

Testiranje utjecaja hranjive podloge na sastav crijevne mikrobiote u in vitro sustavu

Zubčić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:128745>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2017.

Marina Zubčić

733/N

**Testiranje utjecaja hranjive podloge
na sastav crijevne mikrobiote u *in*
vitro sustavu**

Rad je izrađen u Kabinetu za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom Dr. sc. Jurice Žučka i stručnog suradnika Dr. sc. Damira Orosa, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Prvenstveno se zahvaljujem svom mentoru, doc. dr. sc. Jurici Žučku na strpljenju, nesebičnoj pomoći i vrijednim savjetima pri pisanju ovog rada.

Veliko hvala i dr. sc. Damiru Orosu na neiscrpnom strpljenju, stručnom vodstvu i neprocjenjivom znanju udijeljenom tokom provođenja eksperimentalnog dijela rada, a i kasnije.

Zahvaljujem se i kolegicama Teni, Maji i Steli na veseloj atmosferi i timskom duhu tijekom dugih sati u laboratoriju.

Hvala Jeleni i Maji na strpljenju i spremnosti na odgovore na mojih milijun pitanja i stalnom poticanju u trenucima krize i nedostatka motivacije.

Posebno hvala mojoj obitelji bez koje ništa od ovoga nebi bilo moguće i svim mojim prijateljima i bliskim osobama na podršci, bodrenju i strpljenju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Kabinet za bioinformatiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

TESTIRANJE UTJECAJA HRANJIVE PODLOGE NA SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE U *IN VITRO* SUSTAVU

Marina Zubčić, 733/N

Sažetak: Crijevna mikrobiota, iako relativno novo područje istraživanja, je pobudila snažan interes za istraživanjem uslijed svojeg velikog utjecaja na zdravlje i dobrobit ljudi. Zbog raznih etičkih ograničenja pri istraživanju crijevne mikrobiote, razvijaju se razni *in vitro* sustavi kojima je cilj što bolje simulirati uvjete u crijevu čovjeka. Postoji više ograničavajućih faktora pri istraživanju mikrobiote u *in vitro* sustavima od kojih je najznačajniji nemogućnost repliciranja svih fizioloških uvjeta prisutnih u organizmu čovjeka. Svrha ovog rada je bila ispitati koliko je odabrani i prilagođeni *in vitro* sustav podoban za održavanje postojanog sastava inokulirane mikrobiote, pratiti odgovor mikrobiote na uvjete uzgoja u *in vitro* sustavu, utjecaj hranjive podloge na mikrobiotu te reproducibilnost sustava. Nakon provedenog procesa, utvrđeno je da je korišteni *in vitro* sustav reproducibilan i dobro simulira uvjete debelog crijeva te je za buduća istraživanja potrebno optimizirati sastav hranjive podloge kako bi se održala bioraznolikost mikrobiote što sličnija onoj iz početnog inokuluma.

Ključne riječi: crijevna mikrobiota, *in vitro* sustav, debelo crijevo

Rad sadrži: 55 stranica, 20 slika, 14 tablica, 80 literaturnih navoda, 14 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Jurica Žučko

Pomoć pri izradi: dr. sc. Damir Oros

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. Ksenija Uroić
2. Doc. dr. sc. Jurica Žučko
3. Doc. dr. sc. Janko Diminić
4. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Datum obrane: 20.7.2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Section for Bioinformatics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition science

TESTING THE INFLUENCE OF SIEM ON THE COMPOSITION OF MICROBIOTA IN A *IN VITRO* SYSTEM

Marina Zubčić 733/N

Abstract: Gut microbiota, although relatively new research area, has aroused a strong interest in researching community due to its great impact on the human health and wellbeing. Because of various ethical norms in the research of gut microbiota, new *in vitro* systems are being developed. Their goal is to simulate the physiological conditions in the human gut. There are a few limiting factors in researching the gut micorbiota in *in vitro* systems and the biggest one is its inability to replicate all the conditions that exist *in vivo* in the colon. The aim of this thesis was to evaluate how adequate is the chosen and adapted *in vitro* system to maintain a stable composition of the inoculated micorbiota, to keep track of the responses that the microbiota has to the conditions in the system, to investigate the impact of SIEM on the microbiota composition and the reproducibility od the *in vitro* system. The experiment has given the results that the used *in vitro* system is reproducible and is able to adequately simulate the conditions present in the human colon. In the future experiments, it is necessary to optimize the composition of SIEM to be able to maintain the biodiversity of micorbiota and the composition as similar as possible to the original inoculate.

Keywords: gut microbiota, in vitro system, colon

Thesis contains: 55 stranica, 20 slika, 14 tablica, 80 literaturnih navoda, 14 priloga

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD, Jurica Žučko, Assistant professor

Technical support and assistance: PhD, Damir Oros

Reviewers:

1. PhD, Ksenija Uroić, Assistant professor
2. PhD, Jurica Žučko, Assistant professor
3. PhD, Janko Diminić, Assistant professor
4. PhD, Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 20.7.2017.

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. GRAĐA I FUNKCIJA DEBELOG CRIJEVA.....	3
2.2. MIKROBIOTA I NJEN ZNAČAJ ZA ZDRAVLJE ČOVJEKA	4
2.2.1. Promjena mikrobiote kroz životnu dob i čimbenici koji utječu na sastav mikrobiote u debelom crijevu.....	5
2.2.2. Utjecaj sastava crijevne mikrobiote na zdravlje čovjeka.....	8
2.2.3. Mikrobiota i pretilost.....	11
2.3. BIORAZNOLIKOST MIKROBIOTE I METODE ODREĐIVANJA BIORAZNOLIKOSTI.....	12
2.4. <i>IN VITRO</i> SUSTAVI ZA SIMULACIJU UVJETA DEBELOG CRIJEVA	15
2.4.1. Bioreaktor, izgled i karakteristike	21
2.4.2. Podloga za uzgoj mikrobiote u <i>in vitro</i> simulatorima.....	22
2.4.3. Karakteristike sastavnica hranjive podloge	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. MATERIJALI.....	24
3.1.1. Sastav hranjive podloge za uzgoj mikrobiote u bioreктору.....	24
3.1.2. Mikrobna kultura za inokulaciju.....	26
3.1.3. Laboratorijska oprema za pripremu i praćenje procesa te obradu uzoraka.....	27
3.2. METODE.....	29
3.2.1. Priprema hranjivih podloga	29
3.2.2. Sterilizacija podloge, pribora i aparature	30
3.2.3. Sastavljanje aparature i postavljanje parametara procesa	31
3.2.4. Faza prilagodbe mikrobiote u bioreктору.....	32
3.2.5. Vođenje anaerobnog mikrobnog procesa u bioreктору	32
3.2.6. Automatizirana izolacija DNA	33
3.2.7. Mjerenje koncentracije DNA	34
3.2.8. Sekvencioniranje 16S rRNA marker gena.....	34
3.2.9. Obrada podataka sekvencioniranja i analiza bakterijske bioraznolikosti	34
4. REZULTATI I RASPRAVA	37
4.1. TAKSONOMSKA RAZNOLIKOST MIKROBIOTE	37
4.2. ALFA RAZNOLIKOST	41
4.3. BETA RAZNOLIKOST	43
5. ZAKLJUČCI	47
6. POPIS LITERATURE	48
7. PRILOZI	56

1. UVOD

“Sve bolesti započinju u crijevu.“

- Hipokrat 460 BC

Pojmove mikrobiote i mikrobioma se prvenstveno povezuje s mikroorganizmima koji obitavaju u ljudskom debelom crijevu. Neki znanstvenici tvrde za mikrobiotu da je ona visoko specijaliziran organ koji sadrži zajednicu mikroba čija metabolička aktivnost ima direktan utjecaj na zdravlje ili bolest ljudi. Najnovije istraživanje je dalo rezultate koji procjenjuju da se u i na ljudskom tijelu nalazi bakterija težine do 0,2 kg, odnosno $3,8 \cdot 10^{13}$ bakterija, što znači da je omjer mikrobnih i ljudskih stanica otprilike 1:1 naspram dosadašnjih tvrdnji da je u ljudskom tijelu 10 puta više bakterijskih nego ljudskih stanica (Sender i sur., 2016). Također se procjenjuje da se crijevna mikrobiota sastoji od 500-1000 zasebnih vrsta bakterija koje sve pripadaju u sedam bakterijskih koljena od čega 64% ukupne mikrobiote čine bakterije koljena *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* te manje od 1% pripada koljenima *Verrucomicrobia*, *Cianobacteria* i *Fusobacteria* (D'Argenio i Salvatore, 2015; Xu i Knight, 2014). Crijevna mikrobiota je složen i dinamičan ekosistem koji obitava u simbiozi s organizmom domaćina, ima na njega različit utjecaj i može djelovati na metabolizam, imunološki i endokrini sustav, a svake kvantitativne i kvalitativne promjene u sastavu crijevne mikrobiote mogu rezultirati disbiozom koju istraživanja povezuju s povećanom incidencijom raznih upalnih crijevnih bolesti (Ursell i sur., 2012; Borody i sur., 2013). Kako bi se bolje shvatio taj simbiotski odnos, potrebno je istražiti i definirati tzv. „core microbiome“, odnosno sastav mikrobiote zdrave populacije na temelju kojeg bi se lakše uočile promjene koje bi se mogle povezati s pojavom bolesti. Upravo se ovom problematikom bave MetaHIT¹ i HMP² projekti koji su najnovijim sekvencijskim analizama metagenoma iznjedrile katalog gena mikroorganizama u kojem je identificirano 3.3 milijuna ne redundantnih mikrobnih gena što je otprilike 150 puta više od ljudskog genoma i na taj način pomogli u lakšem shvaćanju uzajamnih djelovanja mikrobiote i domaćina (Lozupone i sur., 2012). Povećanjem znanja i razumijevanja funkcija mikrobioma bi se omogućio razvoj novih dijagnostičkih, prognostičkih i terapijskih strategija koje se baziraju na manipulacijama mikrobiote kako bi se na taj način utjecalo na ljudsko zdravlje. Iz tog razloga se veliki naponi ulažu u razvoj novih sustava i modela kojima bi se učinkovito simulirali uvjeti debelog crijeva i time omogućilo istraživanje utjecaja različitih intervencija na sastav mikrobiote u samom sustavu.

¹ MetaHIT- eng. „European Metagenomics of the Human Intestinal Tract“ Project

² HMP- eng. „Human Microbiome Project“

In vitro modeli omogućuju brze, jednostavne i jeftine načine proučavanja ljudskog mikrobioma u jednom ili više odjeljaka crijeva i to duž cijelog probavnog sustava i upravo se zbog navedenih karakteristika najveći naponi ulažu u istraživanje adekvatnosti, reproducibilnosti i podobnosti različitih *in vitro* sustava koji se koriste u istraživanjima crijevne mikrobiote.

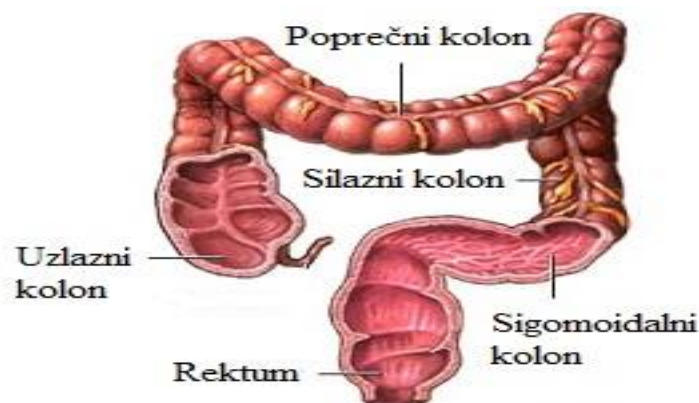
Svrha ovog rada je bila ispitati koliko je odabrani i prilagođeni *in vitro* sustav podoban za održavanje postojanog sastava inokulirane mikrobiote, pratiti odgovor mikrobiote na uvjete uzgoja u *in vitro* sustavu, utjecaj hranjive podloge na mikrobiotu te reproducibilnost samog sustava.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GRAĐA I FUNKCIJA DEBELOG CRIJEVA

Debelo crijevo se proteže od krajnjeg dijela ileuma do anusa. Dugo je otprilike 1.5 metara i čini jednu petinu ukupnog crijeva čovjeka. Otprilike 1500 mL himusa³ svaki dan uđe u debelo crijevo gdje se apsorbira glavina vode i elektrolita te se konačno stolicom izluči tek 50 – 200 mL tekućine. Stolica se normalno sastoji od oko tri četvrtine vode i jedne četvrtine krute tvari u kojoj 30% otpada na anorganske tvari, 2 – 3% čine bjelančevine te oko 30% čine grubi neprobavljeni ostaci hrane te osušeni sastojci probavnih sokova i oljuštene epitelne stanice. Debelo crijevo se dijeli na cekum, kolon, rektum i analni otvor pri čemu se kolon dalje dijeli na uzlazni, poprečni, silazni te sigmoidalni kolon.

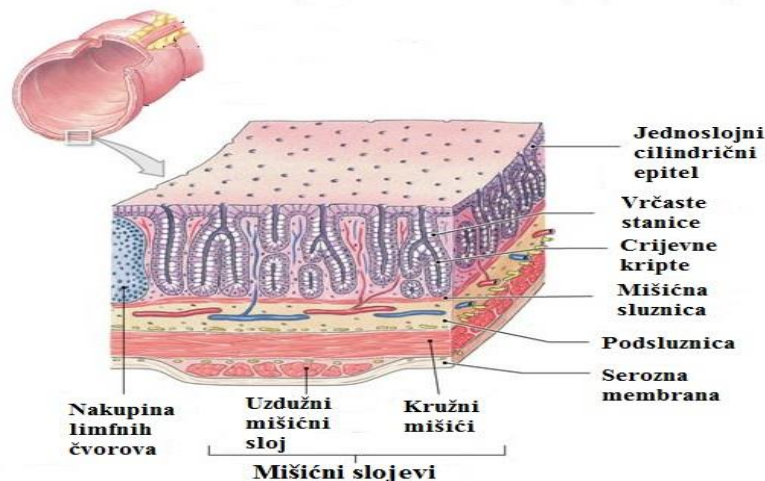
Uzlazni kolon se uzlazno nastavlja na cekum, smješten je u plitku udubinu ispod desnog režnja jetre i desno od žučnog mjehura. Dug je otprilike 10-15 centimetara. Najveći dio apsorpcije se odvija upravo u ovom dijelu debelog crijeva te se stoga ovaj dio naziva i “apsorpcijski kolon”. Poglavitno se apsorbiraju elektroliti poput natrija i klorida te poglavito voda, a pH koji prevladava u ovom dijelu kolona varira između 5.5 - 6. Na uzlazni kolon se nastavlja poprečni, najdulji (50 centimetara) i najpokretljiviji dio kolona gdje je raspon pH vrijednosti uglavnom 6 - 6.5, nakon čega slijedi silazni dio kolona. Silazni kolon je manji od uzlaznog te smješten dublje u trbušnoj šupljini jer se ispred njega nalaze navoji tankog crijeva. Dug je otprilike 25 centimetara te za razliku od uzlaznog koji većinom služi za apsorpciju, silazni kolon uglavnom služi za pohranjivanje pa se zato još naziva i “skladišnim kolonom”, a pH u ovom dijelu je poglavito od 6.5 - 7 (Grey i Lewis, 1918; Guyton i Hall, 2010; Brugère i sur., 2011).



Slika 1. Dijelovi debelog crijeva (Prilagođeno od Anonymous, 2016)

³ Himus – smjesa koja nastaje u želudcu miješanjem hrane i želudčanih sokova odakle dalje odlazi u tanko i konačno u debelo crijevo (Struna, 2011).

Debelo crijevo ima četiri sloja: serozni, mišićni, mukozni sloj i rahlo vezivno tkivo. Serozni sloj (lat. “Tunica serosa”) je dio peritoneuma i obavija djelomično ili potpuno različite djelove debelog crijeva. Mišićni sloj (lat. “Tunica muscularis”) se sastoji od vanjskih uzdužnih poprečno prugastih i unutarnjih glatkih kružnih mišića. Uzdužna mišićna vlakna ne formiraju kontinuiran sloj duž cijele površine debelog crijeva. Primjerice u cekumu i kolonu oni su raspoređeni u 3 ravna uzdužna pojasa koja su kraća od ostalih slojeva koja obavijaju crijevo i služe za formiranje ispupčenja karakterističnih upravo za cekum i kolon. Kružni mišići tvore tanki sloj i važni su za kontrakciju crijeva prilikom koje se sadržaj u crijevu pomiče iz jednog dijela u drugi. Mukozna membrana (lat. “Tunica mucosa”) je svijetli, glatki sloj koji za razliku od mukoznog sloja u tankom crijevu ne sadrži crijevne resice i glavna joj je uloga lučenje sluzi. U njoj se također nalaze mukozne žlijezde i limfni čvorovi. Rahlo vezivno tkivo (lat. “Tela sub mucosa”) povezuje mišićni i mukozni sloj (Grey i Lewis, 1918).



Slika 2. Struktura epitela debelog crijeva (Prilagođeno prema Durston, K., 2015).

2.2. MIKROBIOTA I NJEN ZNAČAJ ZA ZDRAVLJE ČOVJEKA

Humana mikrobiota se definira kao zajednica mikroorganizama u koju pripadaju bakterije, arheje, virusi i pojedini jednostanični eukarioti koji obitavaju u specifičnoj okolini u i na ljudskom tijelu. Drugi izraz koji se koristi u istraživanju i opisivanju mikrobiote jest mikrobiom, izraz koji je prvi puta upotrijebio Joshua Lederberg kako bi označio ekološku zajednicu komenzalnih, simbiotskih i patogenih mikroorganizama koji obitavaju u tijelu. Današnja definicija je da mikrobiom predstavlja sveukupan genetički materijal određene mikrobiote. Područje molekularnih istraživanja koja proučavaju složenost mikrobioma se naziva metagenomika (D’Argenio i Salvatore 2015; Lederberg i McCray, 2001).

Crijevna mikrobiota obavlja razne funkcije koje ljudsko tijelo nije u mogućnosti samo provesti i zbog toga se može reći da mikrobiota obitava u simbiozi s ljudima. Neke od funkcija koje mikrobiota obavlja su održavanje normalnih probavnih i imunoloških funkcija. U to se ubrajaju: fermentacija ljudima inače neprobavljivih sastojaka hrane kao što su primjerice netopljiva vlakna, sinteza vitamina, osobito vitamina B9, B12 i vitamina K te nekih drugih esencijalnih mikronutrijenata, metaboliza prehrambenih toksina i karcinogena, konverzija kolesterola i žučnih soli koje dopiju u debelo crijevo. Mikrobiota doprinosi sazrijevanju imunološkog sustava, utječe na rast i diferencijaciju enterocita, regulaciju crijevne angiogeneze i zaštitu od enteričkih patogena (Gérard, 2016).

Zbog različitih funkcija koje mikrobiota vrši u ljudskom crijevu, poput sinteze određenih vitamina i enzima važnih za razgradnju inače neprobavljivih sastojaka hrane, može se reći da ljudi zapravo imaju dva genoma, jedan koji nasljeđuju od roditelja te drugi koji dobiju od mikrobiote. Najbitnija razlika između njih je ta da naslijeđeni genom ostaje stabilan tokom cijelog života dok genom dobiven od mikrobiote podliježe različitim utjecajima što ga čini vrlo dinamičnim (D'Argenio i Salvatore, 2015). Kapacitet kodiranja sveukupnog mikrobnog genoma je puno veći od genetičkog kapaciteta kodiranja koji ima ljudski genom. Crijevni mikrobiom kodira biokemijske puteve koje ljudski mikrobiom još nije razvio i zbog toga se smatra da je ljudska crijevna mikrobiota individualni organ koji se nalazi u probavnom sustavu i koji ima metabolički kapacitet veći čak i od jetre za koju se smatra da je najsvestraniji ljudski organ (Egert i sur., 2006).

2.2.1. Promjena mikrobiote kroz životnu dob i čimbenici koji utječu na sastav mikrobiote u debelom crijevu

Sve donedavno se smatralo kako je ljudsko debelo crijevo sterilno prije rođenja, ali najnovija istraživanja su pobila takve tvrdnje nakon otkrića da crijevni mikrobiom postoji i *in utero*. Sekvencioniranjem 16S rRNA gena iz uzoraka prvog mekonija zdrave novorođenčadi otkriveno je da mekonij sadrži relativno jednostavnu i oskudnu mikrobiotu u kojoj su predominantno bakterijski rodovi poput *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Streptococcus* (Jimenez i sur., 2008). Daljnja istraživanja su utvrdila da se *in utero* mikrobiom ne nalazi samo u crijevima fetusa nego također i u posteljici. I taj mikrobiom je oskudan poput onoga u crijevima, ali je unatoč svom malom broju vrlo metabolički aktivan i svojim sastavom bakterija je najbližiji oralnom mikrobiomu. Mikrobiom posteljice većinom čine nepatogene komenzalne bakterije iz koljena *Firmicutes*,

Tenericutes, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* i *Fusobacteria* (Hollister i sur., 2014; Aagaard i sur., 2014).

Poznato je da crijevo novorođenčeta inicijalno sadrži i malo kisika što omogućuje aerotolerantnim bakterijama iz porodice *Enterobacteriaceae* i rodova *Streptococcus* i *Staphylococcus* da budu među prvim bakterijama koje koloniziraju crijevo novorođenčeta. Povećanjem broja fakultativno anaerobnih bakterija, kisik iz crijeva se troši i redoks potencijal pada na negativne vrijednosti čime se stvaraju uvjeti koji pogoduju anaerobnim bakterijama iz rodova *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Clostridium* nakon čega se one počinju umnožavati i njihova zastupljenost raste dok istodobno opada zastupljenost bakterija prisutnih u crijevu u prvim tjednima života (Conway P.L., 1995).

Početni sastav crijevne mikrobiote novorođenčeta ovisi i o tome da li je dijete rođeno vaginalnim putem ili carskim rezom. Novorođenčad rođena vaginalnim putem imaju mikrobiotu sličniju mikrobioti majčine vagine. Sastav takve mikrobiote poglavito obiluje bakterijskim rodovima *Lactobacillus* i *Prevotella*, dok novorođenčad rođena carskim rezom imaju mikrobiotu kojom dominiraju bakterijski rodovi *Staphylococcus*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium* što označava mikrobiotu koja je više nalik mikrobioti na koži majke. Osim načina poroda, na sastav mikrobiote utjecaj ima i način hranjenja novorođenčeta. To bi značilo da bebe dojene majčinim mlijekom koje sadrži nutrijente poput oligosaharida, različitih antitijela i komenzalne bakterije imaju mikrobiotu kojom dominiraju bakterije roda *Bifidobacterium* te u usporedbi s bebama koje su hranjene formulama imaju nižu razinu bakterija roda *Atopobium* (Hollister i sur., 2014; Xu i sur., 2014).

Tokom odrastanja se dolazi u doticaj s različitim okolišem te se povećava složenost i raznolikost hrane te se shodno tome povećava i složenost mikrobiote. Smatra se da je sličnost sastava crijevne mikrobiote djeteta od tri godine i crijevne mikrobiote odrasle osobe 40-60%. Kako starimo, udjeli rodova *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii* i nekoliko pripadnika koljena *Firmicutes* opadaju, dok se udjeli *E.coli*, bakterija koljena *Proteobacteria* i roda *Staphylococcus* povećavaju (Hollister i sur., 2014). Crijevni mikrobiom starijih osoba odlikuje slabija sposobnost biosinteze vitamina B₁₂, smanjena aktivnost mikrobnih reduktaza, slabiji imunološki sustav i slabija sposobnost neutraliziranja produkata koji nastaju u tijelu uslijed izlođenosti različitom stresu što navodi na zaključak da crijevni mikrobiom starijih osoba predstavlja proinflamatorni fenotip (Lan i sur., 2013).

Mikrobiota odrasle osobe je relativno stabilna i postojana i u njenom sastavu dominiraju bakterije koljena *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Actinobacteria*. Ipak, crijevna mikrobiota se razlikuje od osobe do osobe te se također mijenja i unutar čovjeka ovisno o različitim endogenim i egzogenim čimbenicima kojima osoba podliježe (Xu i Knight, 2014). Najraniji čimbenici koji utječu na sastav mikrobiote su način poroda (vaginalnim putem ili carskim rezom) te način hranjenja nakon poroda (dojenje majčinim mlijekom ili hranjenje formulama), a kasnije veći utjecaj na sastav mikrobiote imaju čimbenici poput geografskog područja odrastanja, spol, učestalost upotrebe antibiotika, mikrobno međudjelovanje, genotip, dob, konzumacija probiotika i prebiotika. Ipak, najveći utjecaj na sastav mikrobiote i dalje ima prehrana (Sankar i sur., 2015).

Mikrobna međudjelovanja u kombinaciji s natjecanjem mikroorganizama za izvore energije su odavno poznate važne determinante sastava crijevne mikrobiote. Najčešći mehanizmi interferencija uključuju proizvodnju toksičnih metabolita i specifičnih antimikrobnih spojeva kao što su bakteriocini⁴ (Dethlefsen i sur., 2006)

Sljedeći važan čimbenik koji utječe na sastav mikrobiote jest upotreba antibiotika. Upotreba antibiotika pridonosi smanjenju taksonomske raznolikosti i uzrokuje trajne promjene u sastavu mikrobiote kod velikog dijela ljudi. Istraživanja potvrđuju da kratkotrajna upotreba antibiotika širokog spektra u trajanju od samo 7 dana može imati učinak na sastav mikrobiote i dvije godine nakon upotrebe lijeka. Učinak koji uzrokuje upotreba antibiotika je većinom smanjena raznolikost pojedinih bakterijskih koljena poput *Bacteroidetes* i koljena *Actinobacteria*, čije smanjenje raznolikosti je uočeno nakon terapije antibioticima protiv *H.pylori*. Prestankom uporabe antibiotika, ponovo se uspostavlja mikrobna zajednica u debelom crijevu te je primijećeno da je nanovo uspostavljena mikrobiota manje otporna, što omogućuje bakterijama koje prije upotrebe antibiotika nisu obitavale u crijevu pojedinca da prerastu komenzalne mikroorganizme i na taj način uzrokuju trajne promjene u strukturi mikrobiote i potencijalno pridonose razvoju različitih bolesti. Izuzev smanjenja bioraznolikosti mikrobiote u debelom crijevu, dodatna zabrinutost kod upotrebe antibiotika jest i pojava otpornosti patogenih bakterija na antibiotike (Clemente i sur., 2012; Jandhyala i sur., 2015).

Uz sve prethodno navedene čimbenike koji utječu na sastav mikrobiote, prehrana i dalje ima najveći utjecaj na oblikovanje sastava, raznolikosti i zastupljenosti mikrobiote u

⁴ Bakteriocini- mikrobicidni proteini koje proizvode bakterije i oni sprječavaju rast srodnih bakterija u blizini (Dethlefsen i sur., 2006).

debelom crijevu čovjeka. S brojnijom i raznovrsnijom mikrobiotom se povezuje prehrana koja obiluje voćem, povrćem i hranom koja sadrži prehrambena vlakna. Ovakva prehrana podrazumijeva konzumaciju poglavito ugljikohidrata od kojih velik udio čine netopljiva vlakna pa je stoga i razumljivo da je u crijevima pojedinaca na ovakvoj prehrani detektirana veća zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes* poput *Ruminococcus bromii*, *Roseburia* i *Eubacterium rectale* (Walker i sur., 2011). Pri istraživanju utjecaja prehrane na sastav mikrobiote, poglavito se naglašava utjecaj dugotrajne, odnosno ustaljene prehrane naspram kratkotrajnih prehrambenih „intervencija“ koje uključuju razne dijetete. Ova tvrdnja je potvrđena i istraživanjem u kojem je otkriveno da su bakterije roda *Prevotella* bile zastupljenije kod ljudi koji su konzumirali prehranu koja je obilovala ugljikohidratima i vlaknima, dok su bakterije roda *Bacteroidetes* bile zastupljenije u pojedinaca koji su se hranili tzv. „zapadnjačkom prehranom“ koju karakteriziraju visok udjel proteina i masti u svakodnevnoj prehrani (Wu i sur., 2011). Uz prehranu se često veže i konzumacija probiotika i prebiotika kao jednih od glavnih čimbenika koji imaju povoljan učinak na mikrobiotu. Probiotici su kulture živih mikroorganizama koji pomažu u održavanju zdravlja ljudi pod uvjetom da su uneseni u preporučenim količinama, dok su prebiotici neprobavljivi sastojci hrane koji selektivno stimuliraju rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom crijevu i na taj način utječu na zdravlje domaćina (Gibbson i Roberfroid, 1995). Glavni cilj njihove konzumacije kao funkcionalne hrane je poboljšanje zdravlja potrošača selektivnom promjenom sastava i aktivnosti prisutne crijevne mikrobiote, a to se može najbolje postići zajedničkim unosom i probiotika i prebiotika, združeno nazvanih sinbiotici (Tobergte i Curtis, 2013).

2.2.2. Utjecaj sastava crijevne mikrobiote na zdravlje čovjeka

Sve više istraživanja provodi se u svrhu otkrivanja na koje sve sustave i organe u tijelu mikrobiota ima učinak, te kakav je točno taj učinak na čovjekovo zdravlje. Tako se promjene u mikrobnom sastavu povezuju s različitim bolestima probavnog sustava kao što su: sindrom iritabilnog crijeva, alergije, autoimune bolesti, rak debelog crijeva, nekrotizirajući enterokolitis, Crohnova bolest, ulcerozni kolitis, dijabetes tip 2, nealkoholni steato-hepatitis i u najvećem dijelu pretilost i metabolički sindrom. Osim utjecaja koji mikrobiota ima na dijelove probavnog sustava i bolesti vezane uz njega, otkriveno je da mikrobiota uvelike utječe na razvoj i normalno funkcioniranje imunološkog sustava te također na središnji živčani sustav (Sankar i sur., 2015; D'Argenio i Salvatore, 2015).

Crijevna mikrobiota pridonosi imunomodulaciji i prirođenog i stečenog imunološkog sustava. To se poglavito odnosi na limfatično tkivo probavnog sustava (eng. „Gut Associated Lymphoid Tissue“- GALT) , efektorne i regulatorne T- stanice, IgA stanice koje proizvode B plazma stanice, makrofage i dendritičke stanice koje se nalaze u „lamina propria“ gdje mikrobiota pomaže pri normalnom sazrijevanju stanica te njihovoj adekvatnoj aktivaciji koja je esencijalna za njihovo normalno djelovanje. Jedna od bitnih interakcija prirođenog imunološkog sustava s crijevnom mikrobiotom se pokazala i vrlo važnim epigenetičkim faktorom u razvoja dijabetesa tipa 1 kod mršavih miševa s dijabetesom (NOD miševi). Pokazalo se da NOD miševi koji ne posjeduju MyD88 adaptorski protein esencijalan za razne signalne puteve i receptore prirođenog imuniteta, ne razvijaju dijabetes. Ovaj učinak se pripisuje crijevnoj mikrobioti jer je primijećeno da kod „germ-free“ NOD miševa koji posjeduju MyD88 protein dolazi do razvoja težeg oblika dijabetesa, ali kad se ovakvi miševi koloniziraju mikrobiotom NOD miševa bez MyD88 proteina, dolazi do ublažavanja dijabetesa (Wen i sur., 2008; Jandhyala i sur., 2015).

Pretpostavlja se da se 95% serotonina, takozvanog hormona sreće, nalazi u crijevu, a ne u mozgu kao što se općenito smatra. Ovaj neurotransmiter je važan kod mnogih bolesti jer se njegovo disbalans povezuje s pojavom depresije, migrena i drugih neuropsihijatrijskih bolesti, a u novije vrijeme se koristi i kod liječenja sindroma iritabilnog crijeva (Kim i Camilleri, 2000). Većina istraživanja utjecaja crijevne mikrobiote na morfologiju mozga se i dalje vrši na miševima, te iako postoje određene razlike između mozga čovjeka i miša, i dalje se smatra kako su mišji modeli dovoljno dobri za ovakva istraživanja. Otkriveno je da određeni mikrobni metaboliti mogu proći kroz krvno-moždanu barijeru i potom modulirati moždanu morfologiju i samu krvno-moždanu barijeru. Istraživanje na germ-free miševima je pokazalo da takvi miševi imaju propusniju krvno-moždanu barijeru, a nakon kolonizacije njihovih crijeva s *Clostridium tyrobutyricum* i *B. thetaiotaomicron* koje proizvode razne SCFA⁵ primijećeno je smanjenje propusnosti barijere. Pošto točan mehanizam ovakvog djelovanja nije još utvrđen, potrebno je provesti daljnja istraživanja (Schroeder i Bäckhed, 2016).

Smatra se da crijevna mikrobiota ima ulogu i kod pojave raka debelog crijeva kod ljudi. Rak debelog crijeva se povezuje s povišenom zastupljenošću *Fusobacterium*, invazivne anaerobne bakterije koju se prethodno povezivalo samo s upalnim bolestima crijeva. Iako točna uloga *Fusobacterium* u nastanku raka nije poznata, zna se da njena prisutnost doprinosi

⁵ SCFA- eng. „Short Chain Fatty Acid“ – Kratkolančane masne kiseline

razvoju upale koja je rizični faktor za razvoj raka debelog crijeva. Također je primijećena smanjena zastupljenost *Proteobacteria*, *Bifidobacteria*, *Prevotella* i smanjena proizvodnja SCFA dok je istodobno povišena zastupljenost *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Enterobacteriaceae*. Nekoliko istraživanja je izvijestilo da je zastupljenost dviju specifičnih bakterijskih vrsta povišena u tkivima kod raka debelog crijeva, a to su *Akkermansia muciniphila* i *Fusobacterium nucleatum*. (Grice i Segre, 2012; DeGruttola i sur., 2016).

Upalna bolest crijeva, u koju se svrstavaju ulcerozni kolitis i Crohnova bolest, je kronična bolest nepoznate etiologije. Karakteriziraju ju izmjenjujuća pojavnost akutne upale i faze remisije. Postoje indikacije da je za akutnu upalu kod upalne bolesti crijeva barem djelomično zaslužan nepravilan imunološki odgovor na luminalnu crijevnu mikrobiotu koju se može podijeliti na onu koja pridonosi zdravlju i onu koja je štetna za zdravlje domaćina. Takva promjena sastava mikrobiote u debelom crijevu se naziva disbioza. Disbiozu kod Crohnove bolesti karakteriziraju porast zastupljenosti *Ruminococcus gnavus* i opadanje zastupljenosti *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Dialister invisus* i *Clostridium cluster XIVa*. Za *Faecalibacterium prausnitzii* je poznato da je jedan od glavnih proizvođača butirata u crijevu koji djeluje kao protuupalni agens te je vrlo bitan izvor energije za epitelne stanice crijeva i samim time vrlo bitan u zaštiti epitelne barijere crijeva. *In vitro* istraživanja su pokazala da butirat suzbija imuno-upalni odgovor na način da inhibira aktivaciju transkripcije faktora NF- κ B i time produkciju proupalnih citokina TNF i IL-12 te istovremeno potpomaže proizvodnju protuupalnog citokina IL-10. (DeGruttola i sur., 2016; Rose i sur., 2010). Na temelju saznanja da disbioza pridonosi razvoju upalnih bolesti crijeva, kao potencijalni način liječenja predložena je fekalna transplantacija. Fekalna transplantacija je postupak transfera crijevne mikrobiote iz zdravog donora u crijevo oboljele osobe s ciljem uspostavljanja stabilne crijevne mikrobiote u oboljele osobe. Postoji nekoliko načina fekalne transplantacije: putem nazogastrične sonde, nasojejunalne sonde, retencijskim klistirom ili kolonoskopski. Fekalna transplantacija se najčešće provodi kod kronične upale uzrokovane bakterijom *Clostridium difficile* kod koje je u 90% slučajeva nakon fekalne transplantacije došlo do izlječenja. Taj postotak kod liječenja kroničnih upala crijeva ovom metodom je ipak niži te su stoga potrebna daljnja detaljna istraživanja koja bi trebala analizirati sastav mikrobiote i tankog crijeva i debelog crijeva prije i nakon fekalne transplantacije kako bi se bolje razumjeli mehanizmi djelovanja ovakve terapije te kako bi se utvrdili točni mikroorganizmi i njihovi produkti koji su uključeni u patogenezu upalnih bolesti crijeva. Nakon pronalaska odgovora na ove nepoznanice, postojala bi mogućnost pronalaska specifičnih korisnih mikroba ili inhibitora određenih štetnih mikroba i njihovih produkata te

se na taj način poboljšalo zdravlje oboljele osobe (Borody i sur., 2013; Li i sur., 2016; Smits i sur., 2013).

2.2.3. Mikrobiota i pretilost

Prema WHO-u⁶, pretilost se definira kao prekomjerno nakupljanje masti u tijelu koje potencijalno može narušiti zdravlje čovjeka. Prema statističkim podacima WHO-a iz 2014. godine, u svijetu je preko 600 milijuna pretilih ljudi. Kad se ta brojka stavi u postotke, 11% muškaraca i 15% žena na svijetu je pretilo. Za određivanje stupnja uhranjenosti se najčešće koristi BMI⁷ koji se izračunava prema formuli: $\frac{\text{tjelesna težina u kilogramima}}{(\text{tjelesna visina u metrima})^2}$ i potom se određuje stupanj uhranjenosti prema odgovarajućim rasponima prikazanim u Tablici 1. Glavna pretpostavka za razvoj pretilosti i dalje je neravnoteža u unosu i potrošnji energije, ali usporedbom crijevne mikrobiote zdrave, normalno uhranjene i pretilo osobe uviđen je međusobni utjecaj mikrobiote na pretilost i obrnuto (WHO, 2014).

Tablica 1. Stupanj uhranjenosti prikazan kao raspon BMI(kg/m²)

	BMI(Body Mass Index)	Opis
BMI= kg/m ²	<18,5 kg/m ²	Pothranjenost
	18,6-24,9 kg/m ²	Normalna uhranjenost
	25,9-29,9 kg/m ²	Pretilost I.stupnja (Prekomjerna tjelesna težina)
	30,0-34,9 kg/m ²	Pretilost II.stupnja
	>35,0 kg/m ²	Pretilost III. stupnja

Uz već determinirane čimbenike koji potencijalno mogu doprinijeti razvoju pretilosti poput genetike i nepravilnih prehrambenih navika, novija istraživanja pokazuju da crijevna mikrobiota također može utjecati na metabolizam čovjeka. Osobe normalne tjelesne težine imaju raznolikiju crijevnju mikrobiotu od pretilih osoba, a osim same raznolikosti postoje indicije da pretilost pridonosi promjeni sastava mikrobiote na način da povećava omjer bakterijskih koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* u debelom crijevu što se smatra nepoželjnim (Ley i sur., 2006).

⁶ WHO (eng. "World Health Organization") – Svjetska zdravstvena organizacija

⁷ BMI (eng. "Body Mass Index") – Indeks tjelesne težine

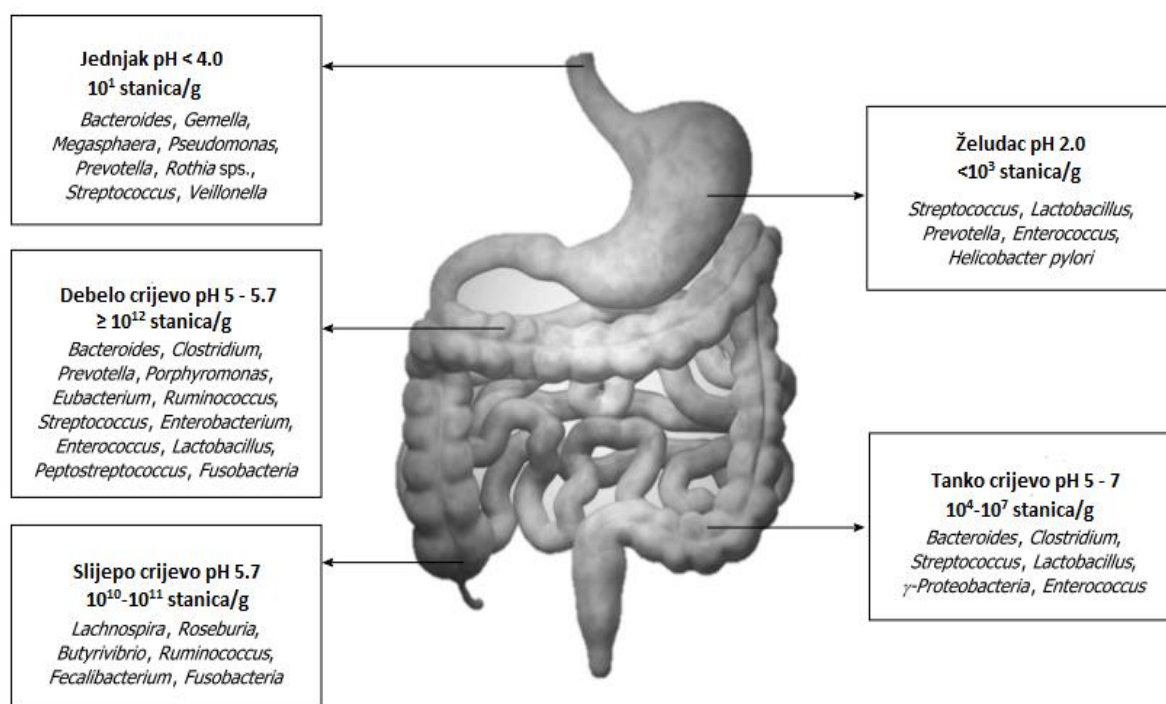
Mehanizmi kojima crijevna mikrobiota utječe na pretilost kod ljudi su izrazito kompleksni i komplicirani te stoga i dalje uglavnom nepoznati. Ipak, neki od utjecaja mikrobiote kojima ona pridonosi razvoju pretilosti su: povećano oslobađanje energije u tijelu uslijed hidrolize i fermentacije polisaharida koje domaćin samostalno ne može probaviti, visoke razine fermentiranih kratkolančanih masnih kiselina koje potiču adipogenezu, ekspresija gena povezanih s pretilošću i povećana proizvodnja plazmatskih lipopolisaharida (LPS) koji uzrokuju upalu i pretilost (Chen i sur., 2014). Na temelju saznanja dosadašnjih istraživanja, smatra se da se sastav crijevne mikrobiote čovjeka mijenja kao odgovor na prehrambene utjecaje i gubitak tjelesne težine (Turnbaugh i sur., 2009). Bakterije koljena *Firmicutes* su zastupljenije u crijevima pretilih osoba, dok su bakterije koljena *Bacteroidetes* zastupljenije u osoba normalne tjelesne težine. Smanjenjem tjelesne težine kod pretilih osoba dolazi do povećanja zastupljenosti bakterija koljena *Bacteroidetes* što pokazuje da se sastav crijevne mikrobiote može promijeniti shodno s promjenom kalorijskog unosa te se na temelju ovakve promjene omjera *Firmicutes/Bacteroidetes* smatra da modifikacija prisutne mikrobiote može biti korisna za tretiranje pretilosti (Ley i sur., 2006; Remely i sur., 2015).

Bakterije roda *Lactobacillus*, koje pripada koljenu *Firmicutes*, u ulozi promotora rasta se povezuju s porastom tjelesne težine i upalnim procesima povezanim s pretilošću (Armougom i sur., 2009). Istraživanja su pokazala da bakterijske vrste *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus ingluviei* pridonose povećanju tjelesne težine dok bakterijske vrste *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus gasseri* se povezuju s gubitkom tjelesne težine. Međutim, postoje istraživanja u kojima ipak nisu uočene značajne razlike u zastupljenosti bakterija *Firmicutes* i *Bacteroidetes* koljena kod pretilih osoba i osoba normalne tjelesne težine što znači da su potrebna dodatna istraživanja koja bi sa sigurnošću utvrdila koja bi to trebala biti razlika u sastavu bakterijskih koljena koja čine mikrobiotu kako bi se ona koristila kao biomarker pretilosti. Valja također naglasiti da je na nivou koljena nemoguće donositi konačne zaključke jer često prisutnost pojedine bakterijske vrste ili čak pojedinog soja može imati pozitivan ili negativan učinak na domaćina (Gérard, 2016).

2.3. BIORAZNOLIKOST MIKROBIOTE I METODE ODREĐIVANJA BIORAZNOLIKOSTI

Karakteristična crijevna mikrobiota odrasle osobe se poglavito sastoji od oko šest do sedam različitih bakterijskih koljena u kojima dominiraju koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* s zastupljenošću od 64%, odnosno 23%. Odmah iza njih po zastupljenošću slijedi koljeno

Proteobacteria s 8%, *Actinobacteria* s 3% dok manje od 1% mikrobiote pripada bakterijskim koljenima *Verrucomicrobia*, *Cianobacteria* i *Fusobacteria* (Voreades i sur., 2014; Šušković, 2016). Unatoč tome što se ovakav opći profil bakterija smatra konstantnim, crijevna mikrobiota pokazuje vremenske i prostorne razlike u distribuciji mikroorganizama na razinama roda i vrste. Između jednjaka i debelog crijeva je prisutna značajna razlika u raznolikosti prisutnih mikroorganizama i njihovoj koncentraciji (Slika 3) koja se kreće u rasponu od 10^1 po gramu sadržaja u jednjaku i želudcu do 10^{12} po gramu sadržaja u debelom crijevu (Jandhyala i sur., 2015).



Slika 3. Raspodjela i koncentracija mikrobiote u pojedinim dijelovima probavnog sustava (Ouweland i Vaughan, 2006; Payne i sur., 2012).

Bakterije koje čine više od 90% ukupne bakterijske populacije u debelom crijevu pripadaju koljenima *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Bakterije koje pripadaju koljenu *Proteobacteria*, skupa s bakterijama roda *Bacteroides* zastupljenima u višim koncentracijama, te bakterijama rodova *Prevotella* i *Ruminococcus* odlikuju zdravu crijevnu mikrobiotu. Anaerobnih bakterija ima 100 – 1000 puta više od aerobnih. Osim komenzalnih bakterija, u debelom crijevu se nalazi i manje od 0,1% patogenih bakterija od ukupne prisutne mikrobiote. To su poglavito *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* i *Bacteroides fragilis*. Mikrobna raznolikost debelog crijeva je vidljiva i u horizontalnoj raspodjeli mikrobiote između lumena i mukozne površine crijeva. *Bacteroides*,

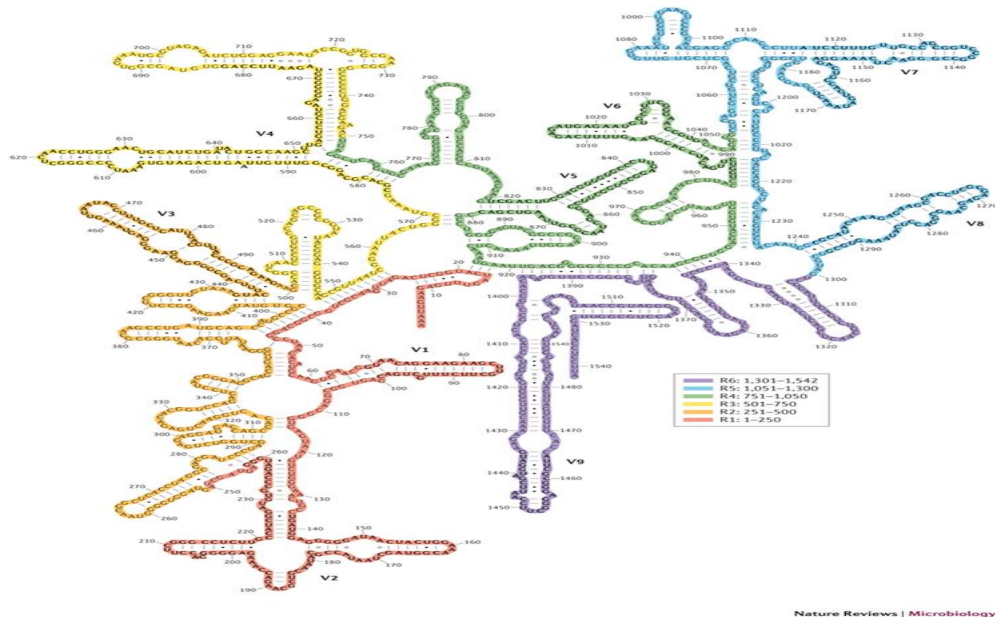
Bifidobacterium, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Ruminococcus* su prevladavajući luminalni bakterijski rodovi što omogućuje njihovo prepoznavanje u fecesu. Rodovi *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Akkermansia* su prisutni u sluznici i epitelnim kriptama crijeva (Dethlefsen i sur., 2006; Jandhyala i sur., 2015).

Pojedina istraživanja su pokazala da se na temelju specifičnog sastava mikrobiote, ljude može svrstati u kategorije jednog od tri osnovna enterotipa neovisno o dobi, spolu, geografskom podrijetlu ili tjelesnoj težini. Enterotipovi se međusobno razlikuju po svom sastavu i dominantnoj ulozi pojedinih bakterijskih rodova koji ih karakteriziraju, od kojih su neki *Bacteroides*, *Prevotella* i *Ruminococcus* (Arumugan i sur., 2011). Ipak, novija istraživanja su skeptična oko podjele mikrobiote u diskretne enterotipove uslijed njihovog prevelikog pojednostavljivanja prisutne mikrobiote iako bi njihovo postojanje uvelike pripomoglo boljem razumijevanju različitih reakcija ljudskog organizma na prehranu, lijekove i slično zbog pretpostavke da određeni enterotip specifično reagira na određenu prehranu, odnosno lijek (Knights i sur., 2014).

Najpoznatije moderne metode analize bakterijske raznolikosti su fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH), protočna citometrija (FCM), elektroforeza u gradijentu denaturirajućeg agensa (DGGE), polimorfizam veličine restrikcijskih fragmenata (RFLP), polimorfizam duljine umnoženih fragmenata (AFLP) i kvantitativni PCR (q-PCR). Kod proučavanja bakterijske biološke raznolikosti najčešće upotrebljavane probe su one komplementarne 16S rRNA i 23S rRNA ribosomalnoj sekvenci (Fraher i sur., 2012).

Sekvencioniranje 16S rRNA gena se smatra „zlatnim standardom” za identifikaciju i taksonomsku klasifikaciju bakterijskih vrsta. 16S rRNA gen koristi se kao molekularni marker jer je univerzalan u bakterijama pa se stoga može koristiti za određivanje bakterija od koljena pa sve do vrste. Vrlo je koristan kod identifikacije bakterija koje se ne mogu kultivirati. Gen koji kodira 16S podjedinicu ribosoma je dužine 1,5 kb i sadrži konzervirane regije s 9 hipervarijabilnih područja. Hipervarijabilne regije korištene pri sekvencioniranju 16S rRNA gena pokazuju veliku različitost između bakterijskih te je stoga potrebno pažljivo odrediti regiju koja će se sekvencionirati kako bi se prisutne bakterije pravilno taksonomski klasificirale. Česte regije u identifikaciji bakterija kod 16S rRNA su V3, V4, V6, i V8, prikazane na slici 4 (Jandhyala i sur., 2015). Sekvencioniranje gena koji kodira 16S rRNA, kao i svaka metoda, ima svoja ograničenja koja se najbolje očituju kod vrlo bliskih vrsta s velikom sekvencijskom sličnošću jer je broj polimorfnih mjesta u 16S rRNA izrazito malen

što otežava razlikovanje veoma srodnih vrsta. Usprkos svemu navedenom, i dalje je najčešće korištena metoda za identifikaciju nepoznatih bakterija (Fraher i sur.,2012).



Slika 4. Sekundarna struktura 16S rRNA gena u *Escherichia coli* (Jarza i sur., 2014)

2.4. IN VITRO SUSTAVI ZA SIMULACIJU UVJETA DEBELOG CRIJEVA

Pri provođenju *in vivo* istraživanja probavnog sustava na ljudima i životinjama, znanstvenici se susreću s brojnim ograničenjima poglavito vezanima za razne etičke norme koje su uključene kod provođenja istraživanja na ljudima te također neophodnost žrtvovanja životinja na kojima su istraživanja provedena. Zbog toga se sve više truda ulaže u razvoj *in vitro*, *ex vivo* i *in silico* sustava koji bi omogućili simulaciju uvjeta probavnog sustava. Iako ovakvi sustavi ne mogu potpuno zamijeniti *in vivo* istraživanja, ipak su odličan alat pri provjeravanju koncepta istraživanja prije same *in vivo* validacije (Petrof i sur., 2013).

In vitro modeli omogućuju brze, jednostavne i jeftine načine proučavanja ljudskog mikrobioma u jednom ili više odjeljaka crijeva i to duž cijelog probavnog sustava (Venema i sur., 2012). Također je teško kontrolirati promjene zastupljenosti mikrobnih zajednica u modelima nakon inokulacije. Ovo pogotovo vrijedi za zatvorene sustave kao što su primjerice šaržni fermentacijski sustavi (Macfarlane i Macfarlane 2007; Boureau i sur., 2000). Unatoč gore navedenim ograničenjima, prednosti *in vitro* modela ipak premašuju navedene nedostatke. Neke od tih prednosti uključuju njihovu isplativost jer provođenje eksperimenta *in*

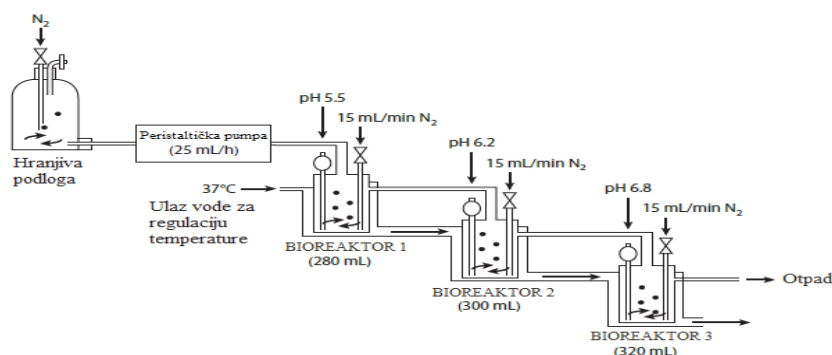
in vitro je općenito jeftinije od *in vivo* istraživanja, jednostavno ih je postaviti, jednostavna je procedura uzimanja uzorka, i jako su prilagodljivi što omogućuje ispitivanje učinaka toksičnih i radioaktivnih supstanci, dok to nebi bilo moguće kod živih subjekata. Također omogućuju i evaluaciju utjecaja širokog spektra okolišnih regulatora na bakterijsku aktivnost kao što su pH, dostupnost supstrata i brzina mikrobnog rasta (Macfarlane i Macfarlane 2007; Macfarlane i sur., 1998).

Prvi *in vitro* sustavi koji su se koristili za istraživanje crijevne mikrobiote su bili statički sustavi koji su se poglavito sastojali od zatvorenih boca u koje se inokulirala fekalna suspenzija ili sadržaj cekuma pomiješan s otopinom pufera u anaerobnim uvjetima. Problem kod ovakvog sustava je bio da se eksperiment mogao provoditi vrlo kratko zbog parametara poput, pH, redoks potencijala i bakterijske populacije, koji su se brzo mijenjali. Prvi sustav koji se šire koristio kao model ljudskog debelog crijeva je bio polukontinuirani sustav koji su razvili i opisali Miller i Wolin 1981. godine (Prilog 7 i 8). Model je bio dizajniran tako da održava ljudsku crijevnu mikrobiotu *in vitro* te da oponaša periodičan ulazak fermentabilnih supstrata u crijevo. Isti takav sustav su koristili i Manning i suradnici 1987. godine. Sastojao se od fermentora s magnetnom miješalicom u kojem se nalazila voda održavana na 37 °C. Fermentor je na sebi imao otvore za uzimanje uzoraka i izdvajanje produkata fermentacije te za dodavanje hranjivog medija u sustav. Još jedan sustav koji se temeljio na sustavu od Miller i Wolin je bio onaj kojeg je koristio Duncan 1986. godine (Prilog 9). On se sastojao od fermentora kapaciteta 1 L sa tri odjeljka. pH u fermentoru je održavan na 6.5 - 6.8 pomoću autoregulatora čime se eliminirala potreba za vanjskom regulacijom pH. Nadalje, daljnim razvojem sve više su se razvijali kontinuirani sustavi različite složenosti koja je sezala od sustava sa samo jednim fermentorom do sustava s tri fermentora. Neki od tih su bili sustavi koje su razvili Bearne i sur. 1987. godine, Merry i sur. 1987. godine (Prilog 10) te Gibson i sur. 1988. godine čiji se sustav uz određene preinake koristi i danas (Rumney i Rowland, 1992).

U današnje vrijeme, od različitih *in vitro* modela za simulaciju uvjeta u debelom crijevu u literaturi se najčešće navode SHIME i TIM-2 modeli. Još se spominju EnteroMix, PolyFermS, P-ECSIM, SIMGI, Twin-SHIME i M-SHIME modeli. S obzirom na postupak kultivacije mikrobiote u *in vitro* modelima, postupci se mogu dijeliti na šaržne, kontinuirane, višestupnjevito kontinuirane i kontinuirane postupke s imobiliziranom mikrobiotom. Najjednostavniji *in vitro* modeli koji se koriste u istraživanju ljudske crijevne mikrobiote se većinom sastoje od jednog bioreaktora, tj. od jedne posude u kojoj se nakon inokulacije

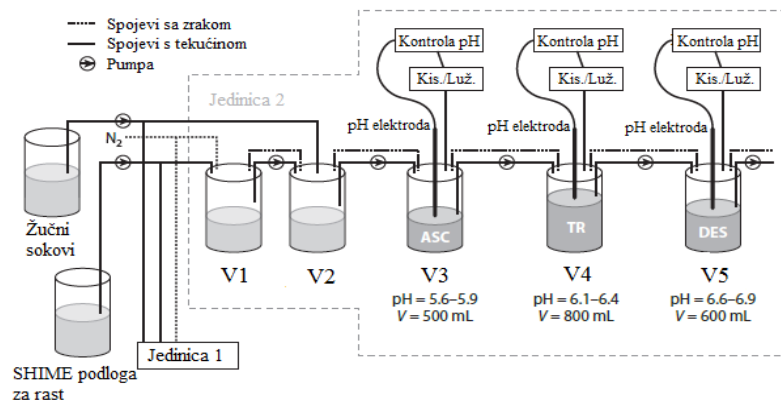
hranjivog medija suspenzijom mikrobne kulture, iz izuzetih uzoraka proučavaju utjecaji različitih komponenti ili mikroorganizama dodanih u podlogu. Prilikom oponašanja fizioloških uvjeta kakvi su u crijevu čovjeka, važno je postići anaerobne uvjete, uspostaviti postojanu temperaturu procesa (37 °C), a ovisno o dijelu debelog crijeva koji se želi simulirati, postaviti pH vrijednost na vrijednosti 5.8, 6.2, ili 6.8. Miješanje i održavanje biomase su još jedan važan parametar uzgoja gdje se peristaltika crijeva pokušava oponašati manjim brojem okretaja te različitim tipovima miješanja, peristaltičkim pumpama i drugim modelima gibanja. Uobičajeno trajanje eksperimenata u modelima šaržnog tipa je do 72 sata, a kod kontinuiranih procesa duljina može biti i do 30 dana (Williams i sur., 2015).

Jedan od prvih *in vitro* sustava koji je uspješno simulirao uvjete debelog crijeva je kontinuirani trostupanjski simulator (Slika 5) kojeg su 1988. godine predstavili Gibson i suradnici, dok su Macfarlane i suradnici 1998. godine predstavili poboljšanu verziju koja se uz eventualne preinake koristi i danas. Temeljni zadatak ovog sustava je bilo ispitivanje utjecaja glavnih nutritivnih i okolišnih uvjeta na proces fermentacije. Radi se o kontinuiranom sustavu kojeg čine 3 radne posude različitih radnih volumena (220 mL, 320 mL i 320 mL) pri čemu svaka posuda bioreaktora simulira određen dio debelog crijeva (uzlazni, poprečni ili silazni dio). Shodno dijelu debelog crijeva koji se simulira, održava se i različita pH vrijednost, 5.8, 6.2 ili 6.8. Specifičnost ovog modela je u tome da se nakon završenog početnog šaržnog procesa nastavlja vođenje procesa i kontinuirano u trajanju od 16 dana kako bi se uspostavilo ustaljeno stanje nakon čega se 22 dana ispituje testirana komponenta dodana u sustav, a u posljednjoj fazi koja je ujedno faza ispiranja, se ispituje trajanje uočenog djelovanja testirane komponente nakon što se ista više ne nalazi u hranjivom mediju. Ova faza može trajati i do 50 dana, a vrijeme zadržavanja u takvom sustavu varira od 27 do 67 sati (Gibson i sur., 1988; Macfarlane i sur., 1998).



Slika 5. Kontinuirani sustav za simulaciju uvjeta debelog crijeva u 3 faze konstruiran od Macfarlane i suradnika, 1998. godine (Prilagođeno prema Williams i sur., 2015).

SHIME⁸ sustav (Slika 6), osmislili su i opisali 1993. godine Molly i suradnici. Model simulira cjelokupan probavni sustav od želudca do debelog crijeva i sastoji se od 5 bioreaktora čiji volumeni variraju od 300 - 1600 mL, od kojih prva dva simuliraju želudac i tanko crijevo, a zadnja tri debelo crijevo (uzlazni, poprečni i silazni dio debelog crijeva). Uspostavljanje ustaljenog stanja u kontinuiranom procesu koji simulira želudac i tanko crijevo traje 8 dana, a proces koji simulira debelo crijevo 10 dana. Supstrat ili podloga koja se želi testirati se uvodi u sustav narednih 12 dana nakon čega slijedi faza ispiranja sa SHIME podlogom sljedećih 10 dana. Samo vrijeme zadržavanja u takvom sustavu je 84 sata (Molly i sur., 1993; Alander i sur., 1999). Razvijena je i proširena verzija SHIME modela nazvana Twin-SHIME koji čine dva paralelna SHIME sustava čime se omogućuje istovremena usporedba dvaju različitih tretmana (Van Den Abbeele i sur., 2010).

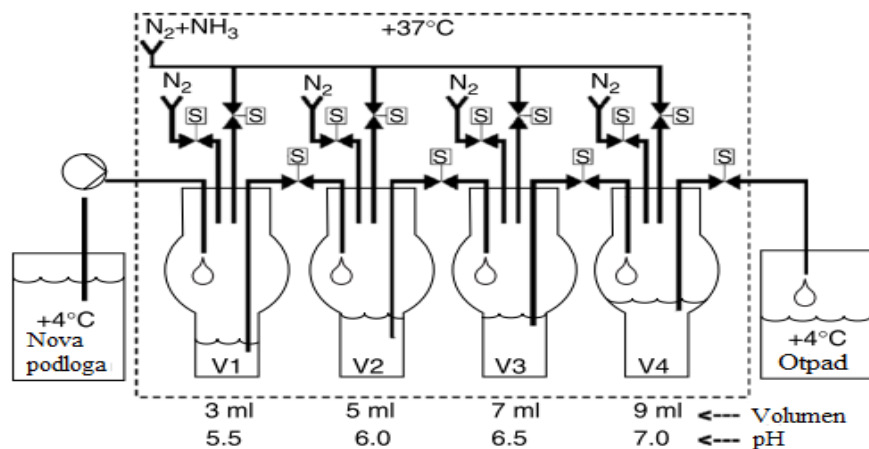


Slika 6. SHIME model koji su konstruirali Molly i suradnici 1993. Godine V1- Želudac, V2- Tanko crijevo, V3- Uzlazni dio debelog crijeva, V4- Poprečni dio debelog crijeva, V5- Silazni dio debelog crijeva (Prilagođeno prema Williams i sur., 2015).

Enteromix model (Slika 7) osmislili su i opisali MäkiVuokko i suradnici 2005. godine. To je modificirani, polukontinuirani simulator debelog crijeva koji se sastoji od 4 paralelne jedinice, odnosno 4 staklena bioreaktora koji imitiraju uvjete proksimalnog-V1, poprečnog-V2, distalnog-V3 i sigmoidalnog crijeva/rektuma-V4. Svaki bioreaktor ima različit pH, ovisno o dijelu debelog crijeva koji imitira i radni volumeni u svakom od bioreaktora su relativno mali (6, 8, 10 i 12 mL) u usporedbi s prethodno opisanim modelima. Sistem funkcionira na način da se 3 sata nakon inokulacije s uzorkom fecesa u V1 upumpava podloga za rast sa ili bez supstrata koji se želi testirati. Mikrobiota fermentira podlogu za rast 3 sata nakon čega se 3 mL fermentirane podloge prebacuje u V2, a 3 mL nove podloge za rast se dodaje u V1.

⁸ SHIME – eng. “Simulator for Human Intestinal Microbiological Ecosystem”

Ovakav način prebacivanja podloge za rast iz bioreaktora u bioreaktor se provodi kroz sve bioreaktore te se ciklus ponavlja 48 sati nakon čega se sustav zaustavlja i uzimaju se uzorci iz svakog bioreaktora. Model je dizajniran specifično za istraživanje učinaka mikrobne fermentacije ugljikohidrata. Prednost modela je njegova mogućnost provođenja 4 paralelna eksperimenta koristeći samo jedan fekalni inokulum dok mu je nedostatak mali radni volumen i polukontinuirani način rada što uvjetuje provođenje kratkotrajnih eksperimenata koji imaju smanjenu *in vivo* važnost. Ali unatoč tome, model ipak ima dokazano dobru korelaciju s *in vivo* istraživanjima (Mäkivuokko i sur., 2005).

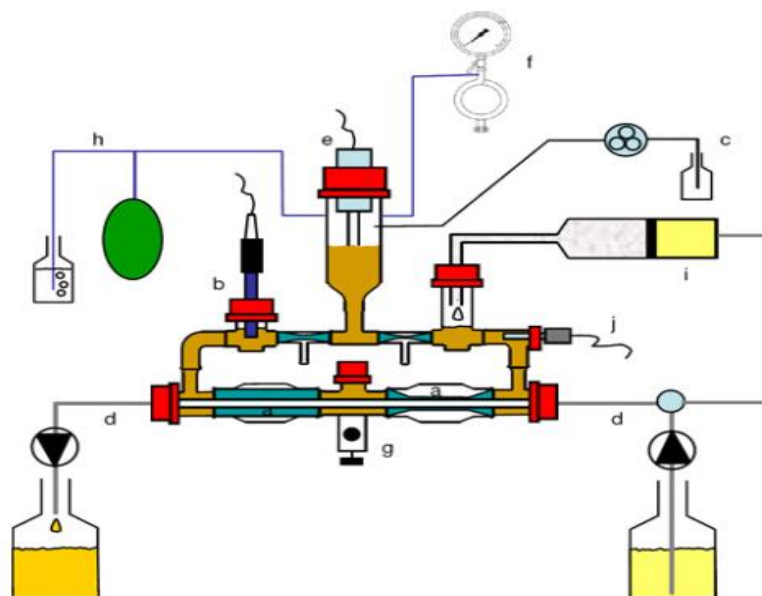


Slika 7. EnteroMix sustav su razvili Mäkivuokko i suradnici 2005. godine (Prilagođeno prema Ouwehand i Vaughan, 2006).

TIM-2⁹ sustav za simulaciju uvjeta debelog crijeva (Slika 8) je dio TNO intestinalnih modela, a razvili su ga Minekus i suradnici 1999. godine. Tim-2 se sastoji od brojnih staklenih jedinica s fleksibilnim unutarnjim stijenkama koje omogućuju vjerodostojnu imitaciju peristaltičkih kretanja unutar crijeva. To se postiže pumpanjem vode zagrijane na tjelesnu temperaturu (37 °C) u redovnim intervalima u prostor između staklenog omotača i fleksibilne stijenke, a kako bi se omogućilo odgovarajuće miješanje, smijer toka se također obrće u redovnim intervalima. Model sadrži i membrane sa šupljim vlaknima koje služe kao sustav za dijalizu te one uklanjaju produkte fermentaciju kao što su SCFA i voda i time održavaju fiziološke koncentracije elektrolita čime sprječavaju pojavu kompetitivne inhibicije aktivnosti enzima uslijed nakupljanja mikrobnih metabolita u sustavu. U sustavu su uvjeti anaerobni što se postiže pomoću N₂ koji teče kroz sustav i omogućuje normalan rast anaerobnih bakterija koje obitavaju u debelom crijevu. Mikrobiota iz uzorka fecesa se

⁹ TIM-2 – TNO's Intestinal Model za simulaciju debelog crijeva

inokulira u sustav te se u pravilnim intervalima kroz ielocekalni zalistak prihranjuje s hranjivom podlogom koja se nalazi u posudi za ilealnu dostavu. Proizvedeni plin se skuplja, uzorkuje i analizira, a dodatno se uzorci mogu uzeti iz lumena kroz otvor za uzimanje uzoraka. pH, temperaturu i volumen biomase u sustavu kontroliraju senzori te se prema potrebi parametri korigiraju dodatkom primjerice lužine ako pH padne ili kiseline ako poraste. Ono što TIM-2 sustav odvaja od drugih *in vitro* modela jest njegovo jedinstveno peristaltično miješanje, fiziološka gustoća mikroorganizama s fiziološkim stopom proizvodnje metabolita i prisutnost membrana sa šupljim vlaknima. Također je provedena i validacija sustava na temelju sastava i enzimske aktivnosti mikrobiote te proizvodnje i koncentracije SCFA. Potencijal TIM-2 sustava kao alata za istraživanje fermentacije se provjeravao u istraživanjima sa pektinom, fruktooligosaharidima, laktulozom i laktitolom. Kako bi se karakterizirala fermentacija, određivali su se obrasci ukupne proizvodnje kiselina i SCFA te se testirala stabilnost mikrobiote nakon inokulacije sa svježim ljudskim fekalnim uzorcima te inokulacijom s mikrobiotom koja je prethodno održavana u bioreaktoru. Oba pristupa su rezultirala s ukupnim brojem anaerobnih bakterija višim od 10^{10} CFU/mL te s fiziološkim razinama *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* i *Clostridium* što potvrđuje njegovu reproducibilnost naspram *in vivo* pristupa (Venema i sur., 2000).

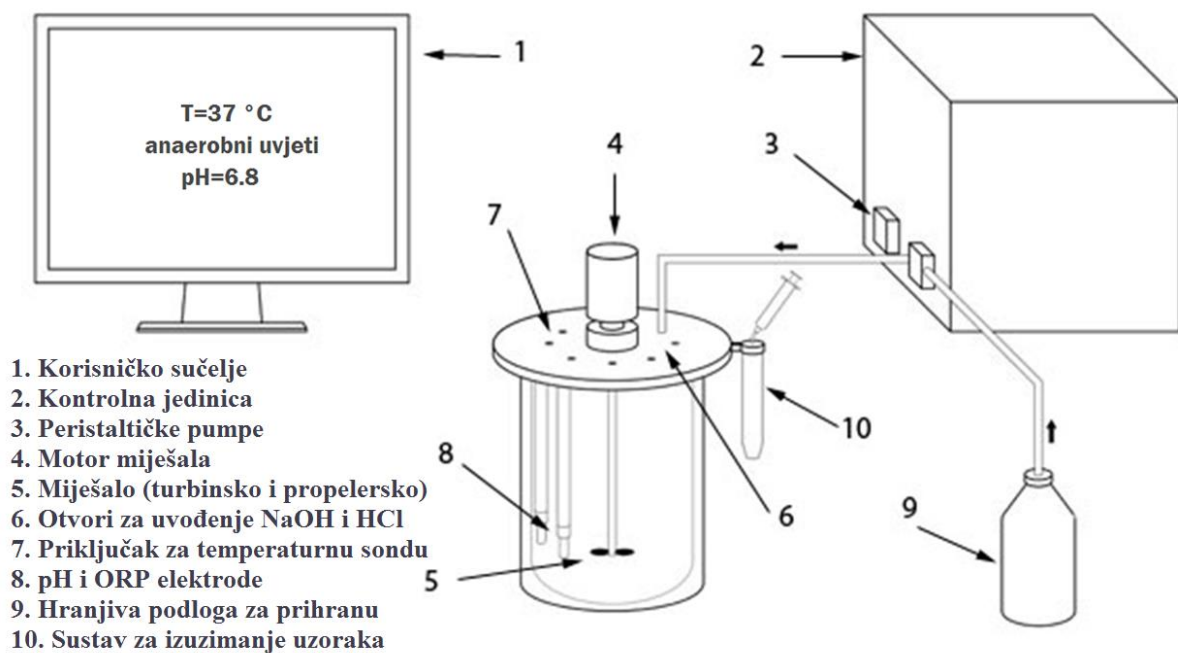


Slika 8. Shematski prikaz TIM-2 sustava koji su razvili Venema i suradnici 2000. godine a) odjeljci za peristaltičko miješanje fekalne tvari, b) pH elektrode, c) pumpa za dodavanje kiseline ili lužine, d) membrana sa šupljim vlaknima, e) senzor razine, f) ulaz za dobavu dušika, g) otvor za uzorkovanje, h) ventili za ulaz/izlaz plinova, i) posuda za hranjivu podlogu, j) temperaturni senzor (Rehman i sur., 2012).

2.4.1. Bioreaktor, izgled i karakteristike

Za provedbu eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korišten je bioreaktor Jupiter 2.0 (Solaris Biotechnology, Porto Mantovano, Italija) radnog volumena 2 L. Jupiter 2.0. je modularni fermentacijski sustav koji se može sterilizirati, namijenjen je za uzgoj mikrobnih i staničnih kultura te podržava aerobnu i anaerobnu fermentaciju. Kompletan sustav se sastoji od: posude za fermentaciju, kontrolnog modula s računalom te se cijeli sustav kontrolira putem instaliranog „Leonardno“ programskog paketa.

Bioreaktor je opremljen sustavom za regulaciju temperature, sustavom za korekciju pH vrijednosti, elektrodom koja mjeri oksidacijsko reduksijski potencijal (ORP) koji je indikator anaerobnosti procesa, masenim mjerачem protoka dušika, senzorom razine, sustavom za aseptično izuzimanje uzoraka, tehničkom vagom i kontrolnom jedinicom s integriranim peristaltičkim pumpama. Temperatura se regulira pomoću vode koja kontinuirano kruži kroz dvostruku stijenku plašta posude fermentora. Vodu zagrijavaju dva ugrađena grijača. Otvori za inokulaciju, uzimanje uzoraka, prtok hranjive podloge, dodavanje kiseline i lužine te dotok dušika se nalaze na gornjem dijelu bioreaktora, odnosno na poklopcu. Dva turbinska i jedno propellersko miješalo pokreće elektromotor snage 266 W. (User and Maintenance manual for Jupiter 2.0., 2016).



Slika 9. Skica bioreaktora Jupiter 2.0



Slika 10. Bioreaktor Jupiter 2.0 (User and Maintenance manual for Jupiter 2.0., 2016)

2.4.2. Podloga za uzgoj mikrobiote u *in vitro* simulatorima

Razvojem industrije i poboljšanjem životnog standarda, drastično se promijenila i prehrana. Sve je više hrane procesirano, jede se masnija hrana, više mesa i mesnih prerađevina te sve manje voća i povrća te je ponajviše povećan unos slatkiša i zaslađenih pića. Upravo navedeni način prehrane karakterizira takozvanu „Zapadnjačku prehranu“ koja podrazumijeva visoku konzumaciju animalnih proteina, jednostavnih šećera, škroba i masti s istovremeno niskim unosom povrća i prehrambenih vlakana. Takav obrat u prehrani, gdje je došlo do potpune promjene u načinu prehrane koja se konzumirala u predindustrijsko doba, je uzrokovao negativan utjecaj na određene prehrambene indikatore kao što su: glikemijsko opterećenje, sastav masnih kiselina, sastav makronutrijenata, gustoća mikronutrijenata, acido - bazna ravnoteža, omjer natrija i kalija te sadržaj vlakana (Cordain i sur., 2005; He i sur., 2013).

Na temelju činjenice da u Hrvatskoj dominira tzv. „zapadnjačka prehrana“ te na temelju podataka u literaturi (Gibson i sur., 1988; van Nuenen i sur., 2003) o sastavu hranjive podloge koja se koristi u istraživanjima sastava crijevne mikrobiote u *in vitro* sustavima odlučeno je sastav hranjive podloge, uz određene prilagodbe, za *in vitro* sustav koji će se koristiti u eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada.

2.4.3. Karakteristike sastavnica hranjive podloge

Hranjiva podloga za uzgoj mikrobiote se sastoji od komponenti nabrojanih u Tablicama 2, 3 i 4. Sastojci u Tablici 2 su razni ugljikohidrati od kojih pektin, ksilan, arabinogalaktan i amilopektin zbog svoje složene građe imaju funkciju i prehrambenih

vlakana. Glavno svojstvo vlakana jest njihova teška probavljivost jer ljudski organizam ne posjeduje enzime potrebne za razgradnju vlakana i zbog toga vlakna u debelo crijevo dopijevaju uvelike neprobavljena gdje ih mikrobiota u crijevu fermentira i na taj način se stimulira rast poželjnih bakterija. Fermentacijom vlakana, bakterije proizvode kratkolančane masne kiseline koje su pak primarni izvor ugljika i energije za kolonocite (Simpson i Campbel, 2015). Baktipepton je izvor proteina u odabranoj hranjivoj podlozi, dok Tween 80 služi kao surfaktant i emulgator te se dodaje u podlogu kako bi se spriječilo ljepljenje podloge na stijenke cijevi za prihranu (Wang i sur., 2003).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Etičko pitanje

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta MicroEquilibrium - Istraživanje ravnoteže mikrobioma debelog crijeva, odobreno od strane Etičkog povjerenstva Dječje bolnice Srebrnjak te prihvaćeno od strane Etičkog povjerenstva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sastav hranjive podloge za uzgoj mikrobiote u bioreaktoru

U eksperimentalnom dijelu radu korištena je SIEM (eng. „Simulated Ileal Efflux Medium“) kompleksna hranjiva podloga čiji je potpun sastav je naveden u Tablicama 2, 3 i 4.

3.1.1.1. SIEM hranjiva podloga

SIEM hranjiva podloga svojim sastavom simulira neprobavljene komponente hrane koje iz ileusa (krajnji dio tankog crijeva) ulaze u debelo crijevo kroz ileo-cekalni zalistak. Hranjive karakteristike ove podloge tipične su za tzv. zapadnjačku prehranu koju karakteriziraju visok udjel ugljikohidrata u prehrani. Dio sastava podloge koji se odnosi na ugljikohidrate naveden je u tablici 2.

Tablica 2. Sastav hranjive podloge.

SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)
Pektin	4,7
Ksilan	4,7
Arabinogalaktan	4,7
Amilopektin	4,7
Kazein	23,5

Škrob	39,2
Tween 80	17,0
Baktopepton	23,5
Žučne soli	0,3

3.1.1.2. Otopina soli

Sastav otopine soli, drugog imena dijalizat, prikazan je u Tablici 3. Pripremljena otopina soli se sterilizira odvojeno od SIEM hranjive podloge koja prije sterilizacije sadrži samo sastavnice iz Tablice 2, a u nju se dodaje nakon sterilizacije u autoklavu kako bi se spriječile potencijalne neželjene reakcije do kojih bi eventualno moglo doći uslijed visokih temperatura tokom sterilizacije.

Tablica 3. Sastav otopine soli.

SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)
$K_2PO_3 \times 3H_2O$	2,500
NaCl	3,500
$FeSO_3 \times 7H_2O$	0,005
$MgO_3 \times 7H_2O$	0,500
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,350
Žučne soli	0,050
Cisetin hidroklorid	0,300

3.1.1.3. Otopina vitamina

Sastav otopine vitamina prikazan je u Tablici 4. Priprema se 10 mL vitaminske otopine za svaki uzgoj. Pripremljena otopina se ne sterilizira jer bi došlo do degradacije određenih vitamina koji su termolabilni. Nakon pripreme, otopina se čuva u hladnjaku (6 °C). U SIEM podlogu se dodaje neposredno prije prihrane.

Tablica 4. Sastav vitaminske otopine

SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)
Menadion	0,010
D-biotin	0,020
Vitamin B ₁₂	0,005
Pantotenat	0,100
Nikotinamid	0,050
p-aminobenzen	0,050
Tiamin	0,030
Destilirana voda	Do 10 mL

3.1.2. Mikrobna kultura za inokulaciju

U ovom diplomskom radu kao izvor mikrobne kulture za inokulaciju hranjive podloge korišten je uzorak stolice zdrave pretila ženske osobe. Provedenom anketom i antropološkim mjerenjem ustanovljeno je da osoba ima indeks tjelesne težine (*eng.* „Body Mass Index“, BMI) 31 kg/m² prema čemu je kategorizirana kao pretila osoba. Iz provedene ankete prije uzimanja uzorka fecesa provjereno je da osoba ne konzumira lijekove ili supstance koje bi mogle izravno utjecati, odnosno mijenjati sastav crijevne mikrobiote.

3.1.3. Laboratorijska oprema za pripremu i praćenje procesa te obradu uzoraka

3.1.3.1. Pribor

- Automatske pipete
- Erlenmeyerove tikvice od 500 mL, 1 L i 2 L
- Silikonske cijevi različitih promjera
- Kleme
- Falcon kivete od 15 i 50 mL
- Spojnice
- Staklene boce od 250 i 500 mL

3.1.3.2. Bioreaktor s miješalom (Fermentor)

U ovom diplomskom radu je korišten bioreaktor Jupiter 2.0 (Solaris Biotechnology, Porto Mantovano, Italija) korisnog volumena od 2 L. Bioreaktor je opremljen sustavom za regulaciju temperature, sustavom za korekciju pH vrijednosti, ORP elektrodom (mjeri oksidacijsko redukcijski potencijal), masenim mjerачem protoka dušika, senzorom razine, sustavom za aseptično uzimanje uzoraka, tehničkom vagom i kontrolnom jedinicom s integriranim peristaltičkim pumpama. Otvori za inokulaciju, uzimanje uzorka, prtok hranjive podloge, te za dodavanje kiseline i lužine nalaze se na poklopcu bioreaktora. Dva turbinska i jedno propelersko miješalo pokreće elektromotor snage 266 W. Za vođenje i upravljanje procesom koristi se programska podrška „Leonardo“.

3.1.3.3. Uređaj za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje DNA

- Maxwell[®] 16 Instrument, *Promega*, Sjedinjene Američke Države

3.1.3.4. Ostali laboratorijski uređaji

- Autoklav „Sutjeska“, Jugoslavija
- Analitička vaga model Eclipse EBL 313i, Adam, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Centrifuga Universal 320 R, Hettich, Njemačka
- Hladnjak, Beko, Turska

- Zamrzivač Forma 900 (-86 °C), Thermo scientific, Njemačka
- Magnetska mješalica, Heildoph, Njemačka
- Tehnička vaga, KERN fkb, Njemačka

3.1.3.5. Kemikalije za pripravu hranjive podloge

- Arabinogalaktan, *Sigma*, Sjedinjene Američke Države
- Baktopepton, *Sigma-Aldrich*, Španjolska
- Cijanokobalamin, *Fluka*, Sjedinjene Američke Države
- D-biotin, *Fischer-BioReagens*, Kina
- Kalcijev klorid, bezvodni, *Gram mol*, Hrvatska
- Kalijev hidrogenfosfat (99%), bezvodni, *Acros*, Španjolska
- Kazein, *Sigma*, Sjedinjene Američke Države
- Kukuruzni škrob, *Sigma-Aldrich*, Sjedinjene Američke Države
- Ksilan, *Carl Roth GmbH*, Njemačka
- L-cistein, *Sigma*, Sjedinjene Američke Države
- Magnezijev sulfat heptahidrat (99,5%), *Acros*, Španjolska
- Menadion, *Sigma*, Njemačka
- Natrijev klorid, *Carlo Erba Reagens*, Italija
- Nikotinamid, *Acros*, Sjedinjene Američke Države
- p-aminobenzen, *Sigma*, Kina
- Pantotenat (99%), *Sigma*, Kina
- Pektin (izoliran iz jabuke), *Sigma*, Švicarska
- Tiamin hidroklorid, *Fischer-BioReagens*, Njemačka
- Tween 80, *Sigma*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Željezov (II) sulfat (99,5%), *Acros*, Španjolska
- Žučne soli, *Fluka*, Novi Zeland

3.1.3.6. Plin pod tlakom

- N₂ >99,996%, tehnički komprimirani plin, *Messer*, Hrvatska

3.1.3.7. Ostale kemikalije

- Etanol (70%), *Gram mol*, Hrvatska
- Glicerol, *Gram mol*, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, *Carlo Erba Reagens*, Italija
- Meliseptol, *Braun*, Njemačka
- Mukasol, *Schulke*, Njemačka
- Natrijev hidroksid, *Carlo Erba Reagens*, Italija
- Octena kiselina, *Baker*, Njemačka
- PlivaSept Tinktura, *Pliva*, Hrvatska
- Pufer pH 3, *Reagecon*, Irska
- Pufer pH 7, *Reagecon*, Irska
- Pufer pH 10, *Reagecon*, Irska
- Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit, *Promega*, Sjedinjene Američke Države
- Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit, *Promega*, Sjedinjene Američke Države

3.1.3.8. Računalni programi za analizu podataka

- Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 1.9.1)
- Microsoft Office 2010, Microsoft, Sjedinjene Američke Države

3.2. METODE

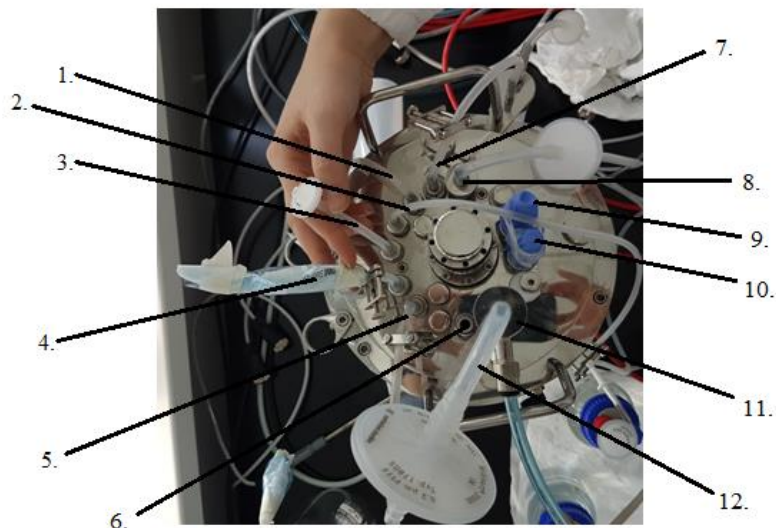
3.2.1. Priprema hranjivih podloga

Kompleksna hranjiva podloga, SIEM, za eksperimentalni dio ovog rada je pripravljena prema literaturnim podacima (van Nuenen i sur., 2003) na način da su se prvotno odvagani sastojci iz Tablica 2, 3 i 4 zasebno otopili u demineraliziranoj vodi. Prvo su sastojci iz Tablice 2 (točne odvage sastojaka prikazane u Prilogu 1) preneseni u Erlenmeyerovu tikvicu od 1 L i otopljeni u 270 mL demineralizirane vode što predstavlja hranjivu podlogu P1 za prihranu mikrobne kulture prvog dana procesa. Potom se u Erlenmeyerovoj tikvici od 2 L pripremila ista takva hranjiva podloga otopljena u 550 mL demineralizirane vode, oznake P2, što odgovara dvostruko većoj količini nego kod P1 jer se s

P2 prihranjuje mikrobnu kulturu u bioreaktoru drugi i treći dan procesa. Potom se, kao što je već navedeno u 3.1.1.2., odvagana sol iz Tablice 3 prenese u staklenu bocu od 250 mL i otopi u 30 mL demineralizirane vode za P1. Proces se ponovi za P2 s razlikom da se dvostruko veća količina sastojaka otopi u 50 mL demineralizirane vode. Podloge su pripremljene s dvostruko manje vode jer se radi o polukontinuiranom načinu rada. Uz otopinu soli za pripremu SIEM-a, u staklenu bocu od 500 mL se pripremi i dodatna otopina soli (količine prikazane Prilogu 5) koja se prije sterilizacije prenese u bioreaktor. pH i ORP elektrode kalibrirane su prije sterilizacije, montirane na gornju ploču bioreaktora te sterilizirane uronjene u prethodno pripremljenoj otopini soli. Na temelju podataka iz literature (Maathuis i sur., 2009), izračunata je količina vitamina potrebna za pripravu 10 mL vitaminske otopine sastava navedenog u Tablici 4 (točna odvaga sastojaka prikazana u Prilogu 6). Otopina je pohranjena u hladnjaku na 6 °C.

3.2.2. Sterilizacija podloge, pribora i aparature

Prije same sterilizacije, dio pribora se odmah cijevima spaja na bioreaktor na za njih predviđena mjesta (Slika 7). Na položajima 1 i 2 su spojene boce s otopinom NaOH i HCl za regulaciju pH vrijednosti tokom procesa, na položaju 4 je spojena Erlenmeyerova tikvica s hranjivom podlogom P1, a na položaju 5 se spaja Erlenmeyerova tikvica od 1 L u kojoj se homogenizira uzorak fecesa za inokulaciju. Također, prije sterilizacije je potrebno baždariti pH i ORP elektrodu i zatvoriti sve otvore koji se ne koriste bilo s klemom ili otvorene s filterom za zrak. Bitno je zabrtviti sve druge otvore na bioreaktoru, zaštititi priključke za pH i ORP elektrodu, otvorene nastavke cijevi obložiti folijom, a čepove od vate papirom zbog pare koja nastaje tijekom sterilizacije. Laboratorijski bioreaktor, zajedno s pomoćnim dijelovima, se sterilizira u autoklavu na temperaturi od 121°C u ukupnom trajanju od 15 minuta. Otopine soli, koje su sterilizirane odvojeno od hranjivih podloga, je potrebno odmah nakon sterilizacije prebaciti u Erlenmeyerove tikvice sa SIEM hranjivom podlogom kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije SIEM hranjive podloge.



Slika 11. Položaji priključaka na poklopcu bioreaktora (prije sterilizacije):

Na gornjoj ploči nalaze se otvori za: 1) unos lužine, 2) unos kiseline, 3) izdvajanje podloge, 4) unos hranjive podloge, 5) inokulaciju, 6) temperaturna sonda, 7) izuzimanje uzoraka, 8) filter za ulazni plin, 9) pH elektroda 10) ORP elektroda, 11) hladilo, 12) filter za izlazni plin

3.2.3. Sastavljanje aparature i postavljanje parametara procesa

Nakon sterilizacije je potrebno spojiti kompletan sustav prije početka procesa (Slika 11). Tako se na položaje 9 i 10 priključuju kablovi za spajanje pH i redoks sonde sa sučeljem koje upravlja cijelim sustavom. U zaštitnu cijev temperaturne sonde na položaju 6 se ulijeva glicerol u koji se stavlja sonda koja je također spojena sa sučeljem. Grijači vode u plaštu bioreaktora su spojeni s kontrolnom jedinicom na kojoj se nalaze peristaltičke pumpe i koja je također spojena sa sučeljem. Na za to predviđeno mjesto se priključuje motor koji pokreće miješalo u bioreaktoru te se na hladilo priključuju cijevi kojima se hladna voda uvodi u plašt bioreaktora u svrhu regulacije temperature u sustavu. Za osiguravanje anaerobnih uvjeta, u sustav se uvodi dušik (Slika 11, položaj 8) u količini 0,2 NI/min.

Nakon sastavljanja potrebne aparature te prije početka samog procesa, potrebno je prvo postaviti željene parametre. Svi parametri se podešavaju preko korisničkog sučelja upravljačke jedinice na kojem je instaliran „Leonardo“ programski paket. Pošto se simuliraju uvjeti uzlaznog, poprečnog i silaznog dijela debelog crijeva, temperatura u sustavu je podešena na 37 °C, a pH, ovisno od dijelu debelog crijeva koji se simulira, na 5.8, 6.2 te 6.8.

Da bi se spriječilo slijeganje neotopljenih sastojaka u bioreaktoru, miješanje je prije inokulacije podešeno na 50 o/min¹⁰. Radni volumen bioreaktora je bio 600 ml.



Slika 12. Laboratorijski sustav za vođenje procesa fermentacije u bioreaktoru

3.2.4. Faza prilagodbe mikrobiote u bioreaktoru

Kao što je već spomenuto u poglavlju 3.2.1., u bioreaktoru se nalazi 500 mL otopine soli kako tijekom sterilizacije pH i ORP elektroda nebi ostale suhe. Pošto je željeni početni volumen u bioreaktoru 300 mL, prije inokulacije mikrobiote u bioreaktor, višak otopine soli se ispumpava i odbacuje. Eksperiment se započinje homogeniziranjem svježeg uzorka fecesa ciljane mase 30 g, međutim ovisno o dobavi uzorka fecesa, u bioreaktor je u prvom uzgoju inokulirano 28,8 g, a u drugom 30 g. Feces se homogenizira u otopini soli volumena 300 mL u Erlenmeyerovoj tikvici od 1 L iz koje se potom homogenizat prebacuje u bioreaktor pomoću peristaltičkih pumpi. Faza prilagodbe mikrobiote u trajanju od 4 sata je provedena u bioreaktoru u uvjetima koji simuliraju uzlazni dio debelog crijeva (37 °C i pH 5.8). Prilagodba je vođena u anaerobnim uvjetima uvođenjem dušika u bioreaktor uz ciklički profil promjene brzine rotacije miješala gdje je minimalna brzina bila 30 o/min, a maksimalna 150 o/min (10 minuta pri 30 o/min uz stupnjevitu promjenu na 150 o/min kroz 2 minute).

3.2.5. Vođenje anaerobnog mikrobnog procesa u bioreaktoru

Nakon faze prilagodbe, slijedi faza uspostave stabilne ravnotežne mikrobiote. Radi se o šaržnom postupkom koji počinje miješanjem bazne hranjive podloge P1 volumena 300 ml

¹⁰ o/min - okretaja po minuti

(poglavlje 3.2.1.) sa suspenzijom mikrobiote u otopini soli (poglavlje 3.2.4.) istog volumena čime se postiže radni volumen od 600 mL u bioreaktoru i koji traje 24 sata.

Nakon 24 sata je izvršena izmjena podloge na način da je 300 mL fermentirane podloge (mješovita mikrobna kultura i podloga u bioreaktoru) ispumpano van dok je 300 mL ostavljeno u bioreaktoru te je potom dodano 300 mL P2 hranjive podloge pomoću peristaltičkih pumpi brzinom od 10 mL/min. Prije početka ubacivanja P2 hranjive podloge, pH u sustavu je podešen na 6.2 jer se u ovoj fazi eksperimenta simuliraju uvjeti poprečnog dijela debelog crijeva.

Na identičan način je provedena i treća, odnosno posljednja faza, u kojoj se simuliraju uvjeti silaznog dijela debelog crijeva. Nakon izmjene podloge i prihrane s preostalim 300 mL P2 hranjive podloge, podešen je pH na 6.8 kako bi odgovarao simuliranom dijelu debelog crijeva. Nakon proteklih 72 sata procesa u kojima se svakih 24 sata vršila izmjena podloge i prihrana sa svježom hranjivom podlogom, proces je vođen dodatnih 24 sata kako bi se odredila biodinamika mikrobiote i nakon prestanka prihrane sa svježom hranjivom podlogom.

Homogenost medija u bioreaktoru tijekom procesa održavana je definiranim profilom miješanja (10 minuta pri 30 o/min uz stupnjevitu promjenu na 150 o/min kroz 2 minute). Tijekom fermentacije, željene pH vrijednosti su održavane dodavanjem otopine NaOH ili HCl, dok je anaerobnost osigurana kontinuiranim protokom dušika (0,2 NL/min). Za vrijeme ukupnog trajanja procesa od 96 sati praćeni su svi bitni parametri procesa (brzina okretaja miješala, temperatura, pH vrijednost, protok dušika, oksido-redukcijski potencijal). Za praćenje biodinamike mikrobiote svakih 12 sati su uzimani uzorci medija pomoću sustava za sterilno izuzimanje te su uzorci odmah po izuzimanju pospremljeni u ledenicu na -80°C.

3.2.6. Automatizirana izolacija DNA

Prije same izolacije DNA, potrebno je alikvot odmrznutih uzoraka centrifugirati na 1000 x g pri 10 °C te dobiveni supernatant otpipetirati direktno u za to predviđenu jažicu kazete Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit-a. Izolacija DNA iz početnih uzoraka fecesa i sakupljenih uzoraka iz bioreaktora provedena je na Maxwell uređaju prema uputama proizvođača. Za izolaciju DNA iz uzoraka izuzetih tijekom uzgoja u bioreaktoru korišten je Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit, dok je za uzorke svježeg fecesa korišten Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit. U jažicu za dodavanje uzoraka kazete Maxwell 16 Tissue DNA

Purification Kita-a stavljeno je 0,5 g fecesa dok je u slučaju Cell DNA Purification Kit-a dodano 400 μ L suspenzije stanica. U jednom radnom ciklusu moguće je istovremeno obraditi 16 uzoraka. Postupak izolacije DNA se izvodi prema uputama proizvođača za pojedini kit za izolaciju. Na kraju procesa se dobije 300 μ L izolirane i pročišćene DNA u elucijskom puferu od koje se 200 μ L otpipetira u sterilnu epicu s čepom i pohranjuje u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do slanja na sekvencioniranje, dok se preostalih 100 μ L koristi za određivanje koncentracije izolirane DNA iz uzoraka pomoću Nano-drop spektrofotometra.

3.2.7. Mjerenje koncentracije DNA

Određivanje koncentracije DNA iz uzoraka provedeno je na Shimadzu BioSpec Nano spektrofotometru. Za slijepu probu je korišten elucijski pufer iz Maxwell kompleta. Koncentracije izolirane DNA za oba uzgoja prikazane su u tablici 6.

3.2.8. Sekvencioniranje 16S rRNA marker gena

Sekvencioniranje DNA je izvršeno u Molecular Research Lab, Teksas, SAD kao ugovorena vanjska usluga pri čemu je korištena metoda sekvencioniranja sparenih krajeva (pair-end sequencing) na Illumina MiSeq uređaju. Korištene su početnice 331F-806R za umnažanje V3 i V3 regija gena koji kodira za 16S rRNA korištenjem polimerazne lančane reakcije (PCR) u 30 ciklusa. Nakon umnažanja fragmenata gena, PCR produkti su provjereni na 2%-om agaroznom gelu te su pročišćeni korištenjem kalibriranih Ampure XP kuglica. Pročišćeni PCR produkti su korišteni za izradu DNA knjižnica upotrebom Illumina TruSeq DNA library protokola te su zatim sekvencionirani Illumina MiSeq platformom.

3.2.9. Obrada podataka sekvencioniranja i analiza bakterijske bioraznolikosti

Sirovi podaci sekvencioniranja fragmenta gena 16S rRNA dolaze u dva dokumenta u FASTQ formatu koji sadržava podatke o očitanoj slijedi nukleotida i o kvaliteti očitavanja svakog pojedinog nukleotida. Svaki dokument odgovara jednom smjeru čitanja DNA i da bi se dobio ukupni umnoženi fragment potrebno je spojiti dva očitavanja (eng. read). Za spajanje je korišten program PandaSeq sa standardnim postavkama i s očekivanom dužinom spojenih sljedova od 300 do 500 nukleotida. Spojeni sljedovi su služili kao ulazni podaci za

programski paket QIIME. Svaki je slijed dodijeljen odgovarajućem uzorku na osnovu očitog barkoda koji se nalazi na početku svakog slijeda. Slijedovi u kojima prvih 8 nukleotida nije u potpunosti odgovaralo jednom od korištenih barkodova su odbačeni iz daljnjih analiza. Slijedovi svakog uzorka su klasterirani u operacijske taksonomske jedinice (OTU¹¹) sa minimalnom pokrivenošću od 97% i minimalnom identičnošću od 97% korištenjem UCLUST algoritma implementiranog u QIIME programskom paketu (Caporaso i sur; 2010). Reprezentativni slijed svakog klastera je poravnat sa SILVA taksonomskom bazom korištenjem pynast algoritma. Filogenetsko stablo je izrađeno korištenjem Neighbor-joining metode s Kimura dvo-parametarskim modelom implementiranim u Clearcut programu. Za određivanje različitosti između svakog para uzoraka (bakterijskih zajednica) korištena je UniFrac metrika koja se zasniva na dijelu duljine grane stabla 16S rRNA gena dijeljenog između dva uzorka. Mala UniFrac udaljenost karakterizira uzorke koji imaju sličan sastav bakterijskih zajednica i koje su evolucijski bliske. U upotrebi su dva tipa UniFrac metrika - težinska i netežinska. Težinska UniFrac metrika pri izračunu udaljenosti zajednica uzima u obzir prisutnost i zastupljenost pojedine taksonomske jedinice, dok netežinska uzima u obzir samo prisutnost.

Rezultat obrade sirovih podataka sekvencioniranja u programu QIIME je biom tablica, koja sadrži sve informacije o sekvencama i taksonomskoj identifikaciji uzoraka i html dokument koji sadrži poveznice za vizualizaciju alfa i beta raznolikosti te određenu taksonomsku klasifikaciju dostupnih taksonomskih kategorija po uzorcima prikazanu stupčastim dijagramima.

Na grafičkim prikazima (poglavlje 4. Rezultati i rasprava) se nalaze rezultati dvaju uzastopnih uzgoja provedenih u bioreaktoru. Šiframa B11 - B111 su označeni uzorci iz prvog uzgoja, šifre BM1 – BM7 odnose na uzorke iz drugog uzgoja, a šifre F10 i GM2 označavaju uzorke izvornog fecesa za svaki pojedini uzgoj. Tablica 6 prikazuje opis šifriranih uzoraka i izmjerenu koncentraciju izolirane DNA.

¹¹ OTU- eng. „Operational taxonomic unit“

Tablica 6. Prikaz koncentracije izolirane DNA i objašnjenje šifriranih uzoraka

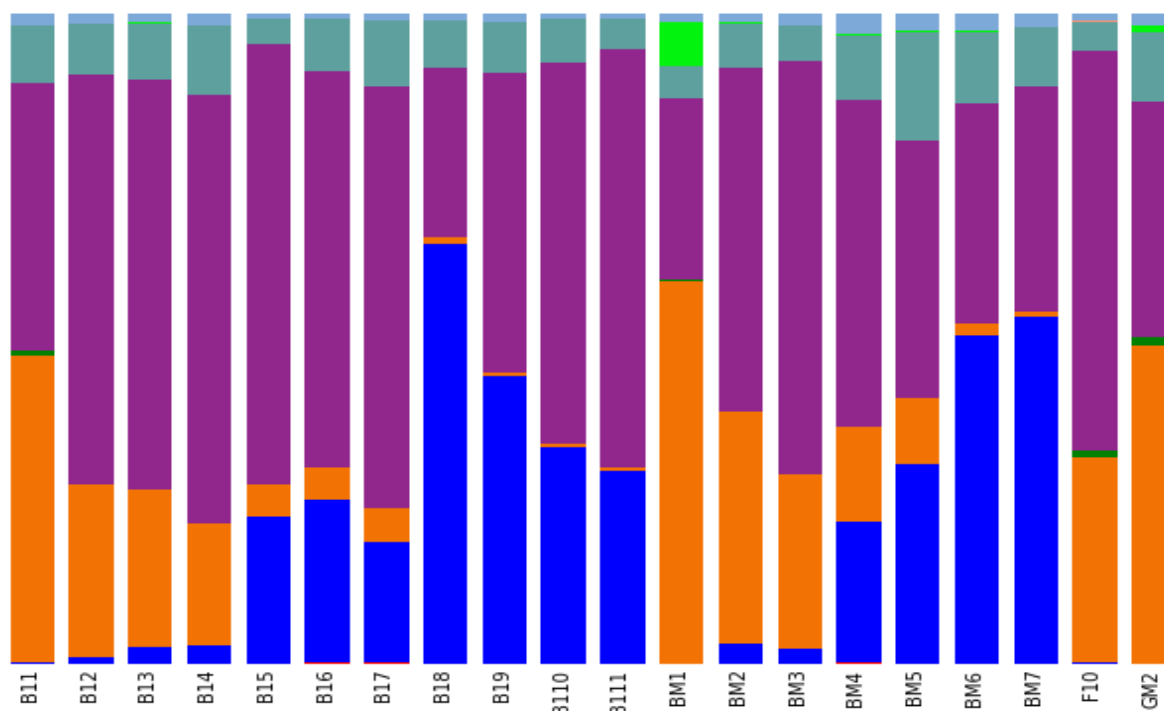
Vrijeme uzorkovanja (dan)	Prvi uzgoj	Koncentracija (ng/ μ L); 2 μ L	Drugi uzgoj	Koncentracija (ng/ μ L); 2 μ L	Prihrana
	F10	/	GM2	/	Feces
0. dan	B11	42,24	BM1	52,78	Prije HP
1. dan	B12	373,99	BM2 BM3	141,71	Hranjiva podloga 1
	B13	327,34		59,35	
	B14	278,82			
2. dan	B15	281,45	BM4 BM5	17,01	Hranjiva podloga 2
	B16	168,02		9,36	
	B17	114,63			
3. dan	B18	180,14	BM6 BM7	9,21	Hranjiva podloga 3
	B19	99,26		-5,11	
	B110	109,35			
4. dan	B111	77,71	/	/	/

4. REZULTATI I RASPRAVA

Najveći broj istraživanja koja se bave istraživanjem mikrobiote u *in vitro* sustavima gdje se prate i istražuju mnogi aspekti poput utjecaja mikrobiote na zdravlje domaćina, metabolizam ksenobiotika pomoću mikrobiote te ponajviše utjecaj raznih komponenti hrane, poglavito raznih prehrambenih vlakana, na sastav mikrobiote, energetske iskoristivosti fermentacije prehrambenih vlakana i slično. Većina istraživanja je uglavnom fokusirana na mjerenje promjena koncentracije SCFA koje proizvodi mikrobiota i nešto manje na praćenje promjene sastava mikrobiote nakon dodatka određenih supstrata, dok se najmanje provode istraživanja koja prate odgovor mikrobiote na uvjete u *in vitro* sustavu koji simulira određeni dio debelog crijeva čovjeka, što je upravo bio glavni fokus ovog diplomskog rada.

4.1. TAKSONOMSKA RAZNOLIKOST MIKROBIOTE

Taksonomska raznolikost analizirane mikrobiote koja je kultivirana u bioreaktoru se prikazuje stupičastim dijagramima. Na slici 13 se nalazi stupičasti dijagram koji prikazuje promjene u taksonomskoj raznolikosti mikrobiote prikazane na razini koljena označenog šifrom D_1, razreda označenog šifrom D_2, reda označenog šifrom D_3, porodicu označenu šifrom D_4 i roda označenog šifrom D_5 koje su vidljive u tablici na slici 14.



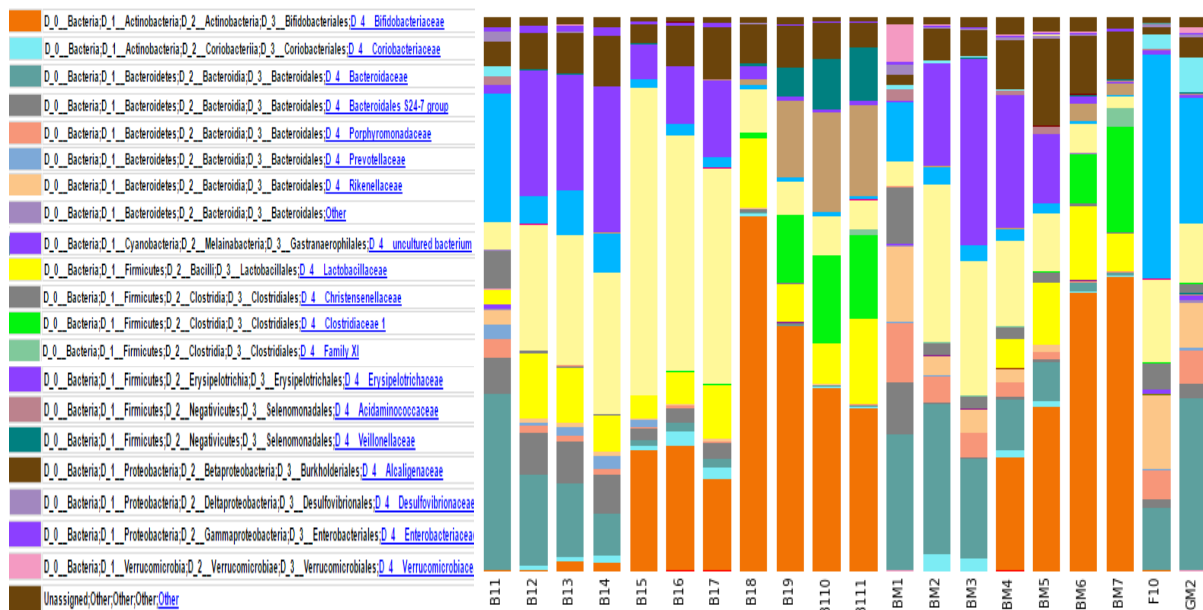
Slika 13. Stupičasti dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskih koljena u pojedinom uzorku

		Total	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B110	B111	BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	F10	GM2
Legend	Taxonomy	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	D_0_Archaea:D_1_Euryarchaeota	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Bacteria:D_1_Actinobacteria	20.4%	0.2%	1.0%	2.7%	2.9%	22.7%	25.0%	18.5%	64.5%	44.4%	33.2%	29.7%	0.1%	3.1%	2.4%	21.7%	30.6%	50.6%	53.5%	0.2%	0.1%
	D_0_Bacteria:D_1_Bacteroidetes	18.2%	47.1%	26.6%	24.2%	18.7%	4.9%	5.1%	5.0%	1.0%	0.5%	0.6%	0.5%	58.9%	35.8%	26.8%	14.7%	10.2%	1.8%	0.7%	31.7%	48.7%
	D_0_Bacteria:D_1_Cyanobacteria	0.2%	0.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.9%	1.3%
	D_0_Bacteria:D_1_Firmicutes	51.1%	41.2%	62.9%	62.9%	66.0%	67.6%	61.0%	65.0%	26.0%	46.1%	58.5%	64.4%	28.0%	52.9%	63.3%	50.3%	39.5%	33.7%	34.6%	61.5%	36.2%
	D_0_Bacteria:D_1_Fusobacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Bacteria:D_1_Gracilibacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Bacteria:D_1_Lentisphaerae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Bacteria:D_1_Proteobacteria	8.2%	8.8%	7.8%	8.8%	10.7%	4.0%	7.9%	10.1%	7.5%	7.7%	6.8%	4.6%	5.0%	6.6%	5.5%	9.8%	16.7%	11.1%	9.0%	4.4%	10.8%
	D_0_Bacteria:D_1_Saccharibacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Bacteria:D_1_Tenericutes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	D_0_Bacteria:D_1_Verrucomicrobia	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	6.7%	0.2%	0.1%	0.3%	0.3%	0.1%	0.1%	0.0%	1.1%
	D_0_Bacteria:Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Unassigned:Other	1.5%	1.7%	1.6%	1.4%	1.7%	0.8%	0.9%	1.0%	0.9%	1.3%	0.8%	0.8%	1.3%	1.4%	1.7%	3.1%	2.6%	2.7%	2.1%	1.2%	1.7%

Slika 14. Tablični prikaz postotka zastupljenosti bakterijskih koljena u sastavu analizirane crijevne mikrobiote

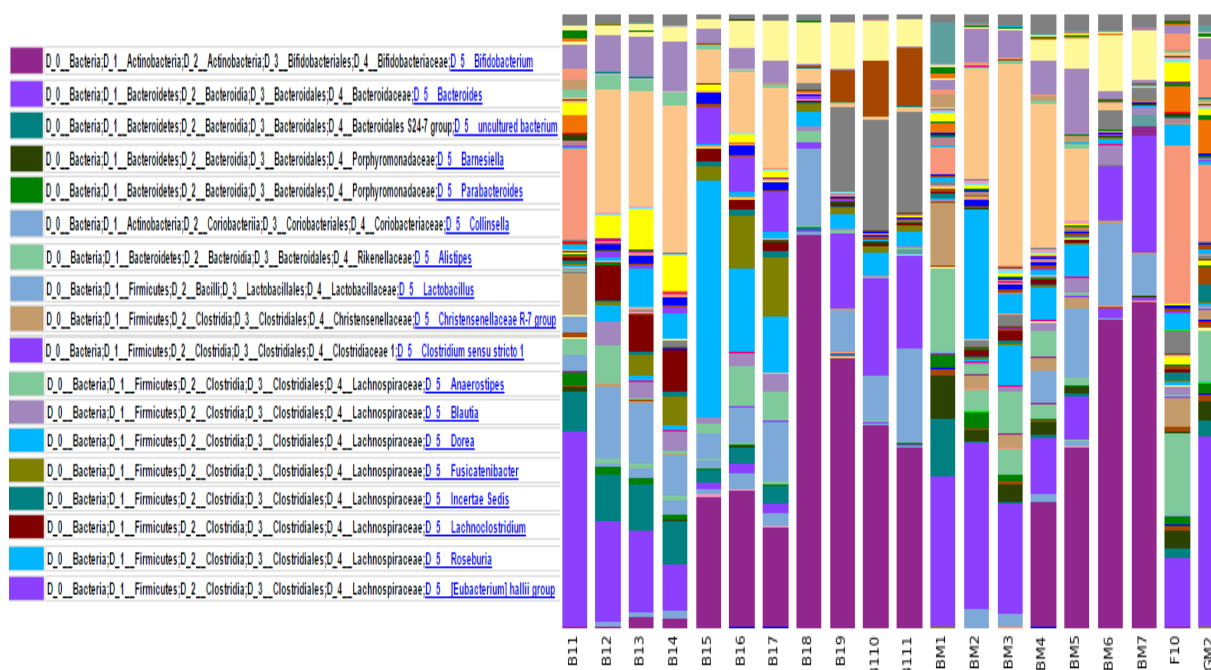
Stupičasti dijagram na slici 13 prikazuje zastupljenost pojedinih bakterijskih koljena u analiziranim uzorcima izuzetima iz bioreaktora tokom procesa uzgoj mikrobiote. Iz slike je vidljivo da su dva najzastupljenija koljena *Firmicutes*, označen ljubičastom bojom, te koljeno *Bacteroidetes* označeno narančastom bojom, što potkrepljuju podaci iz literature koja je jednoglasno utvrdila da su upravo ova dva navedena bakterijska koljena najzastupljenija u sastavu crijevne mikrobiote (Voreades i sur., 2014). U sastavu mikrobiote iz uzoraka svježeg fecesa označenih sa šiframa F10 i GM2, udjel koljena *Firmicutes* je bio u rasponu od 36,2 - 61,5 %, a koljena *Bacteroidetes* 31,7 - 48,7 %. Zastupljenost navedenih koljena se nije značajno mijenjala tijekom adaptacijskog perioda mikrobiote na uvjete u *in vitro* sustavu u trajanju od 4 sata što je vidljivo kod uzoraka B11 i BM1. Daljnim tokom procesa vidljive su značajne promjene u zastupljenosti bakterijskih koljena nakon dodatka hranjivih podloga u sustav te promjene pH vrijednosti sukladno dijelu debelog crijeva koji se simulirao. Tako je prvi dan procesa nakon dodatka prvih 300 mL hranjive podloge u sustav te pri pH 5.8, koji je karakterističan za uzlazni dio debelog crijeva (uzorci B12, B13, B14 te BM2 i BM3), došlo do opadanja zastupljenosti *Bacteroidetes* te istodobnog povećanja zastupljenosti *Firmicutes* koljena. Upravo je taj odnos gdje dolazi do opadanja zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* i istodobnog povećanja zastupljenosti koljena *Firmicutes* bio jedan od prvih biomarkera koji je povezivao sastav mikrobiote sa pretiulošću (Ley i sur., 2006). Kako je proces tekao, zastupljenost *Bacteroidetes* koljena je kontinuirano opadala uz blagi porast zastupljenosti *Firmicutes* te značajnog porasta koljena *Actinobacteria* koje je s početnih 0,1 - 0,2% u uzorku svježeg fecesa do kraja uzgoja porasla na 33,23 - 53,47%. Kontinuirano opadanje zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* tijekom procesa uzgoja mikrobiote u *in vitro* sustavu se potencijalno može pripisati nedovoljnim količinama nutrijenata koje navedeno koljeno treba za svoj rast s obzirom da *Bacteroidetes* zahtijeva nutrijente životinjskog podrijetla, a hranjiva

podloga korištena u ovom uzgoju nije sadržavala masti te je dostupna količina proteina očigledno bila nedostatna (DSMZ, 2017). Zastupljenost bakterijskog koljena *Proteobacteria* se nije značajno mijenjala tokom cijelog procesa dok je koljeno *Verrucomicrobia* u većem postotku detektirano u uzorku svježeg fecesa GM2, 1,09%, te je u adaptacijskom periodu zastupljenost porasla na 6,65%, ali daljnim tokom procesa se smanjila na gotovo nedetektibilne razine. Koljeno *Cyanobacteria* je bilo prisutno samo u uzorcima svježeg fecesa, 0,94 – 1,33% te u početnoj fazi procesa nakon čega, poput *Verrucomicrobia*, se ne detektira.



Slika 15. Stupičasti dijagram zastupljenosti bakterijskih obitelji u pojedinom uzorku

Na slici 15 je prikazana taksonomska podjela bakterijske porodice, odnosno obitelji, iz koje je vidljivo da su u uzorcima svježeg fecesa najzastupljenije bakterije obitelji *Bacteroidaceae* i *Rikenellaceae* koje pripadaju koljenu *Bacteroidetes* te bakterije obitelji *Ruminococcaceae* i *Lachnospiraceae* koje pripadaju koljenu *Firmicutes*. Dodavanjem hranjive podloge u sustav i mijenjanjem pH vrijednosti opadala je zastupljenost *Bacteroidaceae* i *Rikenellaceae* obitelji uz istodoban porast zastupljenosti *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae* i *Erysipelotrichaceae* te nakon je drugog dana procesa i dodatka druge po redu hranjive podloge, drastično porasla zastupljenost bakterija obitelji *Bifidobacteriaceae* s početnih 0,1 – 0,2% na 29,53 – 53,24%. Trećeg dana procesa, kada je u sustav dodana treća i posljednja hranjiva podloga, je vidljiv porast zastupljenosti bakterija obitelji *Clostridiaceae I* i *Veillonellaceae* (samo u prvom uzgoju) uz istodobno smanjenje zastupljenosti obitelji *Lachnospiraceae*, sve pripadnika koljena *Firmicutes*. Zastupljenost obitelji *Alcaligenaceae*, pripadnika koljena *Proteobacteria*, je relativno postojana tijekom cijelog procesa.



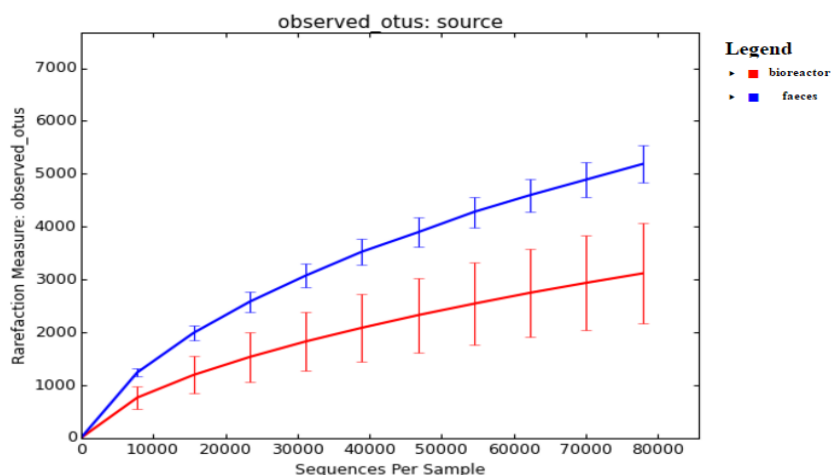
Slika 16. Stupičasti dijagram zastupljenosti bakterijskih rodova u pojedinom uzorku s odgovarajućom legendom

Promatrajući kretanja taksonomske raznolikosti bakterija na razini roda (Slika 16) očigledna je kompleksnost sastava mikrobiote. U bakterijskom koljenu *Firmicutes* u uzorcima svježeg fecesa najzastupljeniji rodovi *Faecalibacterium* i *Ruminococcaceae* UCG-014. Rod *Faecalibacterium*, u kojem je najpoznatija vrsta *Faecalibacterium prausnitzii*, je jedan od najzastupljenijih bakterijskih rodova u debelom crijevu čovjeka te se bakterijskim vrstama koje mu pripadaju pripisuju potencijalni pozitivni učinci na zdravlje domaćina (Lopez-Siles, 2017). Kako je proces tekao, zastupljenost roda *Faecalibacterium* je kontinuirano opadao što bi moglo biti uslijed njegove potrebe za esencijalnim kiselinama poput propionske, iso-butirične, n-valerične i iso-valerične kiseline (DSMZ, 2017) za svoj rast, koje nisu predviđene kao sastojci odabrane hranjive podloge korištene u ovom *in vitro* uzgoju. Kasnije u procesu uzgoja, od *Firmicutes* koljena prevladavaju rodovi *Erysipelotrichaceae* UCG-003, *Dorea*, *Clostridium sensu stricto 1* i *Roseburia* čija zastupljenost je ipak veća u drugom uzgoju te se kreće u rasponu 0,8 – 21,2 % naspram zastupljenosti u prvom uzgoju od 0,9 – 6,2 %. U koljenu *Bacteroidetes* prevladavaju rodovi *Bacteroides* i *Alistipes*, a u koljenu *Actinobacteria* su najzastupljeniji rodovi *Bifidobacterium* i *Collinsella*. Nagli porast roda *Bifidobacterium* u drugom dijelu obaju paralelnih uzgoja se možda dogodio uslijed brže reakcije navedenog roda na promjene uvjeta u *in vitro* sustavu ili se takva promjena potencijalno dogodila zbog biasa metode izolacije ili sekvencioniranja. U koljenu *Verrucomicrobia* je najzastupljeniji rod *Akkermansia* za koji je poznato da bakterijske vrste

koje mu pripadaju razgrađuju mucin te ga potom koriste kao izvor ugljika, dušika i energije za vlastiti rast (Derrien i sur., 2008). Upravo činjenica da im je glavni izvor energije mucin koji u korištenoj hranjivoj podlozi nije bio prisutan objašnjava značajniju zastupljenost *Akkermansia* roda u uzorku svježeg fecesa i uzorku izuzetom nakon adaptacijskog perioda te njeno potpuno smanjivanje daljnim tijekom procesa.

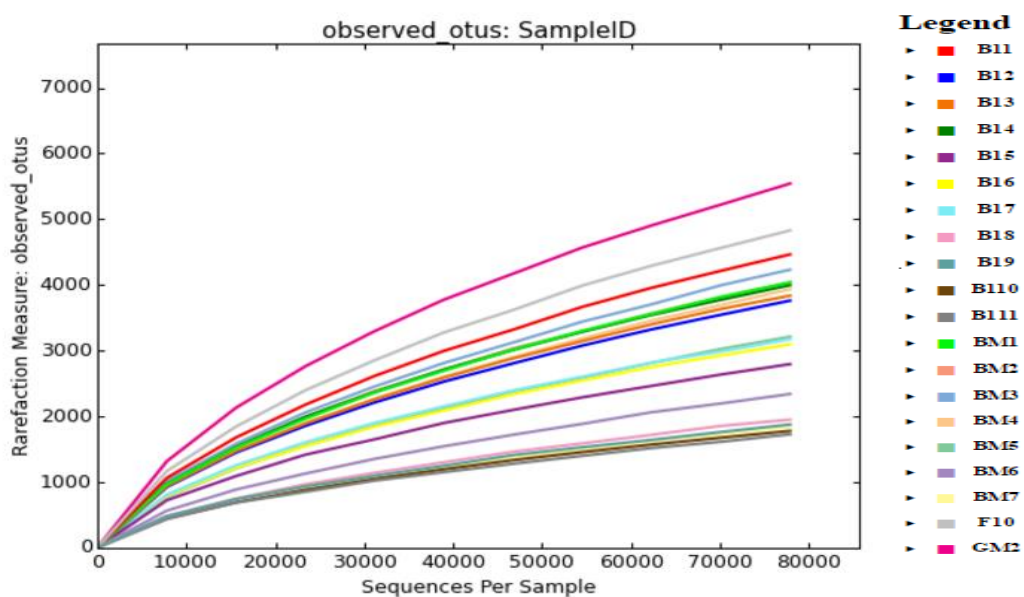
4.2. ALFA RAZNOLIKOST

Alfa raznolikost predstavlja raznolikost vrsta u svakom pojedinom uzorku ili staništu te opisuje bogastvo vrsta, ili nedostatak istih, u jednom uzorku. Određivanje alfa raznolikosti u QIIME programu se vrši u četiri koraka: prvi korak je stvaranje prorijeđenih OTU tablica koje predstavljaju bazu za određivanje alfa raznolikosti, drugi i treći koraci su mjerenje raznolikosti, odnosno određivanje prisutnih vrsta za svaku OTU tablicu dobivenu u prvom koraku slučajnim uzorkovanjem iz glavne OTU tablice u pravilnim koracima do dostizanja broja uzoraka koji odgovara najmanjem uzorku. Posljednji, četvrti, korak je generiranje dijagrama za vizualizaciju pomoći mapping dokumenta i tablica iz prethodnih koraka. Za vizualizaciju alfa raznolikosti se koriste regresijske krivulje poput krivulja prikazanih na slikama 17 i 18. Na slici 17, svaka krivulja predstavlja određenu kategoriju – u ovom slučaju prikazuje broj procijenjenih OTU-ova u uzorcima izuzetima iz bioreaktora (crvena krivulja) i iz uzoraka svježeg fecesa (plava krivulja), uz naznačenu razinu greške za svaki korak poduzorkovanja. Na slici 18 su prikazane rarefrakcijske krivulje procijenjenih OTU-ova za svaki pojedini uzorak izuzet iz bioreaktora i svaki pojedini uzorak svježeg fecesa s pripadajućom legendom. Na objema slikama je vidljivo da nije dosegnuta horizontalna asimptota što znači da broj očitanih sljedova po uzorku nije bio dovoljan da bi u potpunosti odredio njihovu bakterijsku bioraznolikost.



Slika 17. Prikaz alfa raznolikosti rarefrakcijskim krivuljama u ovisnosti procijenjenih OTU-ova i sekvenci po uzorku za uzorke izuzete iz bioreaktora i uzorak svježeg fecesa

Regresijske krivulje na slici 17 prikazuju alfa raznolikost uzoraka svježeg fecesa, plava krivulja, te uzoraka izuzetih iz bioreaktora tokom procesa uzgoja mikrobiote, crvena krivulja. Iz grafa je vidljivo da je veća alfa raznolikost prisutna u uzorcima svježeg fecesa nego kod uzoraka izuzetih iz bioreaktora. Ovakav rezultat je pak očekivan pošto je iz literature poznato da uzgojem mikrobiote u *in vitro* sustavima dolazi do smanjenja raznolikosti mikrobiote, bilo zbog pojedinih uvjeta koji pogoduju rastu određenih vrsta ili zbog sastojaka hrane dodanih u sustav koje određena bakterijska preferira kao hranu za vlastiti rast (Aguirre i Venema, 2017).

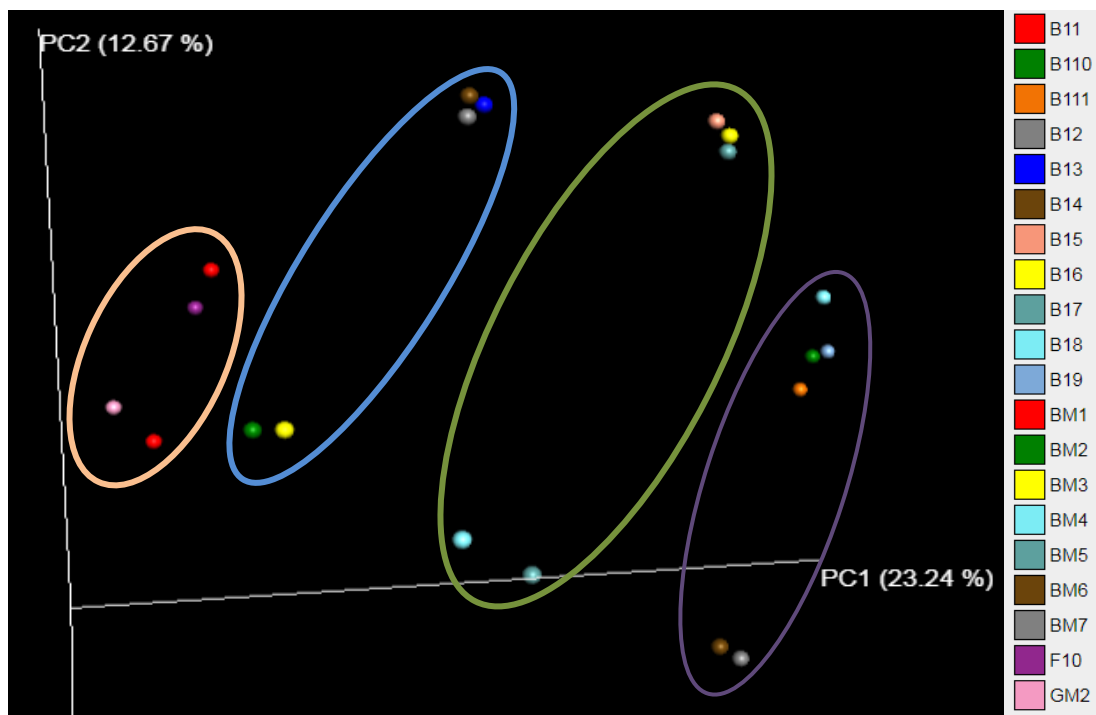


Slika 18. Prikaz alfa raznolikosti rarefrakcijskim krivuljama u ovisnosti procijenjenih OTU-ova i sekvenci po uzorku s pripadajućom legendom za svaki pojedini uzorak

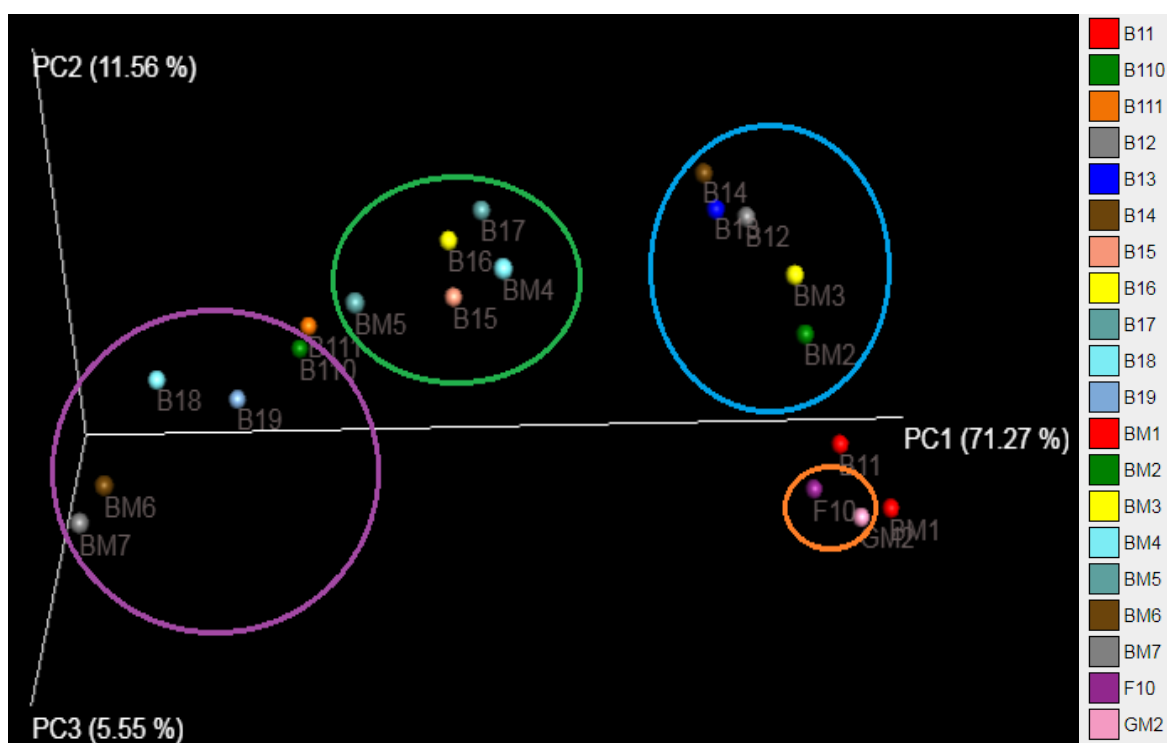
Na slici 18 su prikazane krivulje gdje svaka krivulja predstavlja određeni uzorak. Iz grafa je vidljivo da najveću alfa raznolikost imaju uzorci GM2 i F10 koji predstavljaju uzorke svježeg fecesa, potom ih slijede uzorci B11 i BM3 gdje je B11 uzorak izuzet iz bioreaktora odmah po inokulaciji, a BM3 nakon dodatka prve hranjive podloge u bioreaktor. Uzorci BM1, B14, BM2, BM4, B13 i B12 imaju vrlo sličnu raznolikost koja je vidljiva iz blizine njihovih krivulja u grafu. Slična situacija je i kod uzoraka BM5, B17 i B16. Nešto manju raznolikost imaju uzorci B15 i BM6 dok je najmanja raznolikost primijećena kod uzoraka B18, B19, BM7, B110 te B111 što je i za očekivati pošto su ovi uzorci uzorkovani pretposljednem i posljednjem dana procesa.

4.3. BETA RAZNOLIKOST

Beta raznolikost predstavlja raznolikost između više uzoraka u analizi čime se dobiva uvid u sličnosti prisutne crijevne mikrobiote. Rezultat određivanja beta raznolikosti je kvadratna matrica u kojoj je izračunata udaljenost koja predstavlja različitost između svakog uzorka. Za računanje udaljenosti između uzoraka se koriste netežinska i težinska UniFrac metrika. Netežinska UniFrac metrika je kvalitativna jer daje informaciju samo o prisutnosti, odnosno odsutnosti taksonomskih grupa u uzorcima, dok težinska UniFrac metrika obuhvaća prisutnost i zastupljenost samih taksonomskih grupa što ju čini kvantitativnom. Za vizualizaciju usporedbe sastava mikrobiote između svih uzoraka korištena je osnovna koordinatna analiza („Principal Coordinates Analysis“ - PCoA). PCoA metoda smješta uzorke u trodimenzionalni okvir na temelju udaljenosti određenoj UniFrac metrikom, što je vidljivo na slikama 19 i 20. Netežinski PCoA na slici 19 prikazuje prisutnost taksonomskih grupa u uzorcima svježeg fecesa i uzorcima izuzetima iz bioreaktora grupiranih po danim procesa, a težinski PCoA na slici 20 je korišten za prikaz rezultata beta raznolikosti koji omogućuje uočavanje sličnosti, odnosno različitosti uzoraka na osnovu prisutnosti i zastupljenosti različitih mikrobnih vrsta u uzorcima dvaju paralelnih uzgoja mikrobiote u bioreaktoru. Osim PCoA prikaza beta raznolikosti određenu netežinskom i težinskom UniFrac metrikom, provedena je i statistička analiza za koju su korištene ADONIS i ANOSIM metode kako bi se odredila statistička značajnost grupiranja.



Slika 19. PCoA prikaz beta raznolikosti netežinskom UniFrac metodom



Slika 20. PCoA prikaz beta raznolikosti težinskom UniFrac metodom

Na slici 20 se nalazi trodimenzionalni prikaz beta raznolikosti s naznačenim klasterima uzoraka grupiranima po danu. Svaki klaster odgovara određenom danu procesa, tako klaster u

narančastom obruču označava uzorke svježeg fecesa, a odmah do njih se nalaze i crvene kuglice grupiranih uzoraka izuzetih iz bioreaktora odmah nakon inokulacije fecesa u bioreaktor. Nadalje, u plavom obruču se nalaze klasteri uzoraka uzorkovanih prvog dana procesa prije i nakon dodavanja prve hranjive podloge u sustav, zeleni obruč označava klaster uzoraka uzorkovanih drugog dana procesa, a ljubičasti prikazuje uzorke uzorkovane trećeg dana procesa. Na temelju udaljenosti uzoraka u PCoA prikazu je vidljivo da je mikrobiota za svaki pojedini dan procesa u kojem je dodavana hranjiva podloga u sustav sličnog sastava u oba paralelna uzgoja te se razlikuje od mikrobiote u početnim uzorcima. U odnosu na netežinsku UniFrac metriku vidljivo je da beta raznolikost dobivena težinskom UniFrac metrikom bolje definira klaster po danu, neovisno o kojem uzgoju se radi. Nakon provjere rezultata statističkom analizom koristeći neparametrijske ADONIS i ANOSIM metode koje testiraju da li se definirani klasteri uzoraka značajno razlikuju, dobiveno je u obje metode da su klasteri definirani po danu uzgoja statistički značajni sa p vrijednošću 0,001. R^2 vrijednost koju daje ADONIS metoda označava postotak varijacije udaljenosti koju objašnjava testirano grupiranje. ADONIS metoda je testirala klasteriranje uzoraka na udaljenostima dobivenim netežinskom i težinskom UniFrac metrikom grupiranih na temelju dana uzgoja za za svaki pojedinačni uzgoj i za oba uzgoja zajedno. Grupiranja su značajna za sve testirane parametre sa p-vrijednošću 0,001, dok R^2 vrijednost varira ovisno o korištenoj UniFrac metrici i parametru. Korištenje težinske UniFrac metrike i odvojeno gledanje svakog uzgoja po danima, najbolje opisuje klasteriranje s R^2 vrijednošću 0,95397, dok je vrijednost za oba uzgoja zajedno 0,84482. Netežinska UniFrac metrika lošije opisuje grupiranje s R^2 vrijednostima 0,43819 i 0,73515. ANOSIM metoda također daje rezultat da su klasteriranja po danima uzgoja statistički značajna s p-vrijednošću od 0,001 i R vrijednostima blizu 1 označavajući značajnost grupiranja. Takva sličnost početnih uzoraka svježeg fecesa i uzoraka izuzetih iz bioreaktora odmah nakon inokulacije mikrobiote u sustav, isključuje utjecaj uporabe različitih kitova za izolaciju DNA na sam postupak određivanja bakterijske bioraznolikosti. Blizina klastera po danima procesa u oba paralelna uzgoja potvrđuje reproducibilnost *in vitro* procesa kultivacije mikrobiote uz određeni dio varijacije uzorka definiran razlikom u početnom inokulumu, što i dostupna istraživanja također potvrđuju (Cordonnier i sur., 2015; Aguirre i sur., 2014).

U konačnici, nakon uspješno provedenog uzgoja crijevne mikrobiote u *in vitro* sustavu, očigledno je da će se u budućim istraživanjima trebati optimizirati hranjiva podloga s obzirom na pojedina bakterijska koljena. Pritom se poglavito misli na *Bacteroidetes* čiji je gubitak na kraju procesa najvidljiviji te *Actinobacteria* koji naglo poraste tijekom *in vitro* procesa. Kako

bi se točnije mogao definirati sastav mikrobiote uzgojene u *in vitro* sustavu, potrebno je produžiti vrijeme uzgoja mikrobiote te bi se tek onda potencijalno mogao definirati sastav mikrobiote iz *in vitro* sustava koji bi se kasnije mogao koristiti kao standardni početni inokulum za sve buduće procese.

5. ZAKLJUČCI

- 1) Uzgoj crijevne mikrobiote u *in vitro* sustavu rezultira sastavom mikrobnih zajednica koje su reproducibilne.
- 2) Hranjiva podloga korištena za prihranu mikrobiote nije optimalna za sve prisutne mikroorganizme te ju je potrebno modificirati.
- 3) Sličnost mikrobiote u sustavu, definirana beta raznolikošću, pokazuje da je moguće razlučiti svaki pojedini dan uzgoja.
- 4) Uzgojem u bioreaktoru dolazi do gubitka bioraznolikosti mikroorganizama vidljivih iz analiza alfa raznolikosti.
- 5) U *in vitro* sustavu dolazi do značajnog gubitka koljena *Bacteroidetes* i do značajnog porasta zastupljenosti koljena *Actinobacteria*.

6. POPIS LITERATURE

- Aagaard, K., Ma, J., Anthony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J., Versalovic, J. (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* **6**, 237-265.
- Aguirre, M., Jonkers, D., Troost, F. J., Roeselers, G., Venema, K (2014) *In Vitro* characterization of the impact of different substrates on metabolite production, energy extraction and composition of gut microbiota from lean and obese subjects. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0113864
- Aguirre, M., Venema, K. (2017) Challenges in simulating the human gut for understanding the role of the microbiota in obesity. *Benef Microbes*. **8**, 31-53.
- Alander, M., De Smet, I., Verstraete, W., Wright, A., Mattila-Sandholm, T., (1999) The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *Int. J. Food Microbiol.* **46**, 71–79.
- Anonymous < <http://www.surgicalspecialistsja.com/images/colon2.jpg>>. Pristupljeno 25. Svibnja 2017.
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., Raoult, D. (2009) Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS One* **4**, e7125.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180.
- Borody, T.J., Paramsothy, S., Agrawal, G. (2013) Fecal microbiota transplantation: Indications, methods, evidence, and future directions. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **15**, 1-7.
- Boureau, H., Hartmann, L., Karjalainen, T., Rowland, I., Wilkinson, M. H. F. (2000) Models to study colonisation and colonisation resistance. *Microb. Ecol. Health D* **2**, 247–58.
- Brugère, J.F, Féria-Gervasio, D., Popse, Z., Tottey, W., Alric, M. (2011) The ECSIM concept (*Enviornmental Control System for Intestinal Microbiota*) and its derivative versions to help better understand human gut biology. *Appl. Biomed. Eng.* str.63-82.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello,

- E. .K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**, 335-336.
- Chen, J., He, X., Huang, J. (2014) Diet effects in gut microbiome and obesity. *J. Food Sci.* **79**, 1-10.
 - Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., Knight, R. (2012) The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* **148**, 1258–1270.
 - Conway, P.L. (1995) Microbial ecology of the human large intestine. U: Human Colonic Bacteria: Nutrition, Physiology, and Pathology, (Gibson, G. R., Macfarlane, G. T., ured.), Boca Raton: CRC, 1–24.
 - Cordain, L., Boyd Eaton, S., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O’Keefe. J.H., Brand-Miller, J. (2005) Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 341-354.
 - Cordonnier, C., Thévenot, J., Etienne-Mesmin, L., Denis, S., Alric, M., Livrelli, V., Blanquet-Diot, S. (2015) Dynamic *In Vitro* models of the human gastrointestinal tract as relevant tools to assess the survival of probiotic strains and their interactions with gut microbiota. *Microorganisms* **3**, 725-745.
 - D’Argenio, V., Salvatore, F. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta.* **451**, 97–102.
 - DeGruttola, A.K., Low, D., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E. (2016) Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm. Bowel Dis.* **22**, 1137-1150.
 - Derrien, M., Collado, M.C., Ben-Amor, K., Salminen, S., de Vos, W.M. (2008) The mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1646-1648.
 - Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M., Relman, D. A. (2006) Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol. Evol.* **21**: 517–523.
 - DSMZ (2017) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,

<https://www.dsmz.de>. Pristupljeno 04. srpnja 2017.

- Duncan, A.J. (1986) An *in vitro* study of the interactions of bacteria from the human colon, Ph.D thesis, CNAAC, United Kingdom.
- Durston, K. (2015) Ch. 24 – The digestive system – Slideplayer, < <http://slideplayer.com/slide/3862619/>>. Pristupljeno 25. Svibnja 2017.
- Egert, M., Graaf, A. A., Smidt, H., Vos, W. M., Venema, K. (2006) Beyond diversity: Functional microbiomics of the human colon. *Trends Microbiol.* **14**, 86–91.
- Fraher, M.H., O’Toole, P.W., Quigley, E.M.M. (2012) Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 312-322.
- Gérard, P. (2016) Gut microbiota and obesity. *Cell Mol. Life Sci.* **73**, 147–162.
- Gibson, G. R., Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. (1988) Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2750–2755.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **6**, 1401-1412.
- Grey, H., Lewis, W (1918) Anatomy of the human body, 20. izd., Lea & Fabiger, Philadelphia/New York, str.737 – 741.
- Grice, E.A., Segre, J.A. (2012) The human microbiome: Our second genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **13**, 151-170.
- Guyton, A.C, Hall, J.E. (2010) Medicinska fiziologija, 12. izd. (preveli Kukulja Taradi, S. i Andres, I.) Medicinska naklada, Zagreb.
- He, X., Marco, M.L., Slupsky, C.M. (2013) Perspectives of food and nutrition on gut microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 9559-9574.
- Hollister, E. B., Gao, C., Versalovic, J. (2014) Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology* **146**, 1449–1458.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy,

D. N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **21**, 8836–8847.

- Jimenez, E., Marin, M. L., Martin, R. (2008) Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* **159**, 187–193.
- Kim, D.Y., Camilleri, M. (2000) Serotonin: A mediator of the brain-gut connection. *Am. Coll. Of Gastroenterology* **95**, 2698-2709.
- Knights, D., Ward, T.L., McKinlay, C.E., Miller, H., Gonzalez, A., McDonald, D., Knight, R. (2014) Rethinking “Enterotypes”. *Cell Host Microbe* **16**, 433-437.
- Lan, Y., Kriete, A., Rosen, G. (2013) Selecting age-related functional characteristics in the human gut microbiome. *Microbiome.* **1**, 2-11.
- Lederberg, J., McCray, A. (2001) Ome sweet 'omics: --A genealogical treasury of words, *The Scientist.* **15**, 8.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022–1023.
- Li, S.S., Zhu, A., Benes, V., Costea, P.I., Hercog, R., Hildebrand, F., Huerta-Cepas, J., Nieuwdorp, M., Salojärvi, J., Voigt, A.Y., Zeller, G., Sunagawa, S., de Vos, W.M., Bork, P. (2016) Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science* **352**, 586-589.
- Lopez-Siles, M., Duncan, S.H., Garcia-Gil, L.J., Martinez-Medina, M. (2017) *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J.* **11**, 841-852.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R. (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220-230.
- Maathuis, A., Hoffman, A., Evans, A., Sanders, L., Venema, K. (2009) The effect of the undigested fraction of maize products on the activity and composition of the microbiota determined in a dynamic in vitro model of the human proximal large intestine. *J. Am. Coll. Nutr.* **28:6**, 657-666.
- Macfarlane, G. T., Macfarlane, S. (2007) Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 156–162.
- Macfarlane, G. T., Macfarlane, S., Gibson, G. R. (1998) Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on

the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microb. Ecol.* **35**, 180–187.

- Mäkivuokko, H., Nurmi, J., Nurminen, P., Stowell, J., Rautonen, N., (2005) *In vitro* effects on polydextrose by colonic bacteria and Caco-2 cell cyclooxygenase gene expression. *Nutr. Cancer.* **52**, 93–103.
- Manning, B.W., Federle, T.W., Cerniglia, C.E. (1987) Use of a semicontinuous culture system as a model for determining the role of human intestinal microflora in the metabolism of xenobiotics. *J. Microbiol. Meth.* **6**, 81-94.
- Miller, T.L., Wolin, M.J. (1981) Fermentation by the human large intestine microbial community in an *in vitro* semicontinuous culture system. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 400-407.
- Molly, K., Vande, W. M., Verstraete, W., (1993) Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 254–258.
- Ouwehand, A. C., Vaughan, E. E. (2006) *Gastrointestinal Microbiology*, Taylor & Francis Group, New York.
- Payne, A.N., Zihler, A., Chassard, C., Lacroix, C. (2012) Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends Biotechnol.* **30**, 17-25.
- Petrof, E. O., Gloor, G. B., Vanner, S. J., Weese, S. J., Carter, D. (2013) Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: “RePOOPulating” the gut. *Microbiome* **1**, 3-14.
- Rehman, A., Heinsen, F. A., Koenen, M. E., Venema, K., Knecht, H., Hellmig, S., Schreiber, Stefan, O., Stephan, J. (2012) Effects of probiotics and antibiotics on the intestinal homeostasis in a computer controlled model of the large intestine. *BMC Microbiol.* **12**, 47-57.
- Remely, M., Tesar, I., Hippe, B., Gnauer, S., Rust, P., Haslberger, A. G. (2015) Gut microbiota composition correlates with changes in body fat content due to weight loss. *Benef. Microbes* **6**, 431–439.
- Rose, D.J., Venema, K., Keshavarzian, A., Hamaker, B.R. (2010) Starch-entrapped microspheres show a beneficial fermentation profile and decrease in potentially

harmful bacteria during *in vitro* fermentation in faecal microbiota obtained from patients with inflammatory bowel disease. *Br. J. Nutr.* **103**, 1514-1524.

- Rumney, C., Rowland, I. (1992) *In vivo* and *in vitro* models of the human colonic flora. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **31**, 299-331.
- Sankar, S. A., Lagier, J. C., Pontarotti, P., Raoult, D., Fournier, P. E. (2015) The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**, 276–286.
- Schroeder, B.O., Bäckhed, F. (2016) Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* **22**, 1079-1089.
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS One* **14(8)**, e1002533.
- Simpson, H. L., Campbell, B.J. (2015) Review article: Dietary fibre-microbiota interactions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **42**, 158–179.
- Smits, L.P., Bouter, K.E.C., de Vos, W.M., Borody, T.J., Nieuwdorp, M. (2013) Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology* **145**, 946-953.
- Struna - Hrvatsko strukovno nazivlje (2011), < <http://struna.ihjj.hr/naziv/himus/25889/>>. Pristupljeno 24. Svibnja 2017.
- Šušković, J., (2016) Crijevna mikroflora, prehrana i zdravlje: Mikrobnja ekologija gastrointestinalnog trakta [interna skripta]. Zagreb: Prehrambeno - biotehnoški fakultet.
- Tobergte, D. R., Curtis, S. (2013) Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. *J. Chem. Inf. Model* **53**, 1689–1699.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., Gordon, J. I. (2009a) A core gut microbiome in obese and lean twins *Nature* **457**, 480–4.
- User and Maintenance manual for Jupiter 2.0.(2016), Solaris Biotechnology SRL, Porto Mantovano, Italija

- Van den Abbeele, P., Grootaert, C., Marzorati, M., Possemiers, S., Verstraete, W., Gerard, P., Rabot, S., Bruneau, A., El Aidy, S., Derrien, M., Zoetendal, E., Kleerebezum, M., Smidt, H., Van de Wiele, T. (2010) Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for *Bacteroidetes* and *Clostridium* Cluster IX. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5237-5246.
- van Nuenen, M., Meyer, P.D., Venema, K. (2003) The effect of various inulins and *Clostridium difficile* on the metabolic activity of the human colonic microbiota *in vitro*. *Microb. Ecol. Health Dis.* **15**, 137-144.
- Venema, K., Maathuis, A. J. H., Steijart, M. N., Graaf, A. A. (2012) Use of ¹³C-labelled carbohydrates to trace microbial metabolism in the colon; light in the tunnel! *FASEB J.* **26**, 638-639.
- Venema, K., Nuenen, M., Smeets-Peters, M., Minekus, M., Havenaar, R. (2000) TNO's *in vitro* large intestinal model: an excellent screening tool for functional food and pharmaceutical research. *Ernährung/Nutrition* **24**, 558–564.
- Voreades, N., Kozil, A., Weir, T. L. (2014) Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front. Microbiol.* **5**, 1-9.
- Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Parkhill, J., Flint, H. J. (2011) Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* **5**, 220-230.
- Wang, Y., McAllister, T.A., Baah, J., Wilde, R., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Shelford, J.A., Kamande, G.M., Cheng, K.J. (2003) Effects of Tween 80 on *In vitro* fermentation of silages and interactive effects of Tween 80, Monensin and exogenous fibrolytic enzymes on growth performance by feedlot cattle. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* **16(7)**, 968-978.
- Wen, L., Ley, R.E., Volchkov, P.Y, Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., Hu, C., Wong, F.S., Szot, G.L., Bluestone, J.A., Gordon, J.I., Chervonsky, A.V. (2008) Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* **455:1109**, 1109-1113.
- WHO (2017) World Health Organization, Fact Sheet, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Pristupljeno 08.06.2017.

- Williams, C.F., Walton, G.E., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, G.R. (2015) Comparative analysis of intestinal tract models. *Annu. Rev. Food. Sci. Technol.* **6**, 329-350.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**, 105–108.
- Xu, Z., Knight, R. (2014) Dietary effects on human gut microbiome diversity. *Br. J. Nutr.* **113**, 1–5.
- Yarza, P. i sur. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaees using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 635-645.

7. PRILOZI

Prilog 1. Tablica s odvagama ugljikohidrata SIEM-a za prihranu P1 (600 mL)

SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)	
	Prvi uzgoj	Drugi uzgoj
Pektin	2,8282	2,8237
Ksilan	2,8217	2,8241
Arabinogalaktan	2,8209	2,8248
Amilopektin	2,8225	2,8240
Kazein	14,1245	14,1201
Škrob	23,5273	23,5234
Tween 80	10,2000	10,2000
Baktopepton	14,1114	14,1177
Žučne soli	0,2444	0,2455

Prilog 2. Tablica s odvagama soli za SIEM za prihranu P1

SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)	
	Prvi uzgoj	Drugi uzgoj
$K_2PO_3 \times 3H_2O$	0,6297	0,6350
NaCl	1,4870	1,4876
$FeSO_3 \times 7H_2O$	0,0018	0,0019
$MgO_3 \times 7H_2O$	0,1646	0,1685
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,1124	0,1132
Žučne soli	0,0166	0,0170
Cisetin hidroklorid	0,1024	0,1028

Prilog 3. Tablica s odvagama ugljikohidrata SIEM-a za prihranu P2 (1200 mL)

SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)	
	Prvi uzgoj	Drugi uzgoj
Pektin	5,6474	5,6458
Ksilan	5,6487	5,6475
Arabinogalaktan	5,6491	5,6436
Amilopektin	5,6470	5,6430
Kazein	28,2509	28,2222
Škrob	47,0639	47,0448
Tween 80	20,4000	20,4000
Baktopepton	28,2627	28,2374
Žučne soli	0,4845	0,4838

Prilog 4. Tablica s odvagama soli za SIEM za prihranu P2

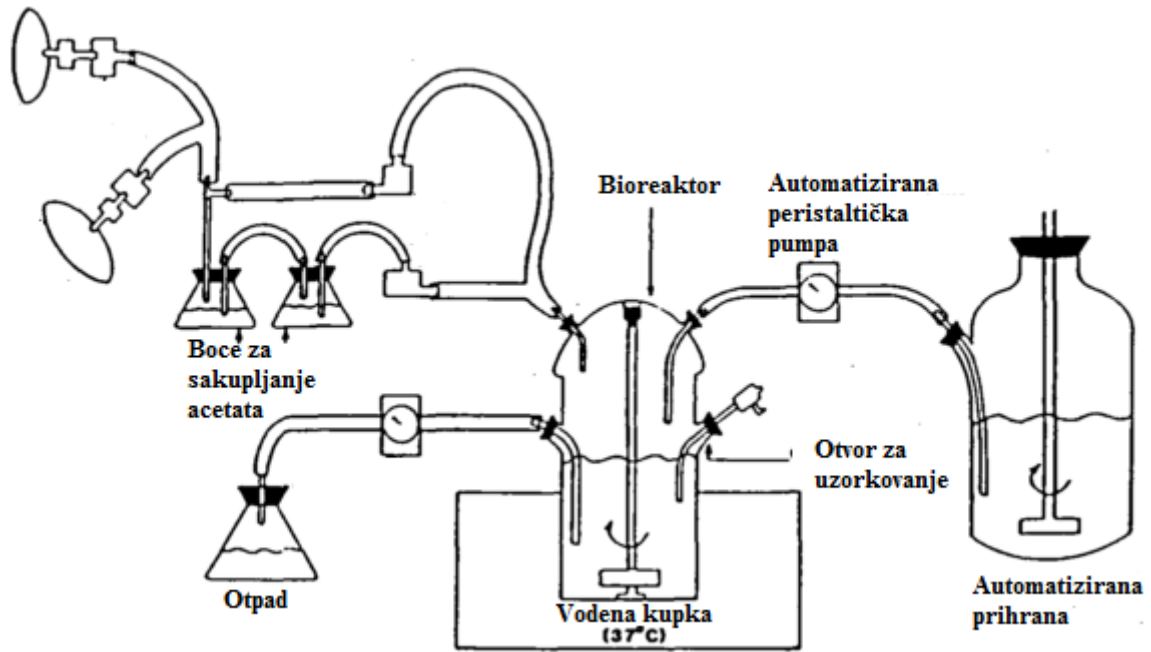
SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)	
	Prvi uzgoj	Drugi uzgoj
$K_2PO_3 \times 3H_2O$	1,1458	1,1479
NaCl	2,7025	2,7134
$FeSO_3 \times 7H_2O$	0,0035	0,0033
$MgO_3 \times 7H_2O$	0,3017	0,3018
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,2036	0,2054
Žučne soli	0,0303	0,0338
Cisetin hidroklorid	0,1856	0,1860

Prilog 5. Tablica s odvagama soli za otopinu dijalizata (500 mL)

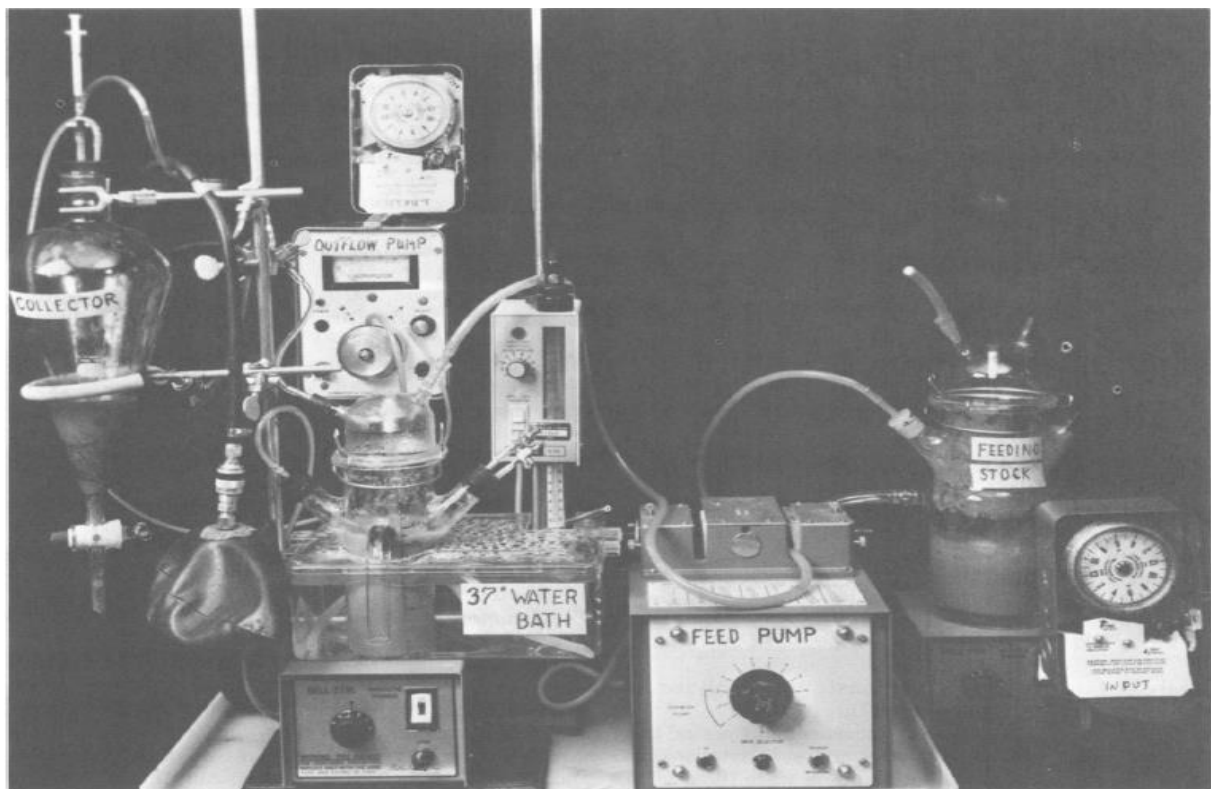
SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)	
	Prvi uzgoj	Drugi uzgoj
$K_2PO_3 \times 3H_2O$	0,9548	0,9486
NaCl	2,2530	2,2650
$FeSO_3 \times 7H_2O$	0,0026	0,0030
$MgO_3 \times 7H_2O$	0,2514	0,2536
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,1698	0,1703
Žučne soli	0,0254	0,0259
Cisetin hidroklorid	0,1540	0,1542

Prilog 6. Tablica s odvagama sastavnica vitaminske otopine (10 mL)

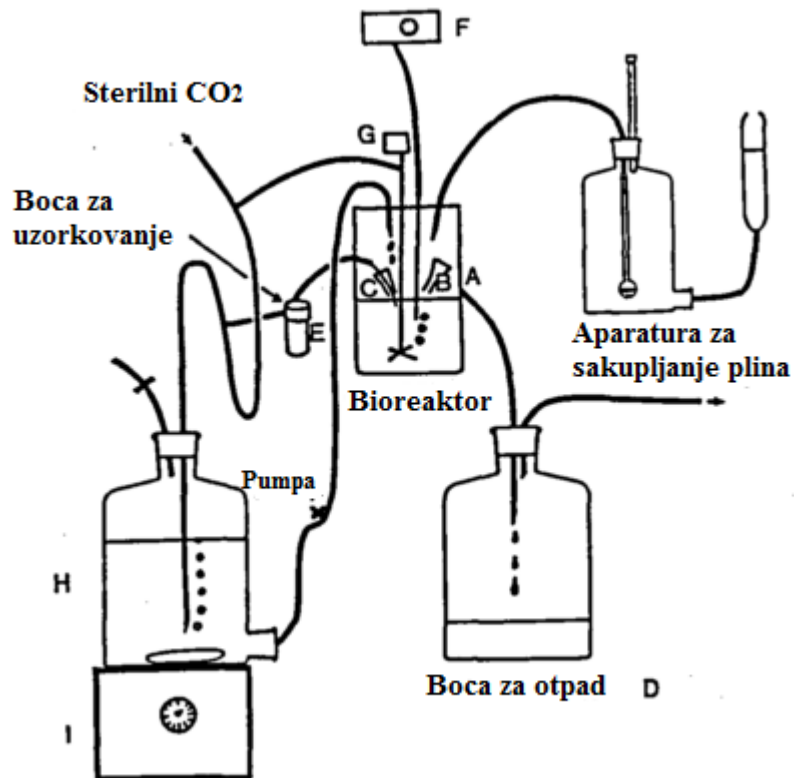
SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)	
	Prvi uzgoj	Drugi uzgoj
Menadion	0,0113	0,0108
D-biotin	0,0208	0,0227
Vitamin B ₁₂	0,0054	0,0011
Pantotenat	0,1007	0,1131
Nikotinamid	0,0506	0,0535
p-aminobenzen	0,0508	0,0516
Tiamin	0,0408	0,0420



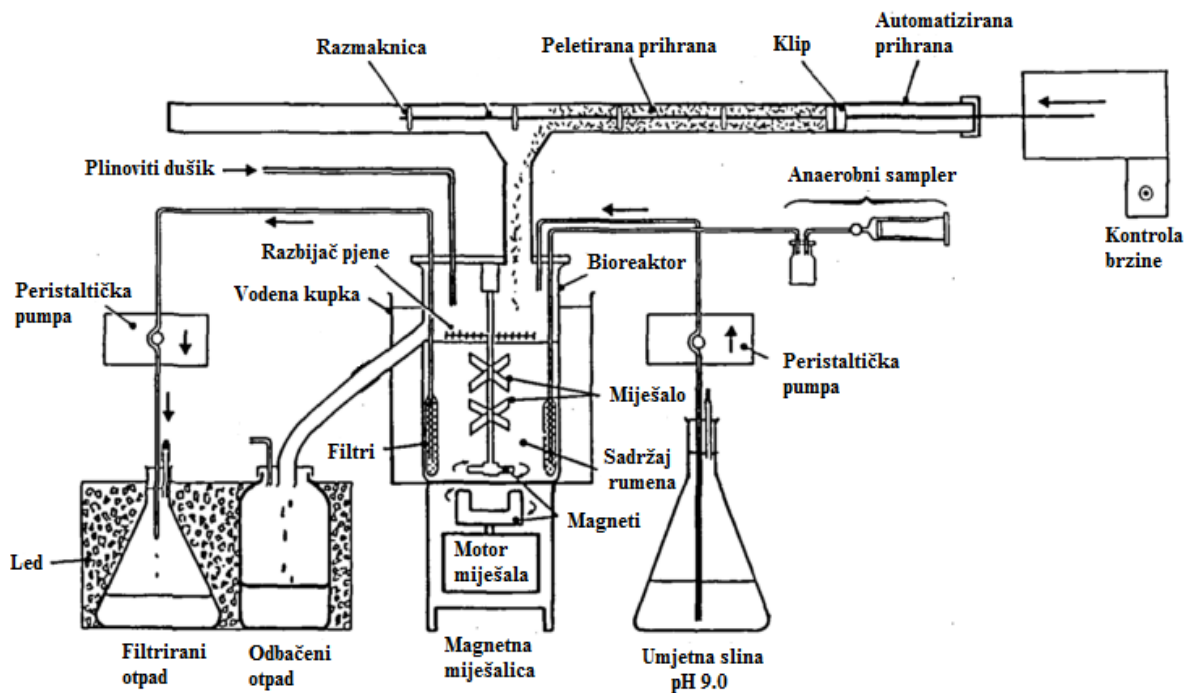
Prilog 7. Skica polukontinuiranog *in vitro* sustava koji su konstruirali Miller i Wolin, 1981. godine (Prilagođeno prema Rumney i Rowland, 1992)



Prilog 8. Originalan prikaz *in vitro* sustava Miller i Wolin iz 1981. godine (Miller i Wolin, 1981.)



Prilog 9. Skica *in vitro* sustava koji je koristio Duncan 1986. godine (Prilagođeno prema Rumney i Rowland, 1992)



Prilog 10. Skica *in vitro* sustava koji su koristili Merry i sur., 1987. godine (Prilagođeno prema Rumney i Rowland, 1992).

Prilog 13. Tablica s postotkom detektiranih bakterija na razini porodice (obitelji)

Legend	Taxonomy	Total	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B110	B111	EM1	EM2	EM3	EM4	EM5	EM6	EM7	F10	GM2				
D_0_Archaea	D_1_Euryarchaeota	D_2_Methanobacteria	D_3_Methanobacteriales	D_4_Methanobacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%				
D_0_Bacteria	D_1_Actinobacteria	D_2_Actinobacteria	D_3_Actinomycetales	D_4_Actinomycetaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%				
D_0_Bacteria	D_1_Actinobacteria	D_2_Actinobacteria	D_3_Bifidobacteriales	D_4_Bifidobacteriaceae	19.5%	0.2%	0.2%	1.7%	1.5%	21.8%	22.4%	16.3%	64.1%	44.2%	33.1%	29.5%	0.1%	0.1%	20.5%	29.7%	50.3%	53.2%	0.2%	0.1%		
D_0_Bacteria	D_1_Actinobacteria	D_2_Actinobacteria	D_3_Corynebacteriales	D_4_Corynebacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%			
D_0_Bacteria	D_1_Actinobacteria	D_2_Actinobacteria	D_3_Propionibacteriales	D_4_Propionibacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%			
D_0_Bacteria	D_1_Actinobacteria	D_2_Actinobacteria	D_3_Streptosporangiales	D_4_Thermomonosporaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%			
D_0_Bacteria	D_1_Actinobacteria	D_2_Coribacteriales	D_3_Coribacteriales	D_4_Coribacteriaceae	0.0%	0.1%	0.0%	1.0%	1.4%	0.9%	2.5%	2.3%	0.4%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	3.0%	2.3%	1.2%	0.9%	0.3%	0.1%	0.1%		
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Bacteroidetes	D_3_Bacteroidetes	D_4_uncultured bacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Bacteroidetes	D_3_Bacteroidetes	D_4_Bacteroidetes	10.2%	31.7%	16.5%	13.1%	7.5%	1.0%	1.5%	1.4%	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%	24.7%	27.1%	17.9%	5.0%	7.2%	1.4%	0.5%	11.3%	31.0%	
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Bacteroidetes	D_3_Bacteroidetes	D_4_Bacteroidetes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Bacteroidetes	D_3_Bacteroidetes	D_4_Bacteroidetes	2.6%	6.6%	7.4%	7.5%	7.0%	2.0%	2.8%	2.9%	0.4%	0.2%	0.2%	0.1%	9.2%	0.3%	0.3%	0.7%	0.5%	0.2%	0.1%	1.5%	2.6%	
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Bacteroidetes	D_3_Bacteroidetes	D_4_CR-115	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Bacteroidetes	D_3_Bacteroidetes	D_4_Porphyrimonadaceae	2.1%	3.2%	1.4%	1.1%	0.9%	0.3%	0.4%	0.3%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	10.7%	4.8%	4.4%	2.5%	1.2%	0.1%	0.1%	5.2%	6.1%	
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Bacteroidetes	D_3_Bacteroidetes	D_4_Prevotellaceae	0.5%	2.8%	0.5%	1.7%	2.5%	1.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	0.6%	
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Bacteroidetes	D_3_Bacteroidetes	D_4_Rikenellaceae	2.6%	2.6%	0.7%	0.6%	0.6%	0.2%	0.3%	0.4%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	13.7%	3.4%	4.1%	2.3%	1.2%	0.2%	0.1%	13.3%	8.1%	
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Bacteroidetes	D_3_Bacteroidetes	D_4_ratNAM63031C	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Bacteroidetes	D_3_Bacteroidetes	Other	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.3%		
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Flavobacteriales	D_3_Flavobacteriales	D_4_Cryomorphaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Flavobacteriales	D_3_Flavobacteriales	D_4_Flavobacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Sphingobacteriales	D_3_Sphingobacteriales	D_4_Chitinophagaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Bacteroidetes	D_2_Other	Other	Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Cyanobacteria	D_2_Chloroplast	D_3>Allium cepa (onion)	D_4 Allium cepa (onion)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Cyanobacteria	D_2_Cyanobacteria	D_3_Cyanobacteria	D_4_Cyanobacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Cyanobacteria	D_2_Melainobacteriales	D_3_Gastranaerophilales	D_4_uncultured bacterium	0.1%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Cyanobacteria	D_2_Melainobacteriales	D_3_Gastranaerophilales	D_4_uncultured organism	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%		
D_0_Bacteria	D_1_Cyanobacteria	D_2_Melainobacteriales	D_3_Gastranaerophilales	Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Bacillales	D_4 Family XI	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Bacillales	D_4>Listeriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Bacillales	D_4_Planococcaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Bacillales	D_4_Staphylococcaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Bacillales	Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Lactobacillales	D_4_Aerococcaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Lactobacillales	D_4_Carrobacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Lactobacillales	D_4_Enterococcaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.6%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Lactobacillales	D_4_Lactobacillaceae	6.4%	2.7%	11.7%	9.8%	6.5%	4.0%	5.6%	5.6%	12.4%	6.9%	7.1%	15.4%	0.0%	0.0%	0.0%	5.3%	11.1%	14.5%	6.7%	0.1%	0.0%	
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Lactobacillales	D_4_Rs-D42	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Lactobacillales	D_4_Streptococcaceae	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Lactobacillales	Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4_Christensenellaceae	1.7%	6.8%	0.4%	0.4%	0.3%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	10.3%	2.1%	2.2%	2.0%	3.0%	0.1%	4.6%	1.7%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4_Clostridiales	3.7%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	1.0%	12.4%	15.9%	15.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	3.9%	19.0%	0.2%	0.1%
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4_Clostridiales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4_Defluviellaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4_Eubacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4 Family XI	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4 Family XIII	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%		
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4_Lachnospiraceae	17.8%	5.1%	22.8%	23.5%	25.5%	55.3%	42.5%	39.0%	7.9%	6.0%	7.0%	5.2%	4.3%	28.3%	24.3%	15.4%	5.4%	2.0%	0.0%	14.8%	10.6%	
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4_Peptococcaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4_Peptostreptococcaceae	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	
D_0_Bacteria	D_1_Firmicutes	D_2_Bacilli	D_3_Clostridiales	D_4_Ruminococcaceae	7.6%	22.3%	5.0%	0.0%	0.0%	7.1%	1.5%	2.1%														

