av de mest dokumenterte negative effektene av probiotika

Tilstand	Probiotika	Forekomst	Referanser
Sepsis	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Escherichia coli</i> NISSLE strain 1917	Svært sjeldent, kun enkelttilfeller registrert hos hjertesye og immunsvekkede individer	(De Groote et al., 2005; Kunz et al., 2004), (Bertelli et al., 2014), (Guenther et al., 2010)
Endokarditt	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Svært sjeldent, kun enkelttilfeller registrert hos hjertesye og immunsvekkede individer	(Shinar et al., 1984), (Fradiani et al., 2010; Zé-Zé et al., 2004), (Franko et al., 2013), (Encarnacion et al., 2016)
Gastrointestinal iskemi	Probiotisk preparat bestående av: <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus case</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Økt forekomst (6%) ved behandling med probiotika hos pasienter med akutt pankreatitt	(Besselink et al., 2008)
Allergiske reaksjoner	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Økt forekomst ved behandling av atopisk dermatitt hos barn	(Kalliomäki et al., 2001; Kothari, Damini et al., 2019)
Antibiotikaresistens	<i>Lactobacillus ssp.</i>	Økt risiko for horisontal genoverføring av antibiotikaresistens fra probiotiske bakterier til patogene mikrober	(Zheng et al., 2017)

8 Probiotiske preparater på markedet

Ved hjelp av et kjapt google-søk finner man fort ut at det finnes utallige preparater på markedet som inneholder probiotiske bakterier. Nå vet vi at «probiotiske bakterier» er et vidt begrep, og at innenfor denne kategorien er det også svært mange ulike bakterier. Så hva består egentlig et «typisk» probiotisk produkt av, i Norge i dag? Under er en tabell over noen av de mest solgte produktene og hvilke bakterier de inneholder.

Tabell 3: Oversikt over ulike probiotiske preparater og deres innhold av bakterier

Probiotiske produkter	Bakterier								Referanser
	<i>Lactobacillus</i>					<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lacticasei-bacillus</i>	
Familie									
Art	<i>acidophilus</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>lactis</i>	<i>bulgaricus</i>	<i>casei</i>	<i>lactis Bb12</i>	<i>thermophilus</i>	<i>paracasei</i>	
Biola	X	X				X			(Tine, 2023)
Arla Cultura	X	X			X	X			(Arla, 2023)
Activia			X	X		X	X		(Activia, 2023)
BioQ						X			(Matinfo, 2023)
Idoform Travel	X	X		X		X	X		(Farmasiet)
Idoform Voksne og barn		X				X			(Farmasiet)
Idoform Classic plus	X					X		X	(Farmasiet)

Tabellen viser en oversikt over noen av de mest kjente probiotiske produktene på markedet i Norge, og hvilke bakterier disse inneholder.

I tabellen ovenfor kommer det frem at de bakteriestammene som brukes hyppigst er *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* og *Bifidobacterium lactis*.

9 Labforsøk 1

Bakgrunn

Melkesyrebakterier, eller probiotiske bakterier, brukes av mange som et tilskudd for å holde tarmfloraen i balanse. For de fleste er dette mest aktuelt dersom man utsettes for forhold hvor tarmfloraen forstyrres, enten det er på grunn av ferieturer til utlandet, mage-tarm-infeksjoner eller som følge av antibiotikabruk. Produktene på markedet er mange og sammensetningen av produktene varierer også mye, både når det kommer til hvilke probiotiske bakterier som er benyttet, men også i hvilken mengde.

I dette forsøket ønsker jeg å se nærmere sammensetningen av to ulike probiotiske preparater som er beregnet på ulike aldersgrupper. Det ene produktet er beregnet for barn 4-15 år (Preparat A) og det andre er beregnet på voksne over 50 år (Preparat B). For å identifisere flest mulig bakterier fra prøvematerialet skal ulike metoder benyttes for å dyrke de frem. Ulike bakterier har ulike kriterier for å vokse og det er derfor viktig å benytte seg av ulike vekstvilkår for å kunne identifisere flest mulig bakterier.

Blodagar er det mest brukte vekstmediet for å dyrke frem og påvise bakterier. Vekstmediet er en blanding av agar og fem prosent blod som helles over i petriskåler. Etter inkubasjon vil bakteriekulturer kunne vokse frem. Ut ifra kolonienes morfologi vil man kunne få informasjon som er viktig for videre diagnostikk (Tjønum, 2019).

Noen bakterier vokser best ved aerobe forhold, mens andre vokser best ved anaerobe forhold. Prøvematerialet skal derfor dyrkes ut ved hjelp av begge metoder, for å identifisere så mange ulike bakterier fra prøvematerialet som mulig. Inkubering ved 37 grader Celsius velges for å selektivt fremme veksten av bakterier med klinisk relevans ved å etterligne menneskets naturlige kroppstemperatur. I tillegg ønsker vi å utsette noe av prøvematerialet for varmebehandling. Varmebehandlingen dreper de aller fleste bakterier, men sporedannende bakterier vil overleve. Sporedannende bakterier er bakterier som vokser best når den slipper å konkurrere med andre bakterier. Det vil derfor være hensiktsmessig å eliminere andre bakterier for å identifisere disse.

For å identifisere bakteriene i forsøket skal MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) benyttes. Dette er teknologi som bruker massespektrometri for å sekvensere molekyler. Renkulturer av mikroorganismer legges på en metallplate og plasseres deretter inn i maskinen. Maskinen bruker laser for å identifisere ionene som bakteriene består av. Ved hjelp av en database med kjente bakterier sammenligner maskinen renkulturen opp mot arkivet, og vil dermed identifisere bakterien ut fra hvilken bakterie som ligner mest fra databasen (DNV, 2020).

Mål

Målet med forsøket er å undersøke forskjellene mellom to melkesyrebakterie-preparater fra samme produsent beregnet for to ulike aldersgrupper, og kontrollere at innholdet i preparatene stemmer overens med innholdsfortegnelsen.

Materialer

De utvalgte produktene til dette forsøket er to produkter med melkesyrebakterier produsert av Udo's choice, bestilt fra nettsiden www.helsefreak.no. Det ene produktet er beregnet for barn i alderen 4-15 år, mens det andre er beregnet for voksne over 50 år.



Bilde 1: Bildet viser de to ulike melkesyrebakterie-produktene som ble brukt i forsøket. Til venstre er melkesyrebakteriene beregnet for barn 4-15 år, og til høyre er melkesyrebakterier beregnet for voksne over 50 år.

Tabell 4: Oversikt over innholdsfortegnelse for de to utvalgte preparatene til forsøket

Bakterie	Andel (%) melkesyrebakterier barn 4-15 år	Andel (%) melkesyrebakterier voksne 50+
<i>Lactobacillus casei</i>	30	30
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	25	20

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	20	10
<i>Lactobacillus plantarum</i>	10	10
<i>Lactobacillus fermentum</i>	5	0
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5	10
<i>Bifidobacterium breve</i>	5	10
<i>Bifidobacterium longum</i>	0	10

Tabellen viser at innholdet i de to ulike preparatene er relativt like, men at andelen av de ulike bakteriene varierer noe. I tillegg inneholder preparatet beregnet til barn *Lactobacillus fermentum*, noe ikke preparatet til voksne inneholder. Preparatet beregnet til voksne inneholder derimot en liten andel av *Bifidobacterium longum*.

Fremgangsmåte

1. Fortynning

Fortynning av prøvematerialene er en prosess som benyttes for å redusere konsentrasjonen av prøvematerialet ved å tilsette mer løsemiddel. Dette er en nyttig prosess for å spre bakteriene slik at de senere kan danne enkeltkolonier på blodagaren.

- Et sterilt glass plasseres på vekten og nullstilles.
- Kapsler fra produktene tas ut ved hjelp av en steril pinsett, og åpnes med rene hansker for å få ut pulveret som er på innsiden.
- 2 g prøve måles opp fra preparat A og fortynnes med 18 ml PVA (fortynning 1:10).
- Blandingen blandes godt ved hjelp av en pipette.
- Pipettespiss byttes mellom hvert steg.
- 1 ml av fortynningen overføres ved hjelp av en pipette til et nytt glass med 9 ml PVA.
- Gjentas 5 ganger slik at vi får fortynning til og med 10^{-5}
- Samme prosedyre gjenstas for preparat B

2. Dyrkning av bakterier på blodagar

Hver av fortynningene sås ut på tre ulike skåler med 100 μ g (0,1ml) på hver (dette tilsvarer en ny fortynning, og dyrkning fra fortynning 10^{-5} tilsvarer dermed 10^{-6})

- Følgende gjøres for begge preparatene:
 - En pipette forhåndsinnstilles på 100 μ g
 - Seks skåler legges på rekke og merkes med preparat (A eller B) dyrkningsmetode (aerob/anaerob, varmebehandlet/ikke-varmebehandlet), dato og fortynning.

- 100ug av hver fortykning (fra samme preparat) plasseres ut på skålene som samsvarer med deres fortykning
- En L-formet podeøse benyttes for å spre prøvematerialet godt ut over hele skålen
- Lokket plasseres på skålen og skålene med samme preparat og dyrkningsmetode samles
- Samme prosedyre gjennomføres for alle dyrkningsmetodene slik at vi får:
 - Seks skåler til varmebehandling og aerob dyrkning
 - Seks skåler til varmebehandling og anaerob dyrkning
 - Seks skåler uten varmebehandling og aerob dyrkning
 - Seks skåler uten varmebehandling og anaerob dyrkning

3. Varmebehandling

Gjelder kun for de blodagarene som skal til varmebehandling.

- Varmebadet forhåndsvarmes til 70 grader celsius
- Alle skålene plasseres i varmebadet
- En nedtellingsalarm stilles på 20 minutter
- Når nedtellingen er over, tas blodagarene ut av varmebadet

4. Inkubering

Skålene til aerob dyrkning:

- Skålene med samme dyrkningsmetode samles i en stabel
- En plastpose tres over stabelen og merkes med dato
- Plasseres deretter i inkubasjonsskap som er innstilt på 37 grader celsius
- Skålene inkuberes i cirka 24 timer

Skåler til anaerob dyrkning:

- Skålene plasseres i en lufttett boks
- En pose med anaerocult åpnes og legges i den lufttette boksen før lokket settes på
- Den lufttette boksen plasseres i inkubasjonsskap som er innstilt på 37 grader celsius
- Skålene inkuberes i cirka 24 timer

5. Avlesning av kolonier fra skålene etter inkubering i 24 timer

Etter at skålene har gjennomført 24 timer med inkubering i 37 grader skal skålene observeres og antall kolonier skal noteres.

- Skåler uten tegn til kolonivekst plasseres tilbake i inkubasjonsskapet for videre inkubasjon (til dagen etter).
 - Skåler med få kolonier, hvor det er mulig å telle antall (<200 kolonier), avleses og antall kolonier noteres.
 - Skåler med mange kolonier hvor det er vanskelig å telle (>200 kolonier), plukkes en liten del av en koloni med hjelp av en podeøse, og dyrkes ut på en ny blodagarskål og fordeles godt utover. Inkubering gjentas og gjennomføres slik som beskrevet i punkt 4 (inkubering).
6. Enkeltkolonier plukkes ut til MALDI-ToF for sekvensering og identifisering av bakteriene. Koloniene som plukkes ut er de som har størst morfologisk variasjon.
- Legg frem en metallplate spesiallaget for MALDI-ToF
 - Platen desinfiseres med alkohol og skylles deretter med PVA-vann
 - Platen lufttørkes før videre bruk
 - Et notatark benyttes for å notere hvilke kolonier som plasseres på de ulike feltene på metallplaten. Feltene er merket med I1-I4, J1-J4, K1-K4 og L1-L4.
 - En pipette brukes til å plassere 100 μ g matrix-løsning på hvert av prøvefeldene på metallplaten.
 - En steril podeøse benyttes for å plukke materiale fra de forhåndsvalgte enkeltkoloniene og blandes med matrix-løsningen.
 - Platen lufttørker dermed før den plasseres i MALDI-ToF.

9.1 Resultater

Tabell 5: Viser antall kolonier som ble dyrket frem på blodagar

Preparat	A				B		
	Varmebehandlet		Ikke-varmebehandlet		Varmebehandlet		Ikke-varmebehandlet
	Aerob	Anaerob		Aerob	Aerob	Anaerob	Aerob
Fortynning	--	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁸	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹⁰
Antall kolonier	0	1	1	42	Ca 200	60	2
Kimtall		1,0x10 ²	1,0x10 ⁴	4,2x10 ⁹	2,0x10 ⁴	6,0x10 ⁴	2,0x10 ¹⁰

(cfu/ml)							
----------	--	--	--	--	--	--	--

Tabell 5 viser en oversikt over hvilke fortynninger som hadde skåler hvor det var mulig å telle kolonier, antall kolonier og estimert kimtall for disse skålene.

Resultatene i tabell 5 viser antall kolonier for de skålene hvor det var mulig å telle eller anslå antall kolonier. Hvis man ser nærmere på antall kolonier for preparat A, varmebehandlede, anaerobe prøver, ser man at det forekommer én koloni både ved fortynning 10^{-2} og 10^{-4} . Siden man ville forventet færre kolonier ved høyere fortynning, og det ikke forekommer i dette forsøket, vil kimtallet for dette preparatet ligge et sted mellom 100 og 10 000. Hvis man antar at forsøket er utført på korrekt måte, vil dette resultatet være ganske tilfeldig, og ikke gi oss et godt svar på hva kimtallet egentlig er. For å få et mer korrekt resultat ville det vært hensiktsmessig å utføre forsøket på nytt for å få et med nøyaktig svar.

Tabell 6: MALDI-ToF-resultater fra dyrkning på blodagar

Resultater fra MALDI-ToF						
Varmebehandlede prøver						
Preparat A						
Anaerob dyrkning To kolonier	<i>Paenibacillus macerans</i>	Ingen resultat				
Preparat B						
Anaerob dyrkning Seks kolonier	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Ingen resultat	<i>Streptococcus mitis/oralis</i> (50,8%) eller <i>Streptococcus pneumoniae</i> (49,2%)	<i>Streptococcus cristatus</i>
Aerob dyrkning Fire kolonier	<i>Neisseria flava/perflava</i> / <i>subflava</i>	<i>Neisseria flava/perflava/subflava</i>	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>		
Ikke-varmebehandlede prøver						
Preparat A						
Aerob dyrkning To kolonier	<i>Neisseria flava/perflava</i> / <i>subflava</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>				
Preparat B						

Aerob dyrkning To kolonier	<i>Neisseria</i> <i>flava/perflava</i> <i>/subflava</i>	<i>Neisseria</i> <i>flava/perflava/subflava</i>				
-------------------------------	---	--	--	--	--	--

Bakterien som ble identifisert var *Lactobacillus fermentum* fra preparat A. Kolonien vokste på en aerob skål som ikke ble varmebehandlet. De resterende koloniene ble identifisert som ulike arter av *Streptococcus ssp.* (*oralis/mitis*, *gordonii*, *pneumoniae*, *cristatus*) og *Neisseria ssp.* (*flava/subflava/perflava*), som alle er vanlige kontamineringsbakterier fra hud, slimhinner og respirasjonssystemet hos mennesker. *Streptococcus pneumoniae* ble identifisert ved én koloni, med kun 49,2% sikkerhet.

I tillegg ble det identifisert et tilfelle av *Paenibacillus macerans*, som er en sporedannende bakterie som vanligvis forekommer i jord og planter.

De bakteriene som kun vokste ved anaerobe forhold var *Streptococcus* (*gordoni*, *cristatus*, *pneumonia*) og *Paenibacillus macerans*. Mens de bakteriene som kun ble identifisert etter aerob dyrkning var *Lactobacillus fermentum*. Bakteriene som vokste under både aerobe og anaerobe forhold var *Neisseria ssp.*, og *Streptococcus mitis/oralis*.

9.2 Diskusjon

Observasjoner

Bakterier som står oppført i innholdsfortegnelsen, og er forventet å finne var ulike arter av *Lactobacillus ssp.* og *Bifidobacterium ssp.* Kun én av de 16 utplukkede kolonier viste seg å være blant de forventede bakteriene fra innholdsfortegnelsen. Siden innholdsfortegnelse og lab-resultater etter sekvensering av bakteriene avviker, vil det være naturlig å starte med å se grundigere på fakta og vekstvilkår for henholdsvis *Lactobacillus ssp.* og *Bifidobacterium ssp.*.

Lactobacillus ssp.

Om bakterien

Lactobacillus tilhører en slekt av gram-positive, fakultativt anaerobe, ikke-sporedannende stavbakterier. Bakterieslekten kan vokse ved temperaturer fra 2-53 grader og med en pH på 4,5-6,5, men vokser best ved 30-40 grader og med en pH på 5,5-6,2 (Ślizewska & Chlebicz-

Wójcik, 2020). Normalt finnes *Lactobacillus* blant annet i melk, på menneskets slimhinner og i fordøyelsessystemet (Bøvre, 2020).

Melkesyrebakterie

Lactobacillus regnes som melkesyrebakterier, det vil si at bakteriene kan bryte ned enkle suktermolekyler som glukose, fruktose og laktat, og omgjøre de til melkesyre (Tønjum, 2022). Prosessen kalles fermentering og er en form for gjæring hvor suktermolekylene gjennomgår en oksidasjonsprosess hvor molekylene endrer sammensetning slik at egenskapene endres. Næringsstoffer som har gjennomgått fermentering får egenskaper som økt smak, holdbarhet og fordøyelighet (Høberg, 2021). Disse egenskapene er viktig å ha kjennskap til for å forstå hvordan *Lactobacillus* kan være en viktig bidragsyter som en del av tarmfloraen.

Vekstmedium

Lactobacillus ssp. kan vokse på blodagar. Koloniene er grå med alfa-hemolyse og varierer i størrelse fra små til mellomstore (Goldstein et al., 2015). Selv om *Lactobacillus ssp.* kan vokse på blodagar, har blodagar en pH på 7,2-7,6, som er utenfor bakteriens pH-kriterier (4,5-6,5) for vekst.

MRS (Man, Rogosa, and Sharpe)- agar er et annet vekstmedium hvor *Lactobacillus ssp.* vokser. MRS-agar er et kulturmedium som er designet for å dyrke frem *Lactobacillus ssp.* i laboratoriet. Mediet inneholder natriumacetat, som undertrykker vekst av mange andre konkurrerende bakterier (de man, rogosa and sharpe (MRS) agar, 2003). På MRS agar viser *Lactobacillus ssp.* seg som hvite, mukoide kolonier (Goldstein et al., 2015).

Bifidobacterium ssp.

Om bakterien

Bifidobacterium tilhører en slekt av gram-positive, obligate anaerobe, ikke-sporedannende stavbakterier (Sirevåg, 2022). *Bifidobacterium* regnes som strikte anaerobe, oksygen sensitive bakterier. Følsomhet for oksygen varierer likevel mellom artene, og enkelte arter (*B. boum* og *B. thermophilum*) kan vokse med tilstedeværelse av lave nivåer, under 20%, av oksygen (Kawasaki et al., 2006). Bakteriene kan vokse i temperaturer mellom 25-45 grader, men har optimal vekst ved 37-41 grader. Optimal pH for vekst er 6,5-7,0, men bakteriene kan også vokse ved pH 4,5-8,5. Bakterien finnes normalt i avføring og munnslimhinne fra mennesker og dyr (ScienceDirect, 2022).

Melkesyrebakterie?

Bifidobacterium ble tidligere klassifisert som melkesyrebakterier, men har i motsetning til melkesyrebakteriene også evne til å produsere eddiksyre. *Bifidobacterium* har altså en helt egen gjæringsprosess som resulterer i produksjon av både melkesyre og eddiksyre. Denne egenskapen gjør at *Bifidobacterium* kan utnytte suktermolekyler på en enda mer effektiv måte enn melkesyrebakteriene, og får dermed mer energi ut av samme mengde næringsstoff (Sirevåg, 2022).

Vekstmedium

For dyrkning av *Bifidobacterium ssp.* kreves en spesiell type blodagar som kalles Bifidus-blodagar. Denne blodagaren ligner på vanlig blodagar, men inneholder i tillegg suktermolekylet laktulose. Laktulose fermenteres først og fremst av *Bifidobacterium ssp.* Bakterievekst på Bifidus-blodagar er derfor en god indikasjon på at *Bifidobacterium* er til stede. Bakterien vil ikke vokse på vanlig blodagar.

Tabell 7: Oversikt over vekstvilkår

Slekt	Temperatur (optimum)	pH (optimum)	Oksygen	Vekstmedium	Referanser
<i>Lactobacillus ssp.</i>	8-40 (37)	4,5-6,5 (5,5-6,2)	Fakultativt anaerob	MRS agar	(Śliżewska & Chlebicz-Wójcik, 2020)
<i>Bifidobacterium ssp.</i>	25-45 (37-41)	4,5-8,5 (6,5-7,0)	Obligat anaerob	Bifido-blodagar (inneholder laktulose)	(ScienceDirect, 2022)

Produksjonsprosessen

Et essensielt kriterium for at et produkt kan klassifiseres som probiotisk er at mikroorganismene i produktet må være i live ved konsumering. Siden de probiotiske preparatene som ble brukt til dette forsøket var kapsler fylt med pulver, vil det derfor være hensiktsmessig å se nærmere på produksjonsprosessen i forbindelse med produksjon av probiotika i pulverform. Hvilke kriterier er egentlig nødvendig for at mikroorganismer skal overleve i et produkt? Kan levende bakterier overleve som pulverform? Og i så fall hvordan?

Ulike organismer har ulike kriterier for overlevelse. Mikroorganismers evne til å overleve er helt avhengig av tilgang på vann og næringsstoffer, passende temperatur og pH, og tilstedeværelse av veksthemmere. I motsetning til mange andre organismer, har mikroorganismer en helt unik evne til å tilpasse seg og overleve selv om disse kriteriene ikke

er oppfylt. Ved upassende forhold kan mikroorganismene inaktiveres, og fremdeles være i live. Det vil si at de ikke lenger kan vokse, reprodusere seg, eller ha metabolisme, men de har mulighet til å gjenopprette disse egenskapene på et senere tidspunkt, når forholdene igjen ligger til rette for det.

Ved produksjon av probiotiske produkter i pulverform, fjerner man vanntilgangen til mikroorganismene. Da har man fjernet ett kriterium for liv, og bakteriene inaktiveres. Teknologien som benyttes for å utvikle probiotiske produkter i pulverform er en spesiell fryse- og tørke-prosess som utføres i to trinn. I det første trinnet fryses cellene til -40 grader celsius (eller lavere), ved bruk av for eksempel flytende nitrogen. Videre blir det fryste vannet fjernet ved hjelp av sublimasjon, en skånsom prosess hvor is omgjøres direkte til gass ved lav temperatur og lavt trykk. Denne prosessen bidrar til å fjerne vannet rundt og inne i cellene, som igjen fører til at cellene inaktiveres. Teknologien sørger for at ikke alt vannet fjernes, men at vanninnholdet holder seg så lavt at mikroorganismene forblir inaktive.

Når mikroorganismene konsumeres i form av inaktive bakterier, vil bakteriene aktiveres så fort de opplever ideelle levevilkår igjen. Dette skjer når de havner i tarmen, hvor alle kriteriene for liv igjen er tilstede (ISAPP, 2020).

Hva kan årsaken være til at resultatene ikke stemmer overens med forventet resultat?

Dersom identifisering av bakteriene *Lactobacillus ssp.* og *Bifidobacterium ssp.* skal være mulig, forutsettes det at metodene som ble brukt for bakterievekst på laboratoriet samsvarer med bakterienes vekstvilkår. Siden vi nå har sett grundigere på vekstvilkårene disse bakteriene ser vi at *Lactobacillus ssp.* kan vokse på blodagar, men at MRS-agar ville vært bedre egnet da dette er en spesiallaget agar som hemmer vekst av andre konkurrerende bakterier. For dyrkning av *Bifidobacterium ssp.* kreves derimot en helt spesifikk type agar, Bifidus-blodagar. Dette kan forklare hvorfor det ikke ble gjort noen funn av *Bifidobacterium ssp.*, og hvorfor det kun ble identifisert én koloni med *Lactobacillus ssp.* i vårt dyrkningsforsøk.

I de varmebehandlede prøvene ble det identifisert ett tilfelle av sporedannende bakterier, *Paenibacillus macerans*. De resterende bakteriene som ble identifisert fra de varmebehandlede prøvene var *Streptococcus ssp.* og *Neisseria ssp.*, som ikke er

sporedannende bakterier. Siden hensikten med varmebehandlingen var å eliminere forekomst av ikke-sporedannende bakterier, kan dette tyde på feil ved gjennomføringen av forsøket.

Nedenfor er en liste over mulige faktorer som kan ha påvirket dette utfallet:

1. Feil på teknisk utstyr (temperaturen stemmer ikke overens med termometeren på varmebadet)
2. For lav temperatur for eliminering av ikke-sporedannende bakterier
3. For kort tid i varmebadet for eliminering av ikke-sporedannende bakterier
4. Kontaminering med bakterier etter varmebehandling

Etter grundigere undersøkelse av bakterienes temperatortoleranse kan feilkilde være utilstrekkelig tid i varmebadet til å drepe alle bakteriene. Det viser seg at *Streptococcus ssp.* krever minimum 30 minutter varmebehandling for fullstendig eliminering (Wing, 1935). Kontaminering etter varmebehandling er også en sannsynlig feilkilde.

Videre vil det være nyttig å se nærmere på hvor de identifiserte bakteriene naturlig forekommer, og hvordan de eventuelt kan ha kommet inn i forsøket. Under kommer derfor en tabell med en oversikt over de identifiserte bakteriene, deres naturlige forekomst, evne til å forårsake sykdom og vekstvilkår.

Tabell 8: Vekstvilkår og forekomst av de ulike bakteriene som ble identifisert i forsøket

Bakterie	Forekomst	Patogen	Sykdom	Vekstvilkår	Referanser
<i>Streptococcus ssp.</i>					
<i>S. oralis/mitis</i>	Munnslimhinne hos mennesker og dyr	Oppportunistisk patogen	Bakteriemi og endokarditt (særlig hos kreftpasienter)	Fakultativt anaerob Vokser ved 37 grader	(Compendium, 2023)
<i>S. gordonii</i>	Hud, slimhinner, øvre respirasjonssystem, tarm, jord, planter, vann	Oppportunistisk patogen	Periodontitt, endokarditt, septisk artritt, empyem	Fakultativt anaerob Vokser ved 37 grader	(Compendium, 2023)
<i>S. pneumoniae</i>	Øvre del av respirasjonssystemet hos mennesker	Patogen	Respirasjonssykdom, sepsis, meningitt, endokarditt, perikarditt, bakteriemi	Fakultativt anaerob Vokser ved 25-42 grader	(VetBact, 2023)
<i>S. cristatus</i>	Munnslimhinne hos mennesker	Non-patogen (Enkelte tilfeller av sykdom i	Septisk artritt, osteomyelitt, endokarditt	Fakultativt anaerob	(ScienceDirect, 2013)

		litteraturen)		Vokser ved 37 grader	
<i>Neisseria ssp.</i>					
<i>N. flava/subflava/paraflava</i>	Øvre del av respirasjonssystemet hos mennesker	Non-patogen (Enkelte tilfeller av sykdom i litteraturen)	Pneumoni, empyem	Aerob Vokser ved 32-37 grader	(Huang et al., 2014)
<i>Paenibacillus ssp.</i>					
<i>P. macerans</i>	Jord og planter	Opportunistisk patogen, vanligvis non-patogen	Kan forårsake allergier	Fakultativt anaerob, Vokser ved 30-37 grader	(ScienceDirect, 2020)

Hvor kommer kontamineringen fra?

Som vist i tabellen ovenfor ser vi at bakteriene som ble identifisert i forsøket hovedsakelig har sitt naturlige habitat på hud, munnslimhinne og øvre del av respirasjonssystem hos mennesker. *Paenibacillus ssp.* er eneste bakterie med annet habitat på jord og planter. Med denne kunnskapen kan vi med stor sikkerhet si at det meste av kontamineringen kommer fra menneskelig håndtering. De alternative kontamineringspunktene er:

1. I forbindelse med produksjonen av produktene
2. Ved gjennomføring av forsøket

Akkurat hvor og når kontamineringen har funnet sted, er umulig å fastslå. I et produksjonslokale arbeider det ofte mange mennesker, det er mange trinn i produksjonen fra start til slutt og det er derfor mange mulige punkter for kontaminering. På laboratoriet er det færre håndteringspunkter og det er svært få mennesker som håndterer produktet. Mest sannsynlig kontamineringstidspunkt vil derfor antas å være i forbindelse med produksjonen, men dette kan ikke sies med sikkerhet.

Hvis man kan stole på resultatene, hva betyr de?

Er preparatene trygge å spise?

Til tross for at preparatene viser seg å inneholde flere uforutsette bakterier vil preparatene i de fleste tilfeller regnes som trygge å spise. De identifiserte bakteriene som ikke ble forventet å finne, er alle opportunistiske patogener eller non-patogene bakterier. Det vil si at de kun i sjelden tilfeller vil kunne føre til sykdom. Dette gjelder først og fremst sårbare grupper med betydelig svekket immunforsvar. Hos disse gruppene vil det være hensiktsmessig å fraråde

bruk av preparatene. *Streptococcus pneumoniae* er den bakterien som oftest er forbundet med sykdom hos mennesker, men siden denne bakterien kun ble identifisert i én koloni, og med bare 49,2% sikkerhet, vil det være lite sannsynlig at den faktisk forekom i prøvene som ble tatt.

Vil preparatene ha den effekten som produsentene mener de har?

Siden forsøket ikke benyttet seg av vekstmedier som var godt egnet for bakteriene som var oppført i innholdsfortegnelsen, vil det være vanskelig å si noe om mengde og tilstedeværelse av disse bakteriene. Eventuell effekt av produktene må derfor vurderes ut ifra hvilke effekter de ville hatt dersom innholdet samsvarer med innholdsfortegnelse.

På nettsiden www.helsefreak.no står det følgende om produktene: «*Kan brukes for å sikre en god fordøyelse*» (Helsefreak). For å fastslå om dette er et korrekt utsagn, vil det være hensiktsmessig å gå grundigere til verks og se nærmere på den forskningen som finnes rundt bruk av ulike probiotiske bakterier på mennesker.

10 Labforsøk 2

Bakgrunn

Etter gjennomføringen av labforsøk 1 kom det frem at det hadde vært mer hensiktsmessig å bruke andre vekstmedier for dette forsøket. Det ble derfor besluttet at forsøket skulle gjennomføres på nytt, med andre vekstmedier, bedre egnet for de bakteriene vi ønsket å dyrke frem, altså *Lactobacillus ssp.* og *Bifidobacterium ssp.* MRS-agar ble bestilt for dyrkning av *Lactobacillus ssp.*, mens Bifidus-agar ikke ble bestilt på grunn av økonomiske årsaker.

Mål

Målet med forsøket er å undersøke bakterie-innholdet i to melkesyre-preparater fra samme produsent, hvor de ulike preparatene er beregnet på to ulike aldersgrupper, og kontrollere at resultatene stemmer overens med innholdsfortegnelsen.

Materialer

Samme som forsøk 1.

Fremgangsmåte

Det ble brukt samme fremgangsmåte som for forsøk 1. De eneste forskjellene er valg av vekstmedium og at det ikke ble gjennomført varmebehandling. I dette forsøket ble det benyttet MRS-agar for dyrkning av *Lactobacillus ssp.*, istedenfor blodagar som ble brukt i forsøk 1.

10.1 Resultater

Tabell 9: Viser antall kolonier som ble dyrket frem på MRS-vekstmedium

Preparat	A		B	
	Ikke-varmebehandlet		Ikke-varmebehandlet	
	Aerob	Anaerob	Aerob	Anaerob
Fortynning	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
Antall kolonier	74	Mange, umulig å telle	>300	Mange, umulig å telle
Kimtall (cfu/ml)	7,4x10 ⁷	--	>3,0x10 ⁸	--

Resultatene i tabell 9 viser antall kolonier for de skålene hvor det var mulig å telle eller anslå antall kolonier. Tabellen viser at det er flere kolonier ved anaerob dyrkning enn aerob dyrkning. Tabellen viser også at det er flere kolonier i preparat B, som er preparatet som er beregnet til voksne, enn preparat A, som er beregnet til barn.

Tabell 10: MALDI-ToF-resultater fra dyrkning på MRS-agar

Resultater fra MALDI-ToF			
	Bakterieart (antall kolonier)		
Preparat A			
Anaerob dyrkning 6 kolonier	<i>L. fermentum</i> (3)	<i>L. casei</i> / <i>paracasei</i> / <i>rhamnosus</i> (2)	50% <i>L. casei</i> / <i>paracasei</i> / <i>rhamnosus</i> , 50% <i>L. fermentum</i> (1)
Aerob dyrkning 5 kolonier	<i>L. fermentum</i> (5)		
Preparat B			

Anaerob dyrkning 3 kolonier	<i>L. pentosus</i> / <i>plantarum</i> / <i>paraplantarum</i> (3)		
Aerob dyrkning 6 kolonier	<i>L. pentosus</i> / <i>plantarum</i> / <i>paraplantarum</i> (6)		

10.2 Diskusjon

Observasjoner

I dette forsøket ble det identifisert kun arter av *Lactobacillus ssp.* i Maldi-Tof. Alle koloniene som ble identifisert var blant de bakteriene som er nevnt i innholdsfortegnelsen. I preparat A ble det identifisert to ulike bakterier: *L. fermentum* (3 kolonier) og *L. casei/paracasei/rhamnosus* (2 kolonier), samt en koloni med 50% treff for hver av dem. For preparat B ble det kun identifisert *L. pentosus/plantarum/paraplantarum* (9 kolonier). De resterende *Lactobacillus*-artene fra innholdsfortegnelsen (*L. acidophilus*) ble ikke identifisert i dette forsøket.

Ble resultatet mer som forventet i dette forsøket?

Resultatene i dette forsøket samsvarer bedre med forventede funn enn resultatene fra forsøk 1. I dette forsøket ble det benyttet et vekstmedium (MRS-agar) som var bedre egnet for *Lactobacillus ssp.*-vekst, og resultatet ble derfor ikke påvirket av konkurrerende bakterier.

Hva forteller resultatene nå?

Resultatene forteller at preparatene inneholder levende bakterier av *Lactobacillus ssp.* som samsvarer med de som står oppført i innholdsfortegnelsen. Likevel er ikke alle bakteriene fra innholdsfortegnelsen representert resultatene. Det vil derfor være umulig å si ut fra disse resultatene om dette skyldes tilfeldigheter, eller om bakteriene ikke er tilstede i preparatene. Dersom vi sammenfatter resultatene fra forsøk 1 og 2, kan vi konkludere med at preparatene også inneholder kontamineringsbakterier som normalt finnes på hud og slimhinner hos mennesker. Preparatene inneholder derfor flere bakteriearter enn det som står i innholdsfortegnelsen.

Gir preparatene de effektene produsenten lover?

Produsenten hevder at preparatene har helsefremmende effekter. Det finnes en rekke forskning som viser indikasjon for positive effekter ved bruk av probiotika, både som forebyggende tiltak og som behandling for ulike tilstander og sykdommer. Det er mange

faktorer som spiller inn for om preparatene vil kunne gi helsefremmende effekter, blant annet tarmfloraens oppbygning, personens helsestatus, dosering av preparat, diett, gener med mer. Det vil derfor være vanskelig å si om preparatet vil ha positive helseeffekter for den enkelte person. I tillegg gjenstår ytterligere forskning for å fastslå nøyaktig hvilke kombinasjoner av probiotiske bakterier og doseringer som er mest effektive for forebygging og behandling av diverse sykdommer.

11 Avslutning

11.1 Takk til bidragsyttere

Jeg ønsker å takke veilederne mine, Marina Elisabeth Aspholm og Yngvild Wasteson, for faglig bistand, engasjement og støtte, og for raske og gode tilbakemeldinger underveis i skriveprosessen. Jeg vil også takke Yohannes Beyene Mekonnen for opplæring, veiledning og gjennomføring av forsøk på laben, samt Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet for finansiering til gjennomføring av forsøkene.

12 Referanser

- Activia. (2023). *Probiotic Yoghurt* Tilgjengelig fra: <https://www.activia.us.com/probiotic-yogurt/activia-60-calories/4-pack/60-calories-strawberry/>.
- Adak, A. & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76 (3): 473-493. doi: 10.1007/s00018-018-2943-4.
- AlFaleh, K. & Anabrees, J. (2014). Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* (4): Cd005496. doi: 10.1002/14651858.CD005496.pub4.
- Almeida, C. C., Lorena, S. L. S., Pavan, C. R., Akasaka, H. M. I. & Mesquita, M. A. (2012). Beneficial Effects of Long-Term Consumption of a Probiotic Combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult May Persist After Suspension of Therapy in Lactose-Intolerant Patients. *Nutrition in Clinical Practice*, 27 (2): 247-251. doi: <https://doi.org/10.1177/0884533612440289>.
- Arla. (2023). *Arla Cultura Yoghurt Naturell* Tilgjengelig fra: <https://www.arla.dk/produkter/arla-cultura/naturel-15pct-500g-20177/>.
- Bertelli, C., Pilonel, T., Torregrossa, A., Prod'hom, G., Fischer, C. J., Greub, G. & Giannoni, E. (2014). *Bifidobacterium longum* Bacteremia in Preterm Infants Receiving Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60 (6): 924-927. doi: 10.1093/cid/ciu946.
- Besselink, M. G., van Santvoort, H. C., Buskens, E., Boermeester, M. A., van Goor, H., Timmerman, H. M., Nieuwenhuijs, V. B., Bollen, T. L., van Ramshorst, B. & Witteman, B. J. (2008). Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 371 (9613): 651-659.
- Bittinger, K., Zhao, C., Li, Y., Ford, E., Friedman, E. S., Ni, J., Kulkarni, C. V., Cai, J., Tian, Y., Liu, Q., et al. (2020). Bacterial colonization reprograms the neonatal gut metabolome. *Nat Microbiol*, 5 (6): 838-847. doi: 10.1038/s41564-020-0694-0.
- Bøvre, K. (2020). *Lactobacillus* Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/laktobasiller> (lest 24.08.23).
- Compendium, I. D. (2023). *Streptococcus*. Tilgjengelig fra: https://pusware.com/testpus/bug_Streptococcus.html (lest 09.10.23).
- Costeloe, K., Hardy, P., Juszczak, E., Wilks, M. & Millar, M. R. (2016). *Bifidobacterium breve* BBG-001 in very preterm infants: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*, 387 (10019): 649-660. doi: 10.1016/s0140-6736(15)01027-2.
- De Groote, M. A., Frank, D. N., Dowell, E., Glode, M. P. & Pace, N. R. (2005). LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG BACTEREMIA ASSOCIATED WITH PROBIOTIC USE IN A CHILD WITH SHORT GUT SYNDROME. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24 (3): 278-280. doi: 10.1097/01.inf.0000154588.79356.e6.
- de man, rogosa and sharpe (MRS) agar. (2003). I: Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W. & Baird, R. M. (red.) b. 37 *Progress in Industrial Microbiology*, s. 511-513: Elsevier.
- DNV. (2020). *Maldi-TOF er et effektivt redskap i diagnostisk fiskebakteriologi*. Tilgjengelig fra: https://nvt.vetnett.no/journal/2020/8/m-106/MALDI-TOF_er_et_effektivt_redskap_i_diagnostisk_fiskebakteriologi.
- Dotterud, C. K., Storrø, O., Johnsen, R. & Øien, T. (2010). Probiotics in pregnant women to prevent allergic disease: a randomized, double-blind trial. *British Journal of Dermatology*, 163 (3): 616-623. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09889.x.
- Encarnacion, C. O., Loranger, A. M., Bharatkumar, A. G. & Almassi, G. H. (2016). Bacterial Endocarditis Caused by *Lactobacillus acidophilus* Leading to Rupture of Sinus of

- Valsalva Aneurysm. *Texas Heart Institute Journal*, 43 (2): 161-164. doi: 10.14503/thij-15-5121.
- Farmasiet. *Idoform* Tilgjengelig fra: <https://www.farmasiet.no/catalog/mage-og-tarm/diare/idoform-travel-tyggetabletter,5000800?searchQuery=idoform> (lest 09.10.23).
- Fatheree, N. Y., Liu, Y., Ferris, M., Van Arsdall, M., McMurtry, V., Zozaya, M., Cai, C., Rahbar, M. H., Hessabi, M., Vu, T., et al. (2016). Hypoallergenic formula with *Lactobacillus rhamnosus* GG for babies with colic: A pilot study of recruitment, retention, and fecal biomarkers. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 7 (1): 160-70. doi: 10.4291/wjgp.v7.i1.160.
- Feizizadeh, S., Salehi-Abargouei, A. & Akbari, V. (2014). Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute diarrhea. *Pediatrics*, 134 (1): e176-91. doi: 10.1542/peds.2013-3950.
- FHI. (2012). *Om antibiotikaresistens*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sm/antibiotikaresistens/om-antibiotikaresistens/> (lest 26.10.23).
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11 (5): 4745-4767.
- Ford, A. C., Harris, L. A., Lacy, B. E., Quigley, E. M. M. & Moayyedi, P. (2018). Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, 48 (10): 1044-1060. doi: 10.1111/apt.15001.
- Fradiani, P. A., Petrucca, A., Ascenzioni, F., Di Nucci, G., Teggi, A., Bilancini, S. & Cipriani, P. (2010). Endocarditis caused by *Lactobacillus jensenii* in an immunocompetent patient. *Journal of Medical Microbiology*, 59 (5): 607-609. doi: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.017764-0>.
- Franko, B., Vaillant, M., Recule, C., Vautrin, E., Brion, J. P. & Pavese, P. (2013). *Lactobacillus paracasei* endocarditis in a consumer of probiotics. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43 (4): 171-173. doi: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.01.007>.
- Freedman, S. B., Williamson-Urquhart, S., Farion, K. J., Gouin, S., Willan, A. R., Poonai, N., Hurley, K., Sherman, P. M., Finkelstein, Y., Lee, B. E., et al. (2018). Multicenter Trial of a Combination Probiotic for Children with Gastroenteritis. *N Engl J Med*, 379 (21): 2015-2026. doi: 10.1056/NEJMoa1802597.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F. & Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50: S116-S119. doi: 10.1097/mcg.0000000000000697.
- Goldstein, E. J. C., Tyrrell, K. L. & Citron, D. M. (2015). *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60 (suppl_2): S98-S107. doi: 10.1093/cid/civ072.
- Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113 (12): 2019-2040. doi: 10.1007/s10482-020-01474-7.
- Guenther, K., Straube, E., Pfister, W., Guenther, A. & Huebler, A. (2010). Sever Sepsis After Probiotic Treatment With *Escherichia coli* NISSLE 1917. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 29 (2): 188-189. doi: 10.1097/INF.0b013e3181c36eb9.
- He, T., Priebe, M. G., Zhong, Y., Huang, C., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Antoine, J. M., Welling, G. W. & Vonk, R. J. (2008). Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *J Appl Microbiol*, 104 (2): 595-604. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03579.x.
- Helsefreak. *UDO's CHOICE melkesyrebakterier 50+*. Tilgjengelig fra: <https://www.helsefreak.no/probiotika/420-udos-choice-melkesyrebakterier-50.html>.

- Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B. & Margolles, A. (2017). Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Microbiology Spectrum*, 5 (3): 10.1128/microbiolspec.bad-0010-2016. doi: doi:10.1128/microbiolspec.bad-0010-2016.
- Huang, L., Ma, L., Fan, K., Li, Y., Xie, L., Xia, W., Gu, B. & Liu, G. (2014). Necrotizing pneumonia and empyema caused by *Neisseria flavescens* infection. *J Thorac Dis*, 6 (5): 553-7. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.02.16.
- Høberg, E. N. (2021). *Fermentering* Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/fermentering>.
- ISAPP. (2020). *How do probiotics stay alive until they are consumed?* . ISAPP Science Blog. Tilgjengelig fra: <https://isappscience.org/how-do-probiotics-stay-alive-until-they-are-consumed/> (lest 09.10.23).
- Ishikawa, H., Matsumoto, S., Ohashi, Y., Imaoka, A., Setoyama, H., Umesaki, Y., Tanaka, R. & Otani, T. (2011). Beneficial effects of probiotic bifidobacterium and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: a randomized controlled study. *Digestion*, 84 (2): 128-33. doi: 10.1159/000322977.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. & Isolauri, E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 357 (9262): 1076-1079. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04259-8.
- Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takeda, K. & Niimura, Y. (2006). Response of the Microaerophilic *Bifidobacterium* Species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to Oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (10): 6854-6858. doi: doi:10.1128/AEM.01216-06.
- Khodayar-Pardo, P., Mira-Pascual, L., Collado, M. C. & Martínez-Costa, C. (2014). Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J Perinatol*, 34 (8): 599-605. doi: 10.1038/jp.2014.47.
- Korpela, K., Salonen, A., Vepsäläinen, O., Suomalainen, M., Kolmeder, C., Varjosalo, M., Miettinen, S., Kukkonen, K., Savilahti, E., Kuitunen, M., et al. (2018). Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants. *Microbiome*, 6 (1): 182. doi: 10.1186/s40168-018-0567-4.
- Kothari, D., Patel, S. & Kim, S.-K. (2019). Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111: 537-547. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.104>.
- Kothari, D., Patel, S. & Kim, S. K. (2019). Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomed Pharmacother*, 111: 537-547. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.104.
- Kunz, A. N., Noel, J. M. & Fairchok, M. P. (2004). Two Cases of *Lactobacillus* Bacteremia During Probiotic Treatment of Short Gut Syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 38 (4): 457-458.
- Lilly, D. M. & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, 147 (3659): 747-748. doi: doi:10.1126/science.147.3659.747.
- Liu, Y., Tran, D. Q. & Rhoads, J. M. (2018). Probiotics in Disease Prevention and Treatment. *J Clin Pharmacol*, 58 Suppl 10 (Suppl 10): S164-s179. doi: 10.1002/jcph.1121.
- Lyons, K. E., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Ross, R. P. & Stanton, C. (2020). Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients*, 12 (4). doi: 10.3390/nu12041039.

- Matinfo. (2023). *BioQ Blåbær og bringebær 1L* Tilgjengelig fra: <https://produkter.matinfo.no/Q-meieriene/Bioq-bl%C3%A5b%C3%A6r-og-bringeb%C3%A6r-1l/07048840090082>.
- Mattilsynet. (2012). *Probiotika til barn under ett år* Tilgjengelig fra: https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/spesialmat_og_kosttilskudd/barnemat/probiotika_til_barn_under_ett_aar.3000 (lest 12.10.23).
- Panigrahi, P., Parida, S., Nanda, N. C., Satpathy, R., Pradhan, L., Chandel, D. S., Baccaglioni, L., Mohapatra, A., Mohapatra, S. S., Misra, P. R., et al. (2017). A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. *Nature*, 548 (7668): 407-412. doi: 10.1038/nature23480.
- Patel, R. M. & Underwood, M. A. (2018). Probiotics and necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*, 27 (1): 39-46. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2017.11.008.
- Plummer, S., Weaver, M. A., Harris, J. C., Dee, P. & Hunter, J. (2004). Clostridium difficile pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of C. difficile diarrhoea. *Int Microbiol*, 7 (1): 59-62.
- Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P. C., Klinder, A., O'Riordan, M., O'Sullivan, G. C., Pool-Zobel, B., et al. (2007). Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr*, 85 (2): 488-96. doi: 10.1093/ajcn/85.2.488.
- Schreck Bird, A., Gregory, P. J., Jalloh, M. A., Risoldi Cochrane, Z. & Hein, D. J. (2017). Probiotics for the Treatment of Infantile Colic: A Systematic Review. *J Pharm Pract*, 30 (3): 366-374. doi: 10.1177/0897190016634516.
- ScienceDirect. (2013). *Streptococcus*. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/streptococcus> (lest 09.10.23).
- ScienceDirect. (2020). *Paenibacillus* Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/paenibacillus> (lest 09.10.23).
- ScienceDirect. (2022). *Bifidobacterium*
- Shinar, E., Leitersdorf, E. & Yevin, R. (1984). Lactobacillus plantarum endocarditis. *Klinische Wochenschrift*, 62 (24): 1173-1174. doi: 10.1007/BF01712185.
- Shu, S. A., Yuen, A. W. T., Woo, E., Chu, K. H., Kwan, H. S., Yang, G. X., Yang, Y. & Leung, P. S. C. (2019). Microbiota and Food Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol*, 57 (1): 83-97. doi: 10.1007/s12016-018-8723-y.
- Singh, A., Hacini-Rachinel, F., Gosoni, M. L., Bourdeau, T., Holvoet, S., Doucet-Ladeveze, R., Beaumont, M., Mercenier, A. & Nutten, S. (2013). Immune-modulatory effect of probiotic Bifidobacterium lactis NCC2818 in individuals suffering from seasonal allergic rhinitis to grass pollen: an exploratory, randomized, placebo-controlled clinical trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67 (2): 161-167. doi: 10.1038/ejcn.2012.197.
- Sirevåg, R. (2022). *Bifidobacterium* Bifidobacterium Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/Bifidobacterium>.
- Sistek, D., Kelly, R., Wickens, K., Stanley, T., Fitzharris, P. & Crane, J. (2006). Is the effect of probiotics on atopic dermatitis confined to food sensitized children? *Clinical & Experimental Allergy*, 36 (5): 629-633. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02485.x>.
- Ślizewska, K. & Chlebicz-Wójcik, A. (2020). Growth Kinetics of Probiotic Lactobacillus Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. *Biology*, 9 (12): 423. doi: 10.3390/biology9120423.

- SNL. (2020). *Fordøyelse*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/ford%C3%B8yelsessystemet> (lest 30.10.23).
- SNL. (2021a). *Hippokrates*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/Hippokrates> (lest 19.11.23).
- SNL. (2021b). *Probiotika*. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/probiotika#-Probiotika_og_prebiotika (lest 09.10.23).
- SNL. (2022a). *Allergi*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/allergi> (lest 27.10.23).
- SNL. (2022b). *Tarmflora*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/tarmflora>.
- Sung, V., Hiscock, H., Tang, M. L., Mensah, F. K., Nation, M. L., Satzke, C., Heine, R. G., Stock, A., Barr, R. G. & Wake, M. (2014). Treating infant colic with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: double blind, placebo controlled randomised trial. *Bmj*, 348: g2107. doi: 10.1136/bmj.g2107.
- Szajewska, H., Skórka, A., Ruszczyński, M. & Gieruszczak-Białek, D. (2013). Meta-analysis: *Lactobacillus GG* for treating acute gastroenteritis in children--updated analysis of randomised controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther*, 38 (5): 467-76. doi: 10.1111/apt.12403.
- Tine. (2023). *Biola Bringebar II* Tilgjengelig fra: <https://oda.com/no/products/1128-tine-biola-bringebaer/> (lest 09.10.23).
- Tjønum, T. (2019). *Blodagar*: Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/blodagar> (lest 14.09.23).
- Tønjum, T. (2022). *Melkesyrebakterier*: Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/melkesyrebakterier> (lest 24.08.23).
- UiO. (2011). *Fermentering* Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/f/fermenter.html>.
- VetBact. (2023). *Streptococcus pneumoniae*. Tilgjengelig fra: <https://www.vetbact.org/index.php?artid=145&vbsearchstring=streptococcus%20pneumoniae> (lest 09.10.23).
- Waller, P. A., Gopal, P. K., Leyer, G. J., Ouwehand, A. C., Reifer, C., Stewart, M. E. & Miller, L. E. (2011). Dose-response effect of *Bifidobacterium lactis* HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults. *Scand J Gastroenterol*, 46 (9): 1057-64. doi: 10.3109/00365521.2011.584895.
- Wing, J. M. S. a. H. U. (1935). An unnoted hemolytic streptococcus associated with milk products.
- Xu, H. B., Jiang, R. H. & Sheng, H. B. (2017). Meta-analysis of the effects of *Bifidobacterium* preparations for the prevention and treatment of pediatric antibiotic-associated diarrhea in China. *Complement Ther Med*, 33: 105-113. doi: 10.1016/j.ctim.2017.07.001.
- Zé-Zé, L., Tenreiro, R., Duarte, A., Salgado, M. J., Melo-Cristino, J., Lito, L., Carmo, M. M., Felisberto, S. & Carmo, G. (2004). Case of aortic endocarditis caused by *Lactobacillus casei*. *Journal of Medical Microbiology*, 53 (5): 451-453. doi: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05328-0>.
- Zheng, M., Zhang, R., Tian, X., Zhou, X., Pan, X. & Wong, A. (2017). Assessing the Risk of Probiotic Dietary Supplements in the Context of Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00908.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no