

# Utjecaj prebiotika Nutriose® FB06 na sastav crijevne mikrobiote u uvjetima in vitro

---

Čadež, Tena

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:159:448423>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-13**



*Repository / Repozitorij:*

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, Rujan 2017.

Tena Čadež

718/N

**Utjecaj prebiotika Nutriose®FB06 na  
sastav crijevne mikrobiote u  
uvjetima *in vitro***

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.

*Veliku zahvalu dugujem svom mentoru, doc. dr. sc. Jurici Žučku na neiscrpnom izvoru savjeta i pomoći te konstantom strpljenju i vodstvu pri pisanju ovog rada.*

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

*Zahvaljujem se i kolegicama Maji i Steli na veseloj atmosferi i timskom duhu tijekom dugih sati u laboratoriju, a posebno hvala Marini na prisustvu i konstantoj pomoći do samoga kraja.*

*Hvala mojim prijateljima na strpljenju, razumijevanju i podršci tokom studiranja, te stalnom poticaju u trenucima krize i konstantom veselju koje su mi donjeli..*

*I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima i bratu, koji su uvijek bili uz mene i bez kojih sve ovo što sam do sada postigla ne bi bilo moguće.*

## 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

### UTJECAJ PREBIOTIKA NUTRIOSE®FB06 NA SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE U UVJETIMA IN VITRO

*Tena Čadež, 718/N*

**Sažetak:** Mikrobiota kao zajednica mikroorganizama koji obitavaju na i u ljudskom tijelu je postala područje istraživanja zbog svog značajnog utjecaja na zdravlje i dobrobit ljudi. Razvojem naprednih tehnika sekvencioniranja omogućeno je određivanje sastava crijevne mikrobiote te razvojem *in vitro* sustava praćenje njenih promjena pod utjecajem određenim čimbenika. U ovom radu se istraživao učinak prebiotika Nutriose®FB06 na sastav crijevne mikrobiote čovjeka. Iz tog razloga, korišten je *in vitro* sustav za simulaciju ljudskog debelog crijeva, a promjene mikrobiote su istraživane sekvencioniranjem 16S rRNA gena. Dobiveni rezultati ukazuju da dodavanje prebiotika potiče održavanje bioraznolikost crijevne mikrobiote u bioreaktoru. Također je uočeno da povećane koncentracije prebioika utječu na veću zastupljenost bakterijskiog roda *Bifidobacterium* te je u budućim istraživanjima potrebno ustanoviti optimalnu koncentraciju prebiotika koja potiče održavanje većeg broja poželjnih bakterijskih rodova.

**Glavne riječi:** crijevna mikrobiota, *in vitro* sustav, prebiotik, 16S rRNA gen.

**Rad sadrži:** 55 stranica, 25 slika, 6 tablica, 63 literaturnih navoda, 2 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. Andreja Leboš Pavunc
2. Doc.dr.sc. Jurica Žučko
3. Doc.dr.sc. Anamarija Štafa
4. Doc.dr.sc. Janko Diminić

**Datum obrane:** 22.09.2017





## 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

### INFLUENCE OF PREBIOTIC NUTRIOSE®FB06 ON THE COMPOSITION OF GUT MICROBIOTA IN A *IN VITRO* SYSTEM

*Tena Čadež 718/N*

**Abstract:** Microbiota, as a community of microorganisms living on and within the human body, has become an area of research because of its significant impact on the health and well-being of humans. With development of advanced sequencing techniques, it was possible to determine the composition of the gut microbiota and by developing *in vitro* systems it was possible to track its changes induced by certain factors. The aim of this thesis was to determine the effect of Nutriose® FB06 prebiotics on the intestinal microbiotic composition in humans. For this reason, an *in vitro* human colon simulation system was used, and changes in microbiota were investigated by sequencing the 16S rRNA gene. The obtained results indicate that adding prebiotics encourages the maintenance of intestinal microbial biodiversity in the bioreactor. It has also been found that increased prebiotic concentrations have a greater influence on bacterial genus *Bifidobacterium*, and in future studies it is necessary to establish optimal concentration of prebiotics that will stimulate the growth of a higher number of desirable bacterial genera.

**Keywords:** gut microbiota, *in vitro* systems, prebiotics, 16S rRNA gene.

**Thesis contains:** 55 pages, 25 figures, 6 tables, 63 references, 2 supplements

**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, Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
2. PhD, Jurica Žučko, Assistant professor
3. PhD, Anamarija Štafa, Assistant professor
4. PhD, Janko Diminić, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 22.09.2017

# Sadržaj:

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	3
<b>2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA ČOVJEKA</b>	3
2.1.1. Metode određivanja bioraznolikosti crijevne mikrobiote	5
2.1.2. Razvoj crijevne mikrobiote	7
2.1.3. Mikrobiota i zdravlje	9
<b>2.2. FAKTORI KOJI UTJEČU NA CRIJEVNU MIKROBIOTU</b>	10
2.2.1. Prehrana	11
2.2.2. Lijekovi	11
2.2.3. Probiotici	12
2.2.4. Prebiotici	13
<b>2.3. MIKROBIOTA, PREBIOTICI I PRETILOST</b>	16
<b>2.5. IN VITRO SUSTAVI ZA ODRŽAVANJE MIKROBIOTE DEBELOG CRIJEVA</b>	19
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	21
<b>3.1. MATERIJALI</b>	21
3.1.1. Hranjiva podloga za anaerobni uzgoj u bioreaktoru	21
3.1.2. Prebiotik	22
3.1.3. Mikrobna kultura za inokulaciju	23
3.1.4. Laboratorijska oprema za simulaciju uvjeta debelog crijeva	23
3.1.4.1. Pribor	23
3.1.4.2. Bioreaktor s miješalom	23
3.1.4.3. Uređaj za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje DNA	24
3.1.4.4. Ostali laboratorijski uređaji	24
3.1.4.5. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga	24
3.1.4.6. Ostale korištene kemikalije	25
3.1.4.7. Plin pod tlakom	25
3.1.4.8. Računalni programi za analizu dobivenih podataka	25
<b>3.2. METODE</b>	26
3.2.1. Priprema hranjivih podloga	26
3.2.2. Sterilizacija hranjive podloge, pribora i aparature	27
3.2.3. Faza prilagodbe mikrobiote u laboratorijskom bioreaktoru	28
3.2.4. Vođenje anaerobnog mikrobnog procesa u bioreaktoru	28
3.2.5. Određivanje sastava crijevne mikrobiote	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	33
4.1. TAKSONOMSKA RAZNOLIKOST MIKROBIOTE	33
4.2. ALFA RAZNOLIKOST	43
4.3. BETA RAZNOLIKOST	46
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	49
<b>6. LITERATURA</b>	50
<b>7. PRILOZI</b>	57

## **1. UVOD**

Današnjom boljom spoznajom crijevne mikrobiote imamo mogućnost bolje proučiti njezin utjecaj na organizam čovjeka. 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 (Clemente i sur., 2012). Složen i dinamičan ekosustav kao što je crijevna mikrobiota čovjeka sadrži oko  $3,8 \cdot 10^{13}$  stanica bakterija i arhea od kojih je prisutno 400 - 1000 bakterijskih vrsta (Sender i sur., 2016). Iako više od 90% crijevnih bakterija pripada koljenima *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, specifični sastav crijevne mikrobiote, na razini koljena, roda i vrste, vrlo je individualan i na njega utječu razni čimbenici kao što su pretilost, lijekovi te pojava prehrana. Sukladno tome, potrebno je bolje shvatiti utjecaj prehrane s hranjivim tvarima kao što su prebiotici na oblikovanje sastava i samo djelovanje crijevne mikrobiote. Prebiotici pridonose sastavu crijevne mikrobiote na način da potiču povećanje korisnih bakterija i / ili smanjenje štetnih vrsta, smanjenje pH crijeva, proizvodnju SCFA i promjene koncentracija bakterijskih enzima (Woods i Gorbach, 2001). Dosad je većina pozornosti bila usredotočena na prebiotički potencijal topljivih vlakana, naročito neprobavljivih oligosaharida kao što su inulin i galaktooligosaharidi. Ostala topljiva vlakna, uključujući rezistentne dekstrine (pšenica ili škrob), sve se više istražuju kako bi se ispitalo njihov prebiotički potencijal.

Razvojem *in vitro* modela koji omogućuju brze, jednostavne i jeftine načine proučavanja crijevnog mikrobioma u jednom ili više odjeljaka crijeva omogućeno je provođenje istraživanja na crijevnoj mikrobioti u sličnim uvjetima kao u crijevima ljudi. Poboljšavanjem bioinformatičkih metoda i razvojem naprednih tehnika sekvencioniranja omogućena je identifikacija mikroorganizama koji se ne mogu uzgojiti u laboratorijskim uvjetima te je trenutno moguće odrediti približan stvaran sastav crijevne mikrobiote te proučavati njegove promjene izazvane poželjnim i nepoželjnim čimbenicima. Najnovije sekvencijske analize metagenoma (MetaHIT i Human Microbiome Project) su 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.

Svrha ovog rada je bila ispitati utjecaj prebiotika Nutrise® FB06 na sastav prethodno stabilizirane mikrobiote inokulirane u *in vitro* sustav, pratiti odgovor mikrobiote na različite koncentracije prebiotika u *in vitro* sustavu te provjeriti reproducibilnost samog sustava.

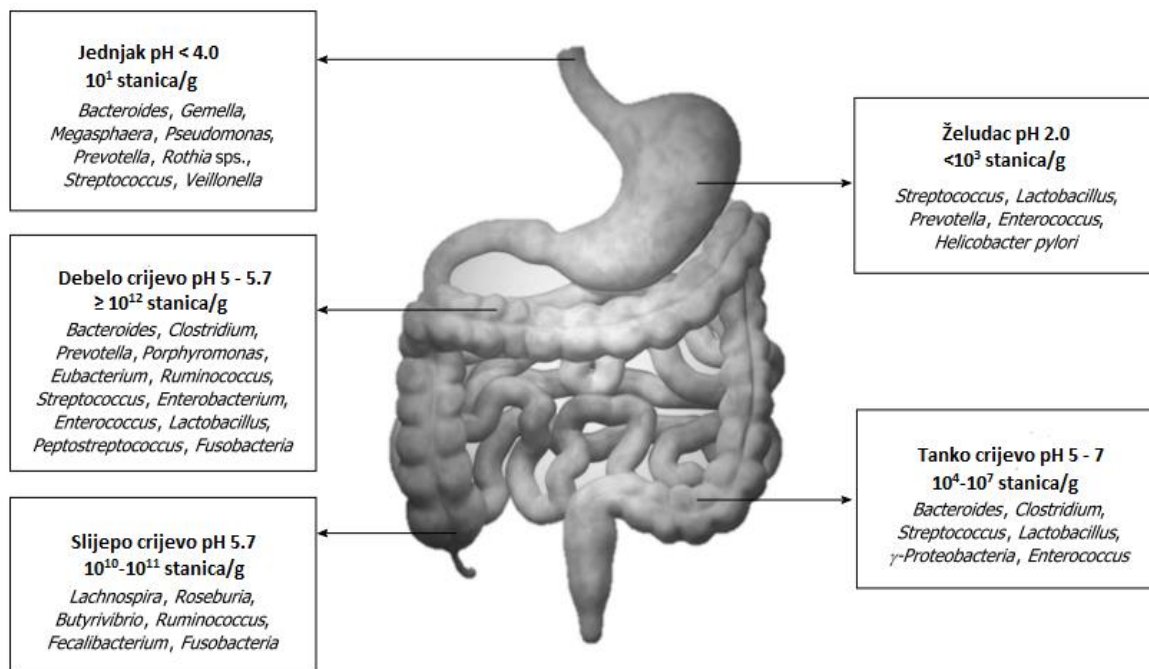
Određivanje sastava crijevne mikrobiote je postignuto sekvencioniranjem V3-V4 regija 16S rRNA gena korištenjem Illumina MiSeq platforme te su korištenjem QIIME programa identificirani prisutni mikroorganizmi u uzorcima koji su izuzeti iz *in vitro* sustava.

### **3. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA ČOVJEKA

Mikrobiota, definirana kao zajednica mikroorganizama koji obitavaju na i u ljudskom tijelu, ima značajni utjecaj na zdravlje i dobrobit ljudi. Kompleksna mikrobna populacija koja nastanjuje donji dio ljudskog probavnog trakta naziva se crijevna mikrobiota, a čine ju bakterije, virusi, arhea i jednostanični eukarioti, dok skup njihove genetske informacije čini intestinalni mikrobiom. (D'Argenio, 2015). Tipična crijevna mikrobiota odrasle osobe prvenstveno se sastoji od oko šest ili sedam različitih bakterijskih koljena od kojih prisutne u manjem obilju, su bakterije iz koljena *Proteobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Actinobacteria* i *Euryarchaeota*. Dominantna bakterijska koljena *Bacteriodetes* i *Firmicutes* čine >90% bakterijske populacije debelog crijeva (Dethlefsen i sur., 2006).

Iako je ovaj opći profil bakterija postojan, crijevna mikrobiota pokazuje vremenske i prostorne razlike u distribuciji mikroorganizama na razini roda i vrste. Sastav mikrobiote se razlikuje uzduž cijelog probavnog trakta prema koncentraciji bakterijskih stanica, od  $10^1$  stanica po gramu lumenalnog sadržaja jednjaka do  $10^{12}$  po gramu sadržaja debelog crijeva što je vidljivo na slici 1 (Jandhyala i sur., 2015).



**Slika 1.** Raspodjela mikrobiote u probavnom sustavu (prilagođeno iz Ouwehand i Vaughan, 2006; Payne i sur., 2012).

Procjenjuje se da je broj različitih vrsta bakterija prisutnih u probavnom traktu u rasponu od 300 do 1.000, pri čemu je većina tih bakterijskih vrsta, kao što je već navedeno, raspodijeljena između koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Anaerobnih bakterija ima 100 – 1000 puta više od aerobnih. Uz komenzalne bakterije, u debelom crijevu se nalazi i manje od 0,1% patogenih bakterija od ukupne prisutne mikrobiote (Dethlefsen i sur., 2006). Novija istraživanja pokazuju da postoje interindividualne varijacije u sastavu mikrobiote koje s obzirom na prisutne vrste i njihovu zastupljenost prate određene obrasce prepoznatljive unutar ljudskih populacija. Takve varijacije su primijećene unutar populacija na temelju geografske različitosti, tjelesne konstitucije, zdravlja te mnogih drugih faktora (Gérard 2016; Dethlefsen i sur., 2006; Jandhyala i sur., 2015).

Kompleksna i uravnotežena mikrobiota je prepoznata kao važan faktor koji doprinosi fiziološkoj funkciji crijeva, prehrani domaćina i otpornosti na patogene. Pokazalo se da mikroorganizmi prisutni u crijevima ljudi reguliraju proliferaciju crijevnih epitelnih stanica i održavanju strukture mukoznog sloja crijeva. Crijevna mikrobiota ima i specifičnu ulogu u metabolizmu hranjivih tvari, ksenibiotika i metabolizmu lijekova kod čovjeka. Intestinalne bakterijske zajednice su uključene u imunološke odgovore na bolesti koje variraju od alergija do kasnog početka autizma, upalne bolesti crijeva i raka (Dethlefsen i sur., 2006).

Iz svega ovoga proizlazi da naše razumijevanje crijevne mikrobiološke ekologije izravno utječe na našu sposobnost upravljanja i održavanja ljudskog zdravlja.



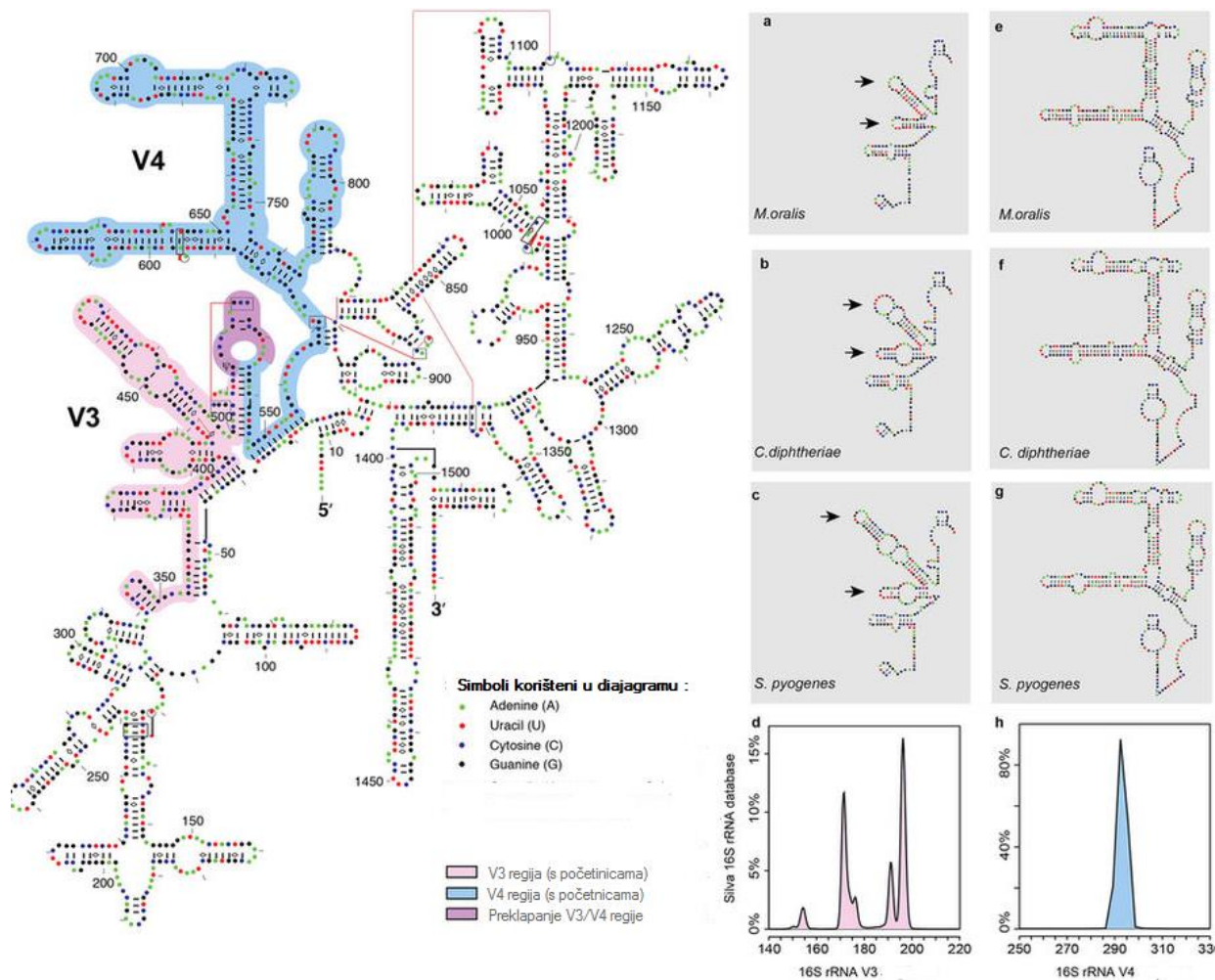
### 2.1.1. Metode određivanja bioraznolikosti crijevne mikrobiote

Pretpostavlja se da je crijevna mikrobiota ekološki čimbenik koji igra ulogu u patogenezi pretilosti i povezanih bolesti (Gérard, 2016). Ova je hipoteza nastala s dolaskom novih tehnologija koje su omogućile stvaranje važnih novih podataka vezanih uz sastav i karakteristike mikrobiote crijeva. Bakterijski rodovi za čiju identifikaciju još nisu razvijene laboratorijske metode uzgoja, a predstavljaju trećinu ukupne bioraznolikosti Zemlje, čine najveću prepreku u procesu otkrivanja i identifikacije novih bakterijskih vrsta i ustaljenih obrazaca bakterijske raznolikosti (Horner-Devine, 2003).

Nedavna primjena molekularnih tehnika za određivanje crijevnih bakterijskih vrsta omogućila je dublje proučavanje mikrobioloških vrsta prisutnih u crijevima i procjenjivanje njihovog odnosa s ljudskim zdravljem i bolestima. Trenutno postoje brojne metode za analizu bakterijske raznolikosti pri čemu dominiraju metode bazirane na DNA sekvencioniranju.

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 (qPCR). Za proučavanje bakterijske biološke raznolikosti najčešće upotrebljavane probe su one komplementarne 16S rRNA i 23S rRNA ribosomalnoj sekvenci (Rastogi i Sani, 2011).

Gen koji kodira za 16S rRNA koristi se kao biokemijski marker za identifikaciju i taksonomsku klasifikaciju bakterija od razine koljena do razine roda. Najčešće se koristi kod identifikacije bakterija koje se ne mogu klasificirati prema biokemijskom profilu te kod sojeva koji se ne mogu kultivirati uobičajenim komercijalnim metodama. Sekvenca 16S rRNA duga je otprilike 1,5 kb, a čine ju varijabilne i konzervirane regije. U identifikaciji pojedinih bakterija značajnu ulogu imaju varijabilne regije 16S rRNA gena zbog svoje specifične strukture za svaku bakterijsku skupinu (Slika 2) (Jandhyala i sur.,2015). Iako je 16S rRNA koristan kao biokemijski marker za identifikaciju bakterija njegova ograničenja vidljiva su kod identifikacije bliskih vrsta s velikom sekvencijskom sličnošću jer je broj polimorfničkih mjesta u 16S rRNA izrazito malen što otežava razlikovanje vrlo srodnih vrsta.



**Slika 2.** Pojednostavljeni prikaz sekundarne strukture 16S rRNA gena u *Escherichia coli* uz prikaz razlike u V3 i V4 regijama između bakterijskih vrsta i arhea (Ziesemer i sur., 2015).

Istraživanja su pokazala da se najpouzdaniji rezultati identifikacije i klasifikacije bakterija dobivaju kombiniranjem dvaju ili više različitih markera jer svaki od njih ima određene prednosti i mane. Usprkos tome trenutno je u praksi zastupljenije korištenje samo jednog markera, npr. 16S rRNA gena (Roux i sur., 2011).

U ovom istraživanju za taksonomsku klasifikaciju crijevne mikrobiote korišten biokemijski marker 16S rRNA točnije varijabilne regije V3 i V4 16S rRNA gena.

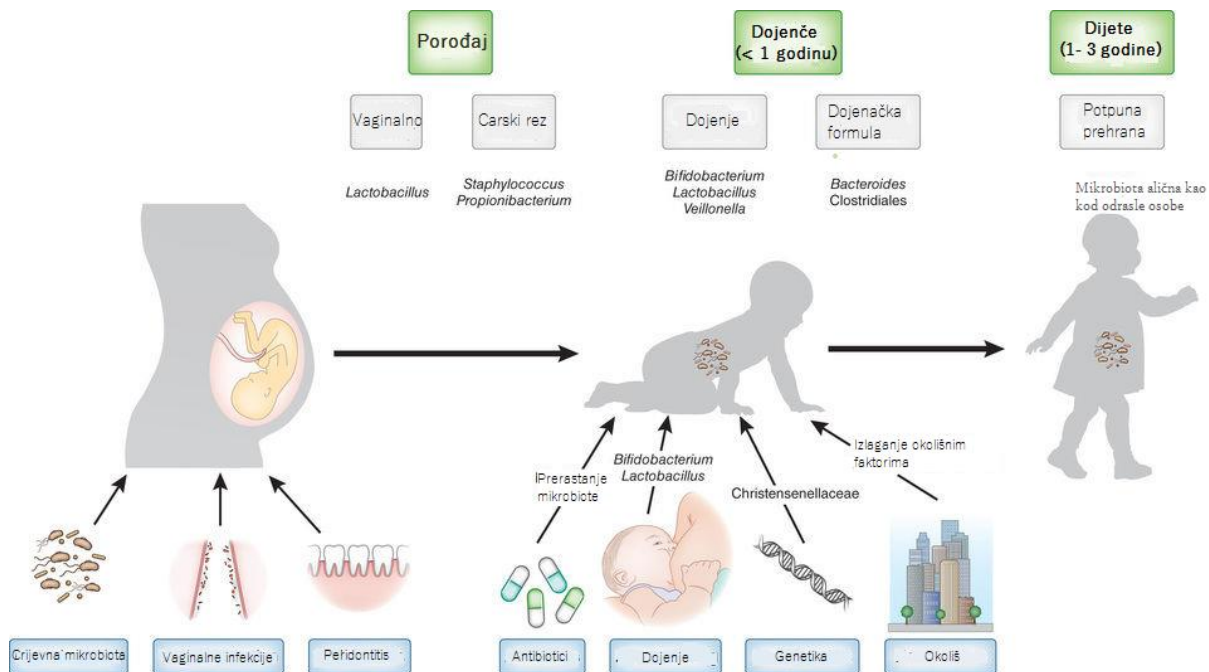
### 2.1.2. Razvoj crijevne mikrobiote

Crijevna mikrobiota se razvija kroz cijeli životni tijek čovjeka te je podložna utjecajima brojnih faktora. Nekoliko čimbenika igra ulogu u razvoju crijevne mikrobiote. Oni uključuju (i) način poroda (vaginalni ili carski); (ii) prehranu tijekom djetinjstva (majčino mlijeko ili dojenačka formula) i prehranu u odrasloj dobi i (iii). uporabu antibiotika i drugih lijekova (Slika 3) (Janadhya i sur., 2015).

Razvoj mikrobiote započinje prije rođenja što je dokazano analizom mekonija novorođenčadi gdje je sekvencioniranjem 16S rRNA gena pronađena oskudna zajednica mikroorganizama kojom dominiraju rodovi poput *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Streptococcus* (Jimenez i sur., 2008). Tijekom i neposredno nakon poroda dolazi do daljnje kolonizacije crijevne mikrobiote gdje vaginalni porod dovodi do razvoja mikrobiote sličnije vaginalnoj mikrobioti majke, dok djeca rođena na carski rez imaju mikrobiotu sličniju mikrobioti kože majke (Hollister i sur., 2014). Prva hrana ima značajnu ulogu za razvoj crijevne mikrobiote pa tako majčino mlijeko bogato oligosaharidima, antitijelima i komezalnim bakterijama dovodi do dominacije bakterijskog roda *Bifidobacterium*. Dojenačke formule danas obogaćene prebioticima kao što su galaktooligosaharidi i fruktooligosaharidi mogu potaknuti povećanu kolonizaciju *Bifidobacterium* roda, no tradicionalne dojenačke formule dovode do povećanja bakterijskog roda *Atopobium* (Xu i Knight, 2014; Marques i sur., 2010). Pretpostavlja se da je rana kolonizacija i uspostava sastava intestinalne mikrobiote usko povezana sa pojavom preosjetljivosti na hranu, alergija na hranu, dijabetesom tip II i autoimunim poremećajima (Hollister i sur., 2014).

Prisutnost kisika u crijevima novorođenčadi potiče rast bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* te rodova *Streptococcus* i *Staphylococcus* zbog njihovih aerotolerantnih osobina. Nakon nekog vremena dolazi do njihovog prerastanja anaerobnim bakterijama iz rodova *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Clostridium* zbog smanjenja redukcijskog potencijala u crijevima izazvanog prisutnošću fakultativno anaerobnih bakterija (Conway P.L., 1995).

Crijevna mikrobiota u djeteta tek je u početnom stadiju razvoja te počinje sličiti mikrobioti odrasle osobe oko treće godine života. Složena i raznolika prehrana uz učestalu izloženost okolišu povećava složenost i zastupljenost crijevne mikrobiote (Janadhya i sur., 2015).



**Slika 2.** Shematski prikaz oblikovanje čimbenika koji utječu na stvaranje crijevne mikrobiote (Tamburini i sur., 2016).

Crijevna mikrobiota je poprilično ustaljena kod zdravih osoba i bez velikih varijacija. Starenjem dolazi i do promjene crijevnog mikrobioma što se očituje smanjenom sposobnošću biosinteze vitamina B<sub>12</sub>, smanjenom aktivnošću mikrobnih reduktaza, slabijim odgovorom na stres i slabijim imunološki sustav (Lan i sur., 2013).

### 2.1.3. Mikrobiota i zdravlje

Dugo se nagađalo da crijevna mikrobiota ima značajnu funkcionalnu ulogu u održavanju ljudskog zdravlja. Visokokvalitetni podaci dobiveni sekvencijskim analizama metagenoma, iz projekata *US Human Microbiome Project* (HMP) i *European Metagenomics of the Human Intestinal Tract* (MetaHIT), potvrdili su korisne funkcije zdrave crijevne mikrobiote za zdravlje čovjeka sve do genetske razine. Crijevni mikrobiom kodira biokemijske puteve koje ljudski genom još nije razvio i zbog toga se crijevnu mikrobiotu kod ljudi može smatrati individualnim organom smještenim u probavnom sustavu koji ima metabolički kapacitet veći od jetre (Egert i sur., 2006). Mikrobiota crijeva održava kooperativni odnos s mukozom crijeva te sudjeluje u važnim metaboličkim i imunološkim funkcijama zdravih pojedinaca.

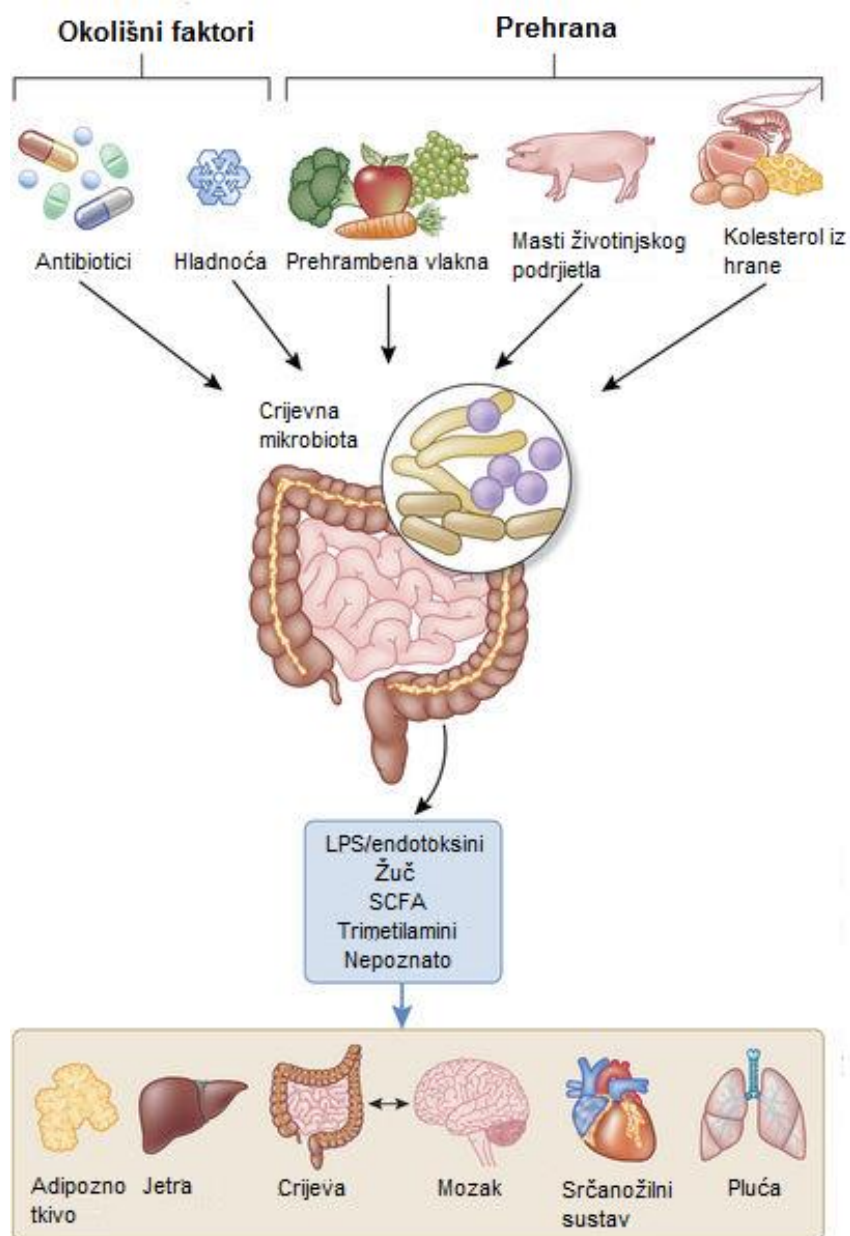
Mikrobiota uvelike povećava biodostupnost hranjivih tvari iz ugljikohidrata u crijevima. Fermentacija ugljikohidrata koji su izbjegli proksimalnu probavu i teško razgradljivih oligosaharida odvija se u debelom crijevu, djelovanjem bakterija kao što su *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* i *Enterobacteriaceae* te rezultira sintezom masnih kiselina kratkog lanca (SCFA) kao što su butirac, propionat i acetat, koji su bogati izvori energije za čovjeka (Macfarlane i Macfarlane, 2003). Sintaza vitamina K, vitamina B9 i B12 još je jedna od metaboličkih funkcija crijevne mikrobiote kao i sintaza konjugirane linolenske kiseline (CLA). Pokazalo se da pripadnici roda *Bacteroides* sintetiziraju konjugiranu linolensku kiselinu za koju se zna da ima antidijabetička, antiaterogena, hipolipidemična i imunomodulirajuća svojstva (Devillard i sur., 2007). Isto tako, mikrobiota se pokazala kao važna komponenta u metabolizmu toksina i karcinogena iz hrane, konverziji kolesterola i žučnih soli, sazrijevanju imunološkog sustava, za rast i diferencijaciju enterocita, regulaciju crijevne angiogeneze i zaštitu od enteričkih patogena (Gérard, 2016).

Novija istraživanja pokazuju da crijevna mikrobiota, uz već determinirane čimbenike koji potencijalno mogu doprinijeti razvoju pretilosti poput genetike i nepravilnih prehrambenih navika, također može utjecati na metabolizam čovjeka (Ley i sur., 2006). Isto tako se smatra da crijevna mikrobiota ima ulogu i kod pojave raka debelog crijeva kod ljudi. Za *Fusobacterium*, invazivnu anaerobnu bakteriju koja se povezivala samo s upalnim bolestima crijeva, sada se smatra da njena povećana zastupljenost ima ulogu u patogenezi raka debelog crijeva. Iako točna uloga *Fusobacterium* u nastanku raka nije poznata, zna se da njena prisutnost doprinosi razvoju upale koja je rizični faktor za razvoj raka debelog crijeva (DeGruttola i sur., 2016).

Budući da crijevna mikrobiota obavlja razne funkcije koje ljudsko tijelo nije u mogućnosti samo provesti, možemo reći da mikrobiota obitava u simbiozi s ljudima.

## 2.2. FAKTORI KOJI UTJEČU NA CRIJEVNU MIKROBIOTU

Nekoliko čimbenika pridonosi oblikovanju crijevne mikrobiote koji dinamički djeluju na njen sastav tijekom cijelog života pojedinca i time utječu na razvoj cijelog organizma (Slika 4).



**Slika 4.** Shematski prikaz kako vanjski čimbenici utječu na crijevnu mikrobiotu čime djeluju na cijeli organizam (Schroeder i Bäckhed, 2016).

### 2.2.1. Prehrana

Već ranije u radu je navedeno da među prvotnim utjecajima na razvoj crijevne mikrobiote osim načina poroda veliku ulogu ima i sama prehrana novorođenog djeteta. Prehrana je i dalje najvažnija odrednica u oblikovanju sastava, raznolikosti i bogatstva crijevne mikrobiote čak i tijekom odrasle dobi. Općenito, unos prehrane bogate voćem, povrćem i vlaknima povezan je s višom koncentracijom i raznolikošću mikroorganizama u crijevima. Pojedinci koji imaju takvu prehranu imaju veći broj mikroorganizama koji su sposobni metabolizirati netopive ugljikohidrate, kao što su bakterijske vrste *Ruminococcus bromii*, *Roseburia* i *Eubacterium rectale* koje pripadaju bakterijskom koljenu *Firmicutes*. Bakterije roda *Bacteroides* povezuje s tipičnom „zapadnjačkom prehranom“ koju karakteriziraju visok udio proteina i masti u prehrani (Walker i sur., 2011).

Nedavno je pokazano da je četverodnevna primjena prehrane bazirane isključivo na životinjskim proizvodima rezultirala smanjenjem obilja bakterija iz koljena *Firmicutes* i povećanjem broja organizama tolerantnih na žuč, kao što su bakterije *Alistipes sp.* i *Bacteroides sp.* iz bakterijskog koljena *Bacteroidetes* i bakterije *Bilophila sp.* iz bakterijskog koljena *Proteobacteria*. To ukazuje da čak i vrlo kratke prehrambene manipulacije mogu imati značajan utjecaj na crijevnu mikrobiotu (David i sur., 2014).

### 2.2.2. Lijekovi

Poznato je da lijekovi koreliraju sa sastavom crijevne mikrobiote no još nisu u potpunosti razjašnjeni putovi njihovog djelovanja. Glavna skupina lijekova koja ima znan utjecaj na crijevnu mikrobiotu su antibiotici. Antibiotici se mogu klasificirati na temelju stanične komponente ili sustava na koji utječu, time ih ako uzrokuju staničnu smrt bakterije nazivamo bakteriocidi ili ako samo inhibiraju rast stanica nazivamo bakteriostaticima. Najaktivniji baktericidni antimikrobni lijekovi, koji se koriste u današnje vrijeme, inhibiraju sintezu DNA, sintezu RNA, sintezu stanične stijenke ili sintezu proteina (Kohanski i sur., 2010). Prisutnost takvih lijekova u svakodnevnoj konzumaciji dovelo je do pitanja kakav je njihov utjecaj na "poželjnu" bakterijsku zajednicu u ljudskom organizmu. Uspostavljeni su čvrsti dokazi koji ukazuju da uporaba antibiotika izaziva kratkotrajne ali i dugotrajne promjene u sastavu crijevne mikrobiote. Učinak koji uzrokuje upotreba antibiotika uključuje smanjenu taksonomsku raznolikost i trajne promjene sastava mikrobiote kod velikog broja pojedinaca. Dokazano je da učinak kratkotrajne upotrebe (7 dana) antibiotika širokog spektra može trajati i do 2 godine, pri čemu većinom dolazi do promjene u omjeru bakterijskih koljena *Bacteroides* i *Firmicutes* te do smanjenja raznolikosti unutar istih i do 25%.

Smanjena otpornost na novo koloniziranih mikroorganizama javlja se nakon prestanka terapije antibioticima i ponovnog uspostavljanja ravnoteže stvarajući povoljne uvjete stranim bakterijama da prerastu komenzalne i tako uzrokuju trajne promjene u strukturi mikrobiote i potencijalno pridonose razvoju različitih bolesti. Uz narušavanje bioraznolikosti crijevne mikrobiote javlja se i druga velika briga oko uporabe antibiotika a to je pojava otpornosti patogenih bakterija na antibiotike. Održavanje crijevne mikrobiote uravnoteženom zahtjeva strogo kontrolirani unos antibiotika popraćen konzumacijom probiotika (Clemente i sur., 2012; Jandhyala i sur., 2015).

Kako bi se postigao vjerodostojan sastav crijevne mikrobiote ispitanici ovog istraživanja nisu bili pod utjecajem lijekova.

### 2.2.3. Probiotici

Probiotici kao kulture živih mikroorganizama imaju direktan utjecaj na sastav mikrobiote, crijevni metabolizam i imunološki odgovor te se smatraju funkcionalnom hranom jer su pokazali da uneseni u prikladnim količinama pomažu u održavanju zdravlja ljudi (Rehman i sur., 2012). Primjenjiva dnevna doza probiotičkih bakterija,  $10^9$  ili  $10^{10}$ , u usporedbi s  $10^{12}$  bakterija po gramu sadržaja debelog crijeva nije značajna, no ipak dovodi do potencijalnog smanjenja patogenih bakterija prisutnih u crijevima čovjeka. Razlog tome može biti pozitivan utjecaj probiotika na interakcije između mikroorganizama kao i između domaćina i mikroorganizama što je vidljivo u tablici 1, ali također i njihova mogućnost da ograniče rast patogena modulirajući interakcije kompetitivne crijevne mikrobiote i / ili proizvodnjom antimikrobnih spojeva (Oelschlaeger, 2010).

Prisutnost probiotičkih supstrata rezultira povećanom koncentracijom bakterija mliječne kiseline u tankom crijevu čovjeka što utječe na metaboličku aktivnost crijevne mikrobiote te sav prisutan šećer podilazi procesu fermentacije od strane bakterija što rezultira visokom koncentracijom organskih kiselina i/ili etanola. Promjenom metabolizma pojedinih komponenata mikrobiote dolazi do modifikacije okolišnih uvjeta. Inducirana promjena u lumenu crijeva dovodi do znatnog smanjenja sinteze različitih toksičnih metabolita za koje su potencijalno zaslužni patogeni organizmi, ali ujedno stvoreni uvjeti postaju nepogodni za rast i razvoj nepoželjnih mikroorganizama (Ouwehand i Vaughan, 2006



**Tablica 1.** Prikaz određenih probiotika i njihovog utjecaja na crijevnu mikrobiotu čovjeka (Ouwehand i Vaughan, 2006).

Tip probiotičkog organizma	Utjecaj na crijevnu mikrobiotu
<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Povećana koncentracija bakterija u fecesu roda <i>Bifidobacterium</i> i <i>Lactobacillus</i> .
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Redukcija bakterija iz porodice <i>Enterobacteriaceae</i> za 4 log ciklusa, iz roda <i>Clostridium</i> za 1 log ciklus, blago smanjenje u bakterija iz roda <i>Enterococcus</i> .
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Balansiranje crijevne mikrobiote.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Balansiranje crijevne mikrobiote.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Vrlo značajan porast u broju bakterija roda <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Propionibacterium</i> i <i>Lactococcus</i> .
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Povećana koncentracija bakterija u fecesu roda <i>Bifidobacterium</i> i <i>Laktobacillus</i> .

#### 2.2.4. Prebiotici

Indirektnim pristupom prebiotici oblikuju crijevnu mikrobiotu na način da teže ka selektivnoj stimulaciji proliferacije i/ili aktivnosti poželjnih bakterijskih populacija već prisutnih u probavnom traktu. Prebiotici se definiraju kao neprobavljivi sastojci hrane koji povoljno utječu na domaćina, selektivno stimulirajući rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom crijevu (Gibbson i Roberfroid, 1995). Važno je naglasiti da karakteristike koje dijele svi prebiotici su da oni u velikoj mjeri ostaju neprobavljeni tijekom prolaska kroz želudac i tanko crijevo. Na taj način prebiotici utječu na sastav mikrobiote selektivnom stimulacijom samo korisnih populacija bakterija i/ili inhibicijom rasta nepoželjnih bakterija te smanjenjem pH u lumenu debelog crijeva (Simpson i Campbell, 2015). Dijetalna vlakna kao što su prebiotici moguće je razgraditi fermentacijom do kratko lančanih masnih kiselina (SCFA) kao što su acetat, propinat i butirrat koje su ujedno glavni izvor energije i kisika za kolonocite (Roberfroid i sur., 2010). Bakterije koje koriste neprobavljive oligosaharide kao glavni izvor hranjivih tvari su saharolitičke bakterije od kojih najznačajnije pripadaju u bakterijske rodove *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* i *Clostridium* (Wilson i Whelan, 2017). Takve bakterije u

genomu sadrže specifične genske klustere koji definiraju funkciju saharolitčkih enzima bakterija i time omogućuju razgradnju prebiotičkih supstrata što je prikazano u tablici 2.

**Tablica 2.** Prikaz prebiotika i bakterijskih rodova koji ih razgrađuju (Ouweland i Vaughan, 2006).

Prebiotik	Bakterijski enzim potreban za hidrolizu prebiotika	Rodovi bakterija specifičnih za prebiotik i fermentacijski produkt
Inulin	$\beta$ – fructofuranozidaza (fruktanaza)	<i>Bifidobacteria</i> (acetat, laktat)
Oligofruktoza		<i>Lactobacilli</i> (laktat)
Frukto-oligosaharid		<i>Bacteroides</i> (acetat, propionat)
$\beta$ -Galakto-oligosaharidi	$\beta$ – galaktozidaza	<i>Bifidobacteria</i> (acetat, laktat)
Pšenični dekstrin (NUTRIOSE® FB06)	$\beta$ – glukozidaza	<i>Bacteroides</i> (acetat, propionat)

SCFA kao produkti razgradnje prebiotika osim što su važan izvor hranjivih tvari za crijevni epitel, utječu i na oblikovanje crijevne mikrobiote. Povećane koncentracije butirata, propinata i acetata u lumenu debelog crijeva dovode do naglog pada pH čime se postižu okolišni uvjeti koji su nepogodni za rast i razvoj gram-negativnih bakterija *Enterobacteriaceae* uključujući patogene *Salmonella spp.* i *Escherichia coli* (Simpson i Campbell, 2015).

Prebiotici dokazane djelotvornosti koji se najčešće koriste kao funkcionalni sastojak hrane su neprobavljivi oligosaharidi, od toga najviše inulin. Inulin je proučavan kroz brojna istraživanja te su njegova prebiotička svojstva dokazana. Inulin selektivno stimulira rast bakterija iz roda *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. Bifidu*, *B. Longum*), roda *Firmicutes* (*F. prausnitzii*) uz inhibiciju rasta potencijalnih patogena poput primjerice *E. coli* (Simpson i Campbell, 2015). Osim stimulacije rasta poželjnih bakterija i inhibicije nepoželjnih, konzumacija inulina dovodi do smanjenja luminalnog pH debelog crijeva inhibirajući rast patogena.

U ovom radu se koristio pšenični dekstrin u obliku komercijalnog proizvoda NUTRIOSE® FB06. Pšenični dekstrin je pokazao brojna svojstva koja se mogu povezati s prebioticima i utjecati na oblikovanje crijevne mikrobiote. Bakterijska fermentacija topivih vlakana pokazala je smanjenje pH u lumenu debelog crijeva, dovela do promjene mikrobiote i inducirala proizvodnju kratko lančanih masnih kiselina. Istraživanja na pšeničnom dekstrinu pokazala su

sličan fermentabilni učinak kao kod inulina. Pšenični dekstrin kao i inulin dovodi do smanjen pH, ali sa znatno manjom proizvodnjom vodika i ukupnog plina nego što je slučaj kod inulina (Lefranc-Millot i sur., 2012). Trenutno dostupna istraživanja pokazuju da dnevna potrošnja od 8 g do 10 g NUTRIOSE® unutar 14 dana povećava koncentraciju roda *Bacteroides*. Osim toga, koncentracija potencijalno štetne bakterije *Clostridium perfringens* znatno je smanjena konzumacijom 15 g/dan topivih vlakna kroz 14 dana (Lefranc-Millot i sur., 2012; Hobden i sur., 2013). Potrebna su dodatna ispitivanja utjecaja NUTRIOSE® FB06 na ljudski organizma.

### 2.3. MIKROBIOTA, PREBIOTICI I PRETILOST

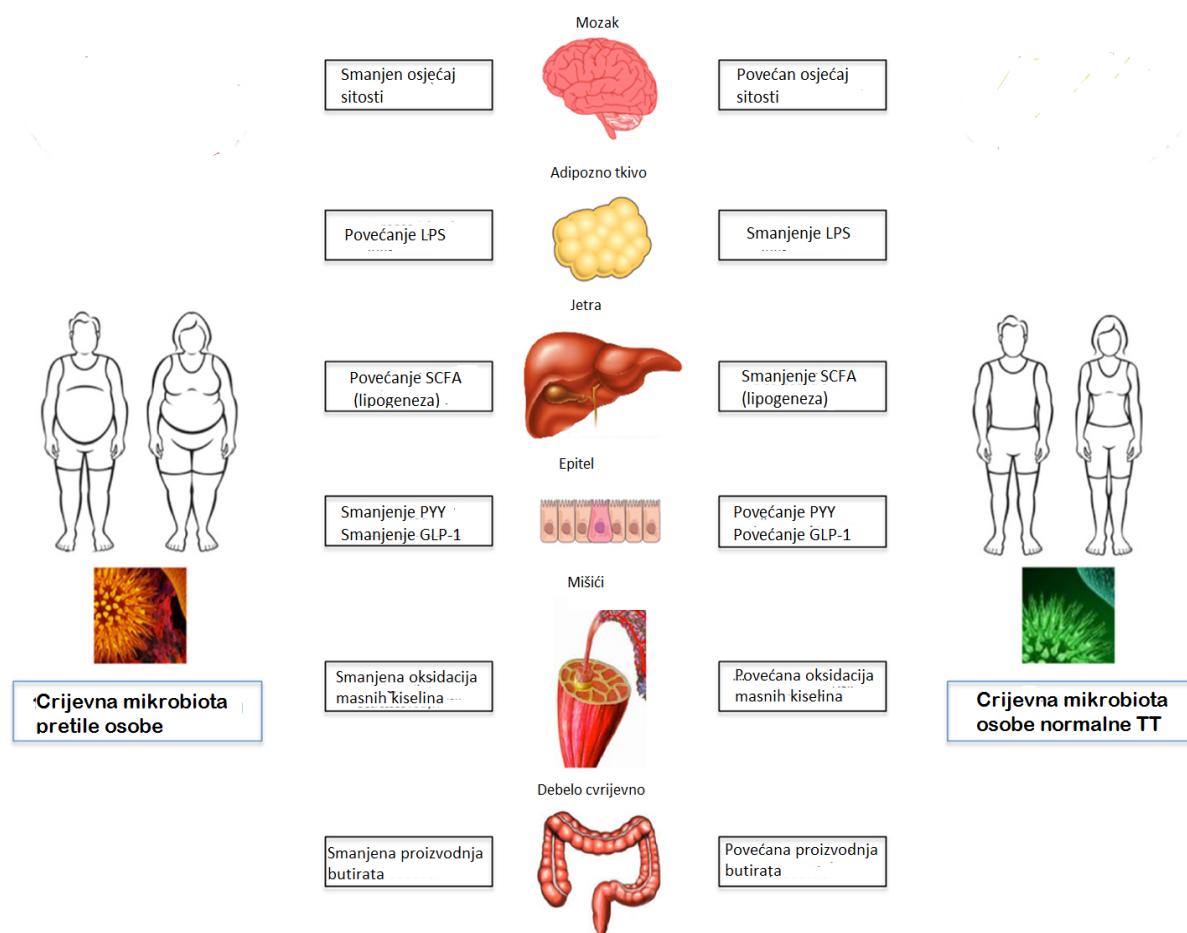
Prevalencija pretilosti znatno se povećava u cijelom svijetu, a takva kronična bolest kao što je pretilost za sobom povlači niz drugih bolesti i srodnih poremećaja. Kako bi se bolest spriječila prvo se mora otkriti njezin uzrok koji za pretilost nažalost izrazito kompleksan i još nije u potpunosti razjašnjen. Najčešćim uzrocima pretilosti se smatraju kulturološki utjecaji na prehrambene navike i tjelesnu aktivnost te genetski čimbenici. No, nedavni uvidi stvorili su sasvim novu perspektivu koja sugerira da bi naša mikrobiota mogla biti uključena u razvoj pretilosti. Istraživanja su pokazala da pretilost i metabolički sindromi mogu biti povezani s dubokim mikrobiotskim promjenama (Gérard, 2016; Ley i sur., 2006).

Crijevna mikrobiota pretilih osoba povezana je s manjom bakterijskom raznolikošću, promjenama na razini koljena i roda te smanjenom ekspresijom bakterijskih gena i metaboličkih putova uključenih u razgradnju hranjivih tvari. Navedene razlike većinom se odnose na bakterije koje pripadaju koljenima *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Actinobacteria* (Tremaroli i Backhed, 2012). Bakterije koljena *Firmicutes* su prisutnije kod pretilih osoba nego bakterije koljena *Bacteroidetes* ali se njihov broj povećava proporcionalno s gubitkom tjelesne težine sugerirajući da na njih utječe unos kalorija (Ley i sur., 2006). Teza da se omjer *Firmicutes* / *Bacteroidetes* u pretilih osoba smanjuje gubitkom tjelesne težine dovodi do mogućnosti da modifikacija obilja prisutnih bakterijskih zajednica crijeva može biti korisna u tretiranju pretilosti (Ley i sur., 2006). Naročito značajan utjecaj imaju bakterije *Lactobacilli* bakterijskog koljena *Firmicutes* koje su spomenuti kao promotori rasta i povezani su s povećanjem težine i upalnim procesima tijekom pretilosti. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus ingluviei* su pokazali pozitivan utjecaj na povećanje tjelesne težine dok su *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus gasseri* povezani s gubitkom tjelesne težine (Armougom i sur., 2009). Važno je naglasiti da omjer *Firmicutes/Bacteroidetes* nije u potpunosti referentan biokemijski marker za definiranje ili tretiranje pretilosti budući da razina bakterijskog koljena obuhvaća preveliku populaciju bakterija koje do razine roda ili vrste mogu imati različite utjecaje na organizam domaćina. Isto tako postoje istraživanja u kojima nisu uočene značajne razlike u prisutnosti bakterijskih koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* između pretilih osoba i osoba sa normalnom tjelesnom težinom te su potrebna dodatna istraživanja. (Gérard, 2016).

Crijevna mikrobiota je povezana s pretilošću preko određenih mehanizama kao što su pretjerano oslobađanje energije u tijelu, visoke razine fermentiranih kratko lančanih masnih kiselina koji potiču adipogenezu, ekspresija gena vezanih uz pretilost i povećana proizvodnja

plazmatskih lipopolisaharida (LPS) koji uzrokuju pretilost i upale (Slika 5) (Chen i sur., 2014).

Prebiotici, kao što je već navedeno, imaju značajnu važnost u oblikovanju crijevne mikrobiote te preko nje potiču niz kaskadnih reakcija i mehanizama koji koreliraju s pretilošću kao što je (i) povećana sinteza hormona probave koji izaziva osjećaj sitosti, GLP-1 i peptid YY, te inhibicija lučenja grelina, hormona koji izaziva glad, oni utječu i na (ii) poboljšanje tolerancije na glukozu i osjetljivost na hormon sitosti, leptin, te (iii) potiču proces fermentacije u crijevima i time utječu na GPR43 receptor koji kontrolira razvoj adipoznog tkiva (Cani i sur., 2009; Dewulf i sur., 2011; Hess i sur., 2011).



**Slika 5.** Shematski prikaz utjecaj crijevne mikrobiote na pretilost i metaboličke sindrome (Parekh i sur., 2014).

Konzumacija prebiotika osim što potiče biokemijske procese u organizmu koji dovode do regulacije unosa hrane u organizam pa time i pretilosti, ima i utjecaj na sastav crijevne mikrobiote koja ima pogodan učinak na gubitak tjelesne težine.

Istraživanje provedeno u *in vitro* kontinuiranom sustavu debelog crijeva pokazalo je da pšenični dekstrin značajno povećava proliferaciju gram-pozitivnih bakterija *Clostridium XIV Cluster* i roda *Roseburi*, ključnih proizvođača butirata (Hobden i sur., 2013). Eksperimentalni rad na glodavcima sugerira da je pretilost obrnuto proporcionalna koncentraciji *Clostridium XIV Cluster* i *Roseburi* bakterija (Neyrinck i sur., 2012). Postoji mogućnost da pšenični dekstrin također može imati restorativne učinke na mikrobnu populaciju *Clostridium XIV Cluster* i *Roseburia* roda u pretilih osoba i osoba s prekomjernom tjelesnom težinom.

Prebiotici imaju značajan utjecaj na crijevnu mikrobiotu i pretilost te su potrebna dodatna istraživanja koja će razjasniti njihovu povezanost i točno definirati kako primijeniti prebiotike da bi se postigao željeni ishod.

## 2.5. IN VITRO SUSTAVI ZA ODRŽAVANJE MIKROBIOTE DEBELOG CRIJEVA

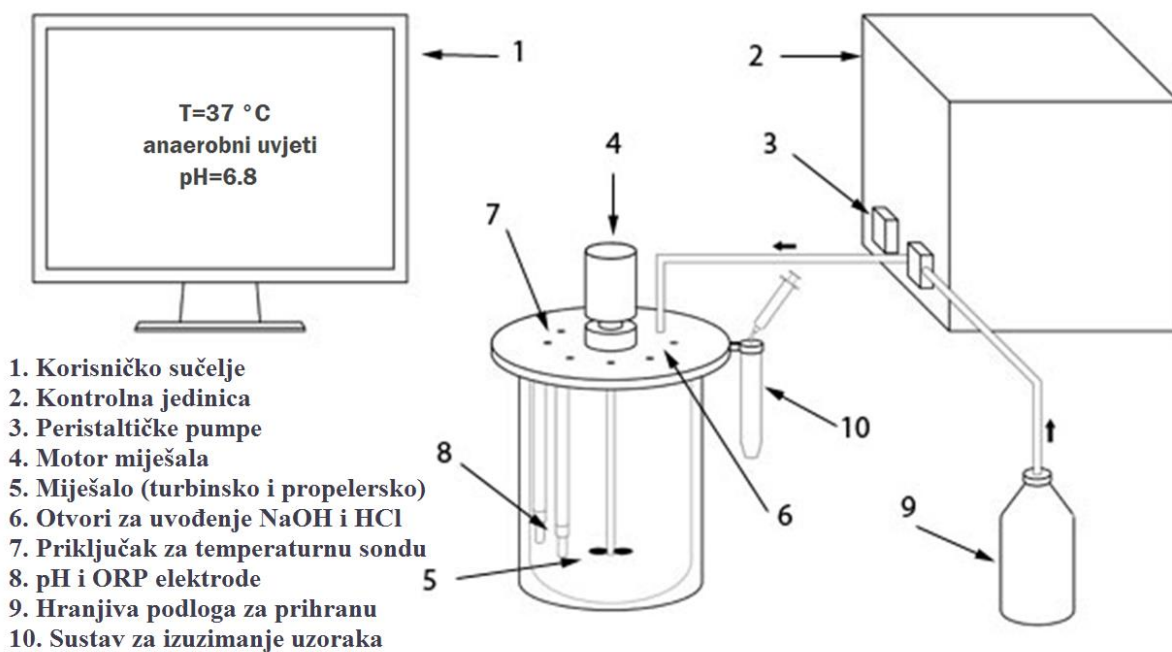
*In vitro* modeli za održavanje mikrobiote probavnog trakta danas su učestalo korišteni sustavi iako nisu u mogućnosti zamijeniti *in vivo* metode. Njihova glavna prednost je da olakšavaju dobivanje etičkih odobrenja i omogućavaju izbjegavanje testiranja na životinjama. *In vitro* modeli nemaju sposobnost u potpunosti stimulirati sve uvjete probavnog trakta kao što je lučenje probavnih sokova, epitelne stanice crijeva te precizno simuliranje endokrinog i imunološkog sustava, no omogućavaju jednostavno uzorkovanje te postavljanje parametara procesa kao što su pH, temperatura i brzina prihrane. Za simulaciju probavnog sustava najčešće korišteni *in vitro* modeli su SHIME i TIM-2.

SHIME (eng. "Simulator for Human Intestinal Microbiological Ecosystem") *in vitro* model se sastoji od pet međusobno spojenih bioreaktora različitih volumena koji simuliraju probavni sustav od želudca i tankog crijeva kao dva bioreaktora do debelog crijeva gdje jedan od preostala tri bioreaktora predstavlja ulazni, poprečni i slizani dio. Ovakav *in vitro* model zahtjeva kontinuirano provođenje procesa (Molly i sur., 1993). Za razliku od SHIME sustava TIM-2 model simulira samo uvjete u debelom crijevu. Sastoji se od nekoliko modula s fleksibilnom silikonskom membranom čime se postiže peristaltičko gibanje u svakom djelu debelog crijeva u određenim intervalima. TIM-2 se razlikuje od ostalih *in vitro* kontinuiranih modela jer ima uveden sustav membrana sa šupljim vlaknima koje imitiraju crijevne resice i služe kao sustav za dijalizu koji provodi proces sličan apsorpciji u debelom crijevu (Venema i sur., 2000).

Za provedbu eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korišten je bioreaktor Jupiter 2.0 (Slika 6)(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 je prikazan na slici 7 a sastoji se od: staklene posude fermentora, kontrolnog modula s računalom te se cijeli sustav kontrolira putem „Leonardo“ programskog paketa.



**Slika 5.** Prikaz Jupiter 2.0 bioreaktora (User and Maintenance manual for Jupiter 2.0.,2016).



**Slika 7.** Skica bioreaktora Jupiter 2.0



### **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. Hranjiva podloga za anaerobni uzgoj u bioreaktoru

Za provedbu anaerobnog uzgoja mikrobiote u bioreaktoru je korištena složena hranjiva podloga čiji se sastav nalazi u tablicama 3,4 i 5. Hranjiva podloga je pripravljena izvagom potrebne težine ugljikohidrata, soli i vitamina. Sastav ugljikohidrata (Tablica 3) korišten u hranjivoj podlozi simulira neprobavljene komponente hrane koje iz zadnjeg dijela tankog crijeva zvanog ileus prelaze u debelo crijevo na temelju čega se hranjiva podloga u literaturi zove SIEM (eng. „Simulated Ileal Efflux Medium“). Ovakva hranjiva podloga karakterizira tzv. zapadnjačku prehranu koja podrazumijeva visoku konzumaciju ugljikohidrata u svakodnevnoj prehrani. Naknadno je dodan prebiotik Nutriose® FB06 kako bi se ispitao utjecaj njegovog dodatka na sastav crijevne mikrobiote.

**Tablica 3.** Sastav SIEM podloge.

<b>SASTOJAK</b>	<b>KOLIČINA (g/L)</b>
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	0,4

Osim ugljikohidrata, u hranjivu podlogu se dodaje i dijalizat, odnosno otopina soli čiji je sastav prikazan u tablici 4. Sterilizirana otopina se u tikvice sa otopljenim ugljikohidratima

dodaje nakon sterilizacije kako bi se spriječile nepoželjne interakcije zbog visokih temperatura tijekom sterilizacije.

**Tablica 4.** Sastav otopine soli.

SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)
$K_2PO_4 \times 3H_2O$	2,500
NaCl	4,500
$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,005
$MgO_4 \times 7H_2O$	0,500
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,450
Žučne soli	0,050
Cisetin hidroklorid	0,400

Naposljetku se u hranjivu podlogu, netom prije prihrane mikrobiote u bioreaktoru, se dodaje vitaminska otopina čije je sastav naveden u tablici 5. Za svaki uzgoj se priprema 10 mL otopine koja se ne sterilizira u autoklavu kako ne bi došlo do degradacije termolabilnih vitamina.

**Tablica 5.** Sastav otopine vitamina

SASTOJAK	KOLIČINA (za 10 mL)
Menadion (K)	0,010
D-biotin (B7)	0,020
Kobalamin (B12)	0,005
Pantotenska kiselina	0,100
Nikotinamid (B3)	0,050
p-aminobenzojeva kiselina	0,050
Tiamin (B1)	0,040
Demineralizirana voda	Do 10 mL

### 3.1.2. Prebiotik

U hranjivu podlogu korištenu u eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada je korišten komercijalni proizvod NUTRIOSE® FB06 (Roquette, SAD), topiva vlakna pšenice,

tzv. pšenični dekstrin. Koncentracija dodanog prebiotika iznosila je 9.4 g/L u prvom uzgoju te 15 g/L u drugom uzgoju.

### 3.1.3. Mikrobna kultura za inokulaciju

Mikrobna kultura za inokulaciju hranjive podloge u bioreaktor je dobivena iz uzorka svježeg fecesa pretile ženske osobe za koju je provedenim upitnikom utvrđeno da ne boluje od kroničnih bolesti te da također u trenutku uzimanja uzorka fecesa nije bolovala od akutnih upala niti je uzimala ikakve lijekove koji bi mogli utjecati na sastav mikrobiote. Antropometrijskim mjerenjem je određen indeks tjelesne težine, ITT (eng. „Body Mass Index“, BMI) 31 kg/m<sup>2</sup> čime je osoba definirana kao pretila. Uzorak fecesa korišten za inokulaciju u prvom uzgoju težio je 50 g, a u drugom uzgoju 45 g.

### 3.1.4. Laboratorijska oprema za simulaciju uvjeta debelog crijeva

#### 3.1.4.1. 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

#### 3.1.4.2. Bioreaktor s miješalom

Za uzgoj crijevne mikrobiote je korišten bioreaktor Jupiter 2.0 (Solaris Biotechnology, Porto Mantovano, Italija) radnog volumena 2 litre. Bioreaktor je opremljen sustavom za regulaciju temperature, sustavom za korekciju pH vrijednosti, ORP elektrodom (mjeri oksidacijsko redukcijski potencijal koji je pokazatelj anaerobnosti sustava), 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 i za dodavanje kiseline i lužine se nalaze s gornje strane bioreaktora, odnosno na poklopcu bioreaktora. Dva turbinska i jedno propelersko miješalo pokreće elektromotor snage 266 W (User and Maintenance manual for

Jupiter 2.0., 2016). Za vođenje i upravljanje procesom koristi se programska podrška „Leonardo“.

#### 3.1.4.3. Uređaji za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje DNA

- ❖ Maxwell® 16 Instrument, *Promega*, Sjedinjene Američke Države

#### 3.1.4.4. 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

#### 3.1.4.5. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

- ❖ Arabinogalaktan, *Sigma*, Sjedinjene Američke Države
- ❖ Baktipepton, *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
- ❖ Nutriose® FB06, *Roquette*, 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

#### 3.1.4.6. Ostale korištene 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

#### 3.1.4.7. Plin pod tlakom

- ❖ N<sub>2</sub> >99,996%, tehnički komprimirani plin, *Messer*, Hrvatska

#### 3.1.4.8. Računalni programi za analizu dobivenih podataka

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

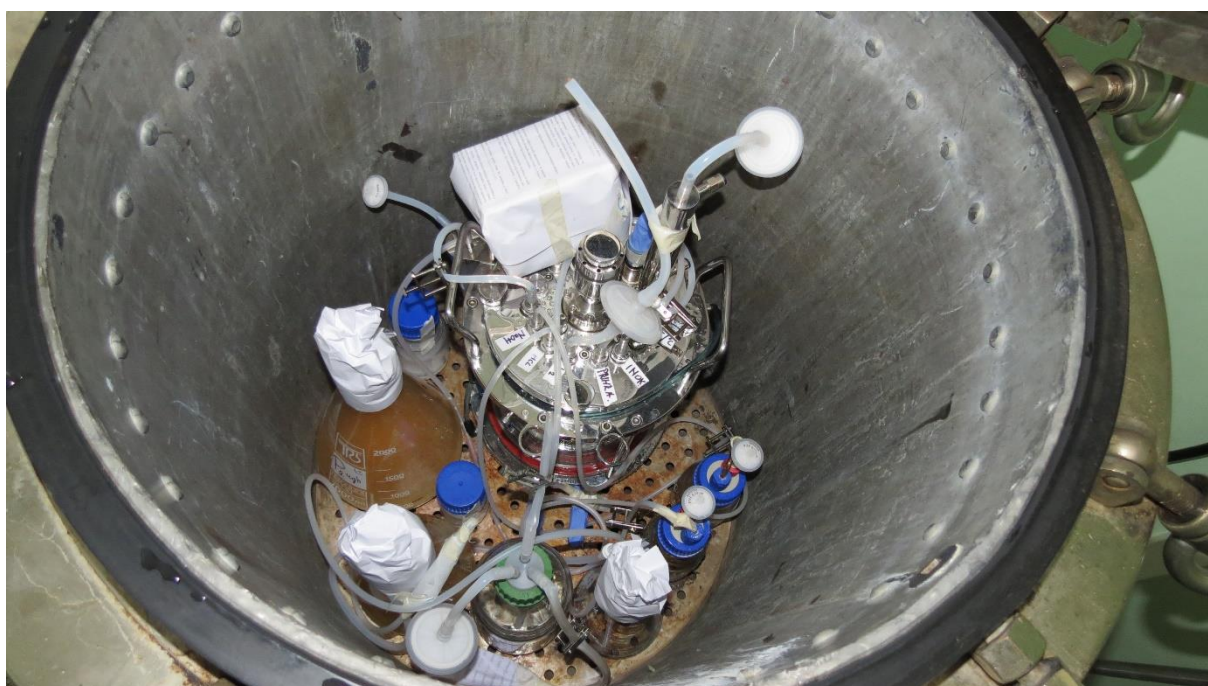
## 3.2 METODE

### 3.2.1. Priprema hranjivih podloga

Hranjiva podloga za uzgoj mikrobiote u bioreaktoru, tzv. SIEM podloga je pripremljena prema podacima iz literature (Gibson i sur., 1998; Van Nuenen i sur., 2003). Pripremljene su dvije hranjive podloge, od čega P1 predstavlja prihranu za mikrobnu kulturu za prvi dan procesa, a P2 predstavlja prihranu za mikrobnu kulturu koja je potrebna za slijedeća dva dana procesa. P1 prihrana pripremljena je u Erlenmeyerovoj tikvici od 1L u koju su dodani izvagani sastojci iz tablice 2 te su otopljeni u 270 mL destilirane vode. P2 prihrana pripremana je u Erlenmeyerovoj tikvici od 2L isto kao P1 samo s udvostručenom izvagom otopljenom u 550 mL destilirane vode. Odvagani sastojci iz tablica 3, 4 i 5 otopljeni su u demineraliziranoj vodi. U obje prihrane dodan je prebiotik NUTRIOSE® FB06 u koncentraciji navedenoj u poglavlju 3.1.2. prilagođenoj za volumen odvage. Potom je odvagana sol iz tablice 3 prenesena u staklenu bocu od 250 mL i otopljena u 30 mL demineralizirane vode za P1. Proces je ponovljen za P2 s razlikom da se dvostruko veća količina sastojaka otopila u 50 mL demineralizirane vode. Podloge su pripremljene s dvostruko manje vode jer se koriste u polukontinuiranom načinu rada. Za pripremu SIEM-a, u staklenu bocu od 500 mL je dodatna otopina soli koja je prije sterilizacije prenesena u bioreaktor. Kalibrirane pH i ORP elektrode montirane na gornju ploču bioreaktora su sterilizirane u autoklavu uronjene u 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 5. Otopina je čuvana u hladnjaku na 6 °C.

### 3.2.2. Sterilizacija hranjive podloge, pribora i aparature

Kroz proces sterilizacije prolaze obje prihrane s dodanim prebiotikom u Erlenmeyerovim tikvicama od 1L i 2L te odvojeno otopine soli u bocama od 250 i 500 mL. Potrebno je sterilizirati praznu Erlenmeyerovu tikvicu od 1 L u kojoj će se vršiti homogenizacija svježeg fecesa za inokulum. Prazna tikvica se spaja na bioreaktor i skupa s njim sterilizira. Prije sterilizacije na bioreaktor spajaju boce s otopinama HCl i NaOH koje služe za regulaciju pH vrijedosti tijekom procesa, te P1 hranjiva podloga i cijev s filterom veličine pora 0.2  $\mu\text{m}$  za izlazni plin (Slika 8). Izrazito je važno zabritviti sve otvore na bioreaktoru klemama ili filterima za zrak, otvorene krajeve cijevi zaštititi folijom za sterilizaciju, čepove od vate zaštititi papirom da se ne ovlaže parom koja nastaje tijekom sterilizacije te zaštititi priključke grijачa, te pH i ORP elektroda. Prije same sterilizacije je potrebno izbaždariti pH i ORP elektrode u za to predviđenim otopinama pufera. Bioreaktor se skupa s potrebnim priborom sterilizira u autoklavu na temperaturi od 121 °C u trajanju od 15 minuta. Po završetku sterilizacije se otopine soli prebacuju u Erlenmeyerove tikvice sa otopljenim ugljikohidratima kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije hranjive podloge.

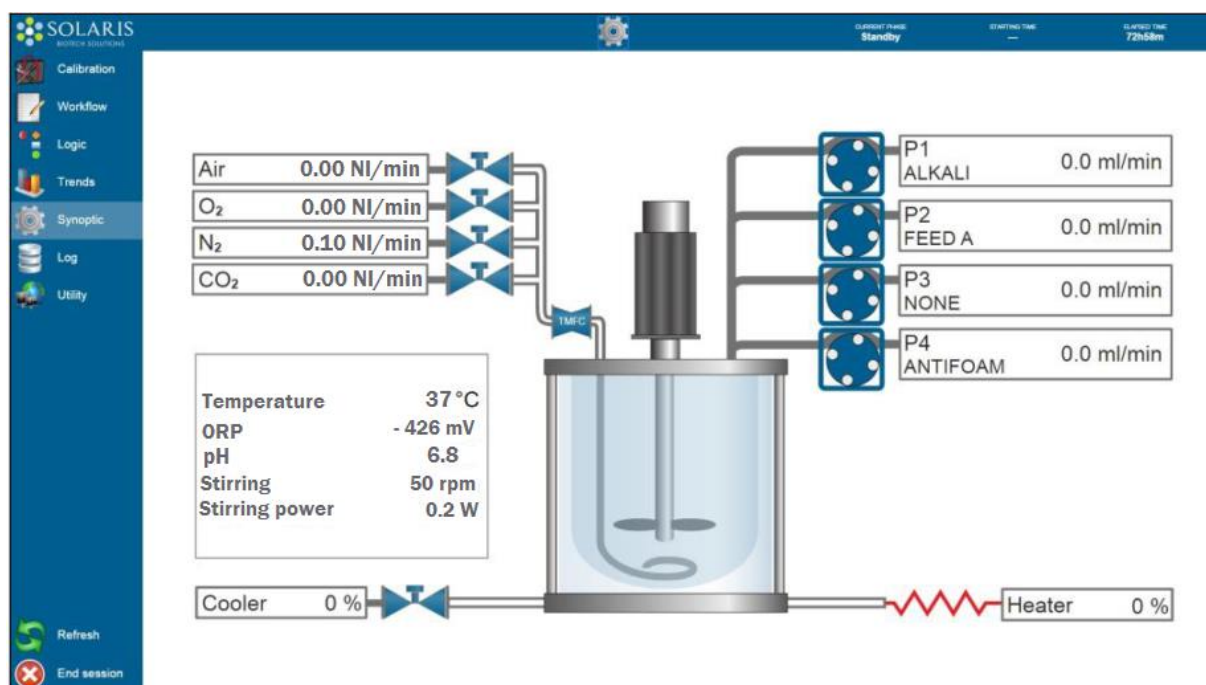


**Slika 8.** Dio *in vitro* sustava, posuda bioreaktora s potrebnim priborom, u autoklavu prije sterilizacije.



### 3.2.3. Faza prilagodbe mikrobiote u laboratorijskom bioreaktoru

Nakon sterilizacije je potrebno spojiti sustav i postaviti željene parametre prije početka uzgoja. Parametri koji se definiraju putem programa za vođenje procesa omogućuju simulaciju uvjeta u debelom crijevu (Slika 9.). Temperatura procesa iznosi 37 °C, a pH vrijednosti 5.8, 6.2 ili 6.8, ovisno o dijelu debelog crijeva koji se simulira. Uvođenjem dušika u sustav se osigurava anaerobnost procesa, a u ovom procesu je to 0,2 NI/min. Brzina miješanja se izmjenjuje tijekom procesa ovisno o potrebama, gdje se prije inokulacije održava na 50 okretaja u minuti, a tijekom vođenja anaerobnog procesa se koristi profil miješanja u kojem se ciklički izmjenjuje brzina miješanja od minimalnih 30 okretaja u minuti u trajanju od 10 minuta do maksimalnih 150 okretaja u minuti u trajanju od 2 minute. Radni volumen bioreaktora tijekom uzgoja je 600 mL.



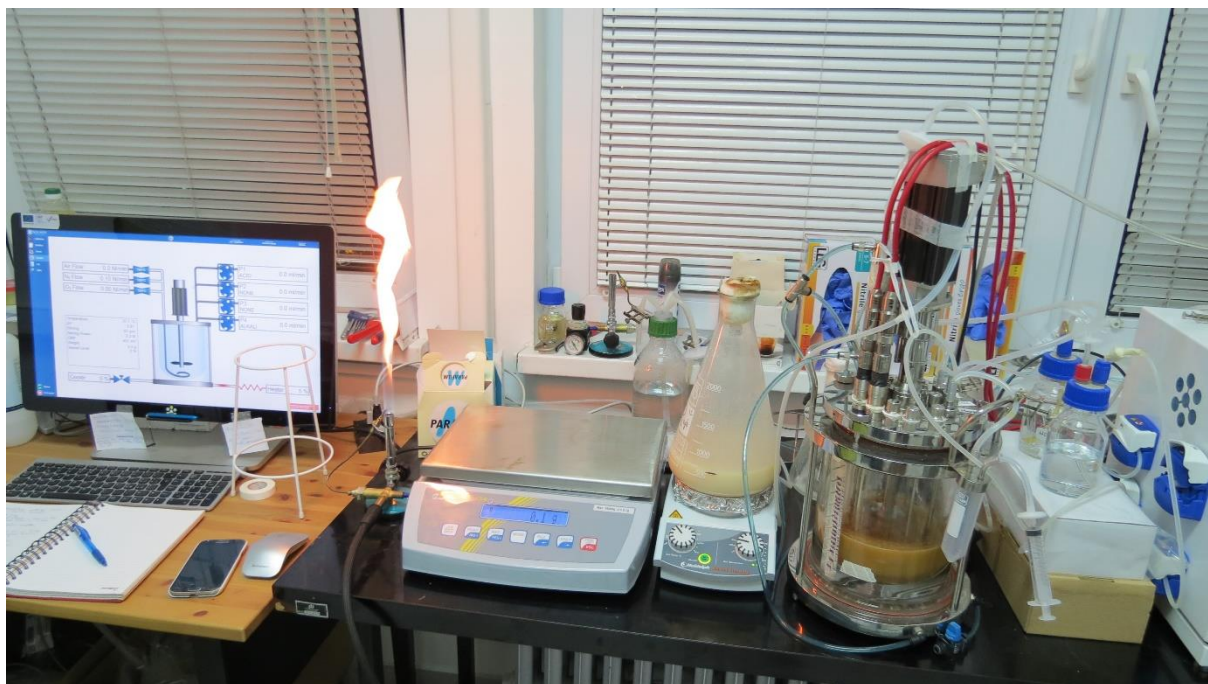
**Slika 9.** Prikaz grafičkog korisničkog sučelja "Leonardo" programa za definiranje i praćenje uvjeta procesa.

Eksperiment započinje homogenizacijom uzorka svježeg fecesa u za to predviđenoj steriliziranoj Erlenmeyerovoj tikvici. Svježi feces se otapa i homogenizira u 300 mL dijalizata nakon čega se homogenizat prebacuje u bioreaktor pomoću peristaltičkih pumpi na kontrolnoj jedinici. Masa svježeg fecesa u prvom uzgoju bila je 50 g, a u drugom 45 g uzorka. Ubacivanjem homogenizata fecesa u bioreaktor započinje faza prilagodbe koja traje 4 sata, pri temperaturi 37 °C i pH vrijednosti od 5.8.

### 3.2.4. Vođenje anaerobnog mikrobnog procesa u bioreaktoru

Završetkom faze prilagodbe započinje faza uspostave uravnotežne mikrobiote koja u ovom eksperimentu započinje s prihranom u koju je prethodno dodano 0.6 mL otopine vitamina. Uvođenjem hranjive podloge P1 volumena 300 mL peristaltičkom pumpom u suspenziju mikrobiote u bioreaktoru volumena 300 mL se postiže željeni radni volumen od 600 mL (Slika 10.). Prvotno se simuliraju uvjeti uzlaznog dijela debelog crijeva pa se pH vrijednost održava na 5.8. te se mikrobiota zadržava u bioreaktoru 24 sata kako bi fermentirala hranjivu podlogu.

Nakon 24 sata se izvrši izmjena podloge u bioreaktoru. Izmjena se postiže ispumpavanjem 300 mL fermentirane podloge i dodavanjem 300 mL nove (P2) hranjive podloge pri čemu se održava željeni radni volumen od 600 mL. Nova hranjiva podloga je dodana u bioreaktor pomoću peristaltičke pumpe brzinom 10 okretaja u minuti. Kako bi se postigli uvjeti transversalnog dijela debelog crijeva pH vrijednost je prije uvođenja P2 hranjive podloge podešena na 6.2.



**Slika 10.** Prikaz *in vitro* sustava prilikom uvođenja prihrane u sterilnim uvjetima.

Na isti način je provedena i posljednja izmjena podloge u bioreaktoru u trećoj fazi uzgoja u kojoj se simulirao distalni dio debelog crijeva te je iz tog razloga pH vrijednost podešena na 6.8. Ispumpano je 300 mL fermentirane podloge iz bioreaktora i peristaltičkim pumpama dodano preostalih 300 mL P2 svježije hranjive podloge brzinom 10 okretaja u minuti. Nakon 72 sata procesa u kojima je svaka 24 sata vršena izmjena podloge u bioreaktoru, proces je

održavan dodatnih 24 sata u svrhu utvrđivanja biodinamike mikrobiote i nakon prestanka prihrane sa svježom hranjivom podlogom.

Tijekom cjelokupnog procesa, homogenost medija je održavana definiranim profilom miješanja opisanim u poglavlju 3.2.3. Željene pH vrijednosti su održavane dodavanjem otopina NaOH i HCl po potrebi, a anaerobnost je postignuta kontinuiranim protokom dušika (0,2 NL/min) te se anaerobnost pratila preko vrijednosti oksido-redukcijskog potencijala kojeg mjeri ORP elektroda. Punih 96 sati procesa su praćeni svi važni parametri procesa: pH vrijednost, temperatura, brzina okretanja miješala, protok dušika i oksido-redukcijski potencijal prikazani u priložima 1 i 2 te su praćene sve promjene koje su se dešavale tijekom procesa uzgoja. Za praćenje biodinamike mikrobiote su svakih 12 sati uzimani uzorci medija preko sustava za sterilno izuzimanje uzoraka te su uzorci odmah nakon izuzimanja pohranjeni na -80 °C.

### 3.2.5. Određivanje sastava crijevne mikrobiote

Sastav mikrobiote se određuje sekvencioniranjem 16S rRNA marker gena, a kako bi to bilo moguće potrebno je izolirati DNA iz uzoraka medija izuzetih iz bioreaktora tijekom procesa. DNA se izolira iz alikvota odmrznutih uzoraka koji se centrifugiraju na 1000 x g na 10 °C nakon čega se dobije supernatant. Potom se 400 µL suspenzije supernatana otpipetira u kazete Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit-a. Osim iz uzoraka izuzetih iz bioreaktora, DNA se izolira i iz uzoraka svježeg fecesa. U tom slučaju se 0,5 g fecesa stavi u kazete Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit-a te su daljni koraci za obje izolacije DNA na Maxwell uređaju provedeni prema uputama proizvođača. Na kraju procesa izolacije se dobije 300 µL pročišćene DNA u elucijskom puferu od čega se 200 µL otpipetira u označenu sterilnu epicu s čepom i pohrani u ledenicu na -20 °C do slanja na sekvencioniranje. Preostalih 100 µL služi za određivanje koncentracije izolirane DNA pomoću Shimadzu BioSpec Nano spektrofotometra. Izmjerene koncentracije skupa s šiframa uzoraka su prikazane u Tablici 6.

**Tablica 6.** Izmjerene koncentracije izolirane DNA i objašnjenje šifriranih uzoraka

Vrijeme uzorkovanja (dan)	Prvi uzgoj	Koncentracija (ng/ $\mu$ L); 2 $\mu$ L	Drugi uzgoj	Koncentracija (ng/ $\mu$ L); 2 $\mu$ L	Prihrana
	F8	/	GT2	/	Feces
0. dan	BT21	25,79	BT31	60,22	Dijalizat
1. dan	BT22	67,70	BT32	118,08	Hranjiva podloga 1
	BT23	94,76	BT33	69,40	
2. dan	BT24	69,47	BT34	19,16	Hranjiva podloga 2
	BT25	12,96	BT35	22,57	
3. dan	BT26	29,98	BT36	1,44	Hranjiva podloga 3
	BT27	48,41	BT37	1,84	

Sekvencioniranje DNA je izvršeno u Molekular Research Lab u Teksasu, SAD kao ugovorena vanjska usluga. Korištena je metoda sekvencioniranja sparenih krajeva (pair-end sequencing) na Illumina MiSeq uređaju. Korištene su početnice 341F-806R za umnažanje V3 i V4 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.

Sirovi podaci sekvencioniranja fragmenta gena 16S rRNA dolaze u dva dokumenta u FASTQ formatu koji sadržava podatke o očitanoj slijedu 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 očitanoj barkoda koji se nalazi na početku svakog slijeda. Sljedovi u kojima prvih 8 nukleotida nije u potpunosti odgovaralo jednom od korištenih barkodova su odbačeni iz daljnjih analiza. Sljedovi svakog uzorka su klasterirani u operacijske taksonomske jedinice (OTU, eng. „Operational taxonomic unit“) 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.

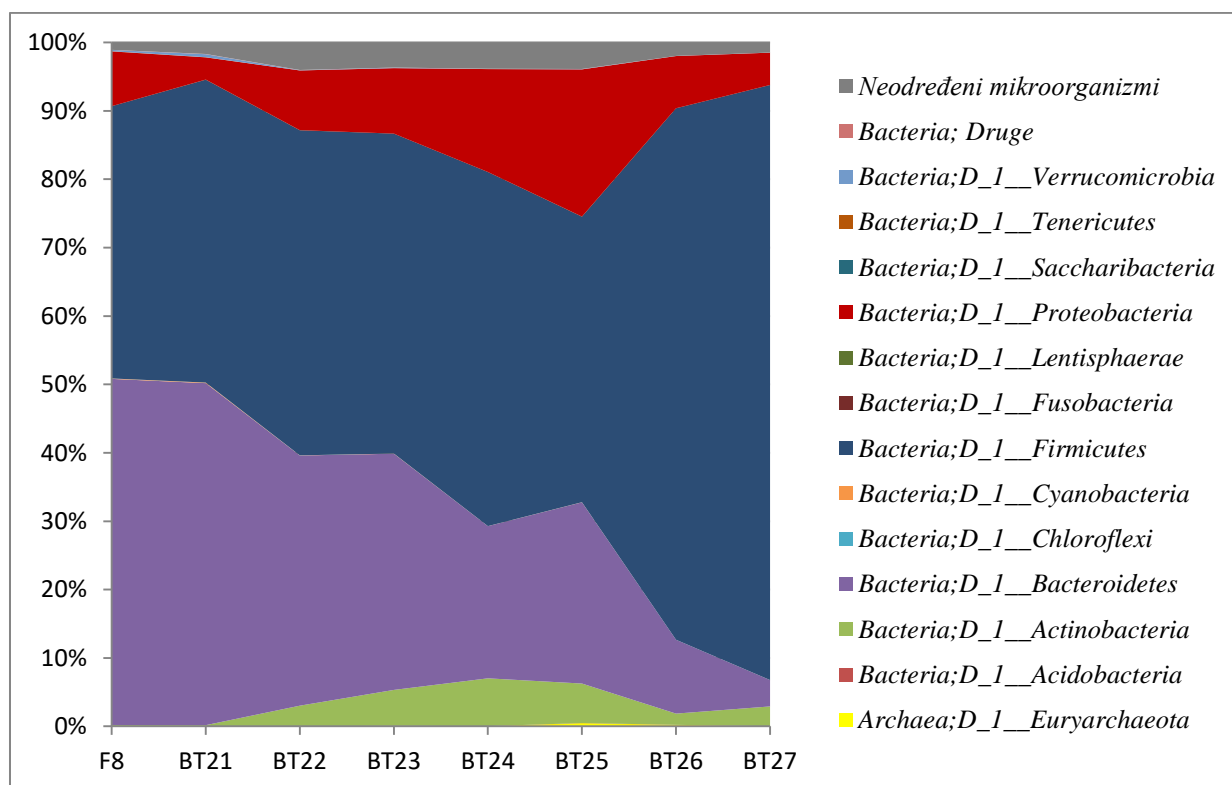
Rezultat obrade sirovih podataka sekvencioniranja u programu QIIME je biom tablica, koja sadrži sve informacije o sekvencama i taksonomskoj identifikaciji uzoraka i html dokument koji sadrži poveznice za vizualizaciju alfa i beta raznolikosti te određenu taksonomsku klasifikaciju dostupnih taksonomskih kategorija po uzorcima prikazanu površinskim dijagramima. Na grafičkim prikazima (poglavlje 4. Rezultati i rasprava) se nalaze rezultati dvaju uzastopnih uzgoja provedenih u bioreaktoru. Šiframa BT21 – BT27 su označeni uzorci iz prvog uzgoja, šifre BT31 – BT37 odnose na uzorke iz drugog uzgoja, a šifre F8 i GT2 označavaju uzorke izvornog fecesa za svaki pojedini uzgoj. Tablica 6 prikazuje opis šifriranih uzoraka i izmjerenu koncentraciju izolirane DNA.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

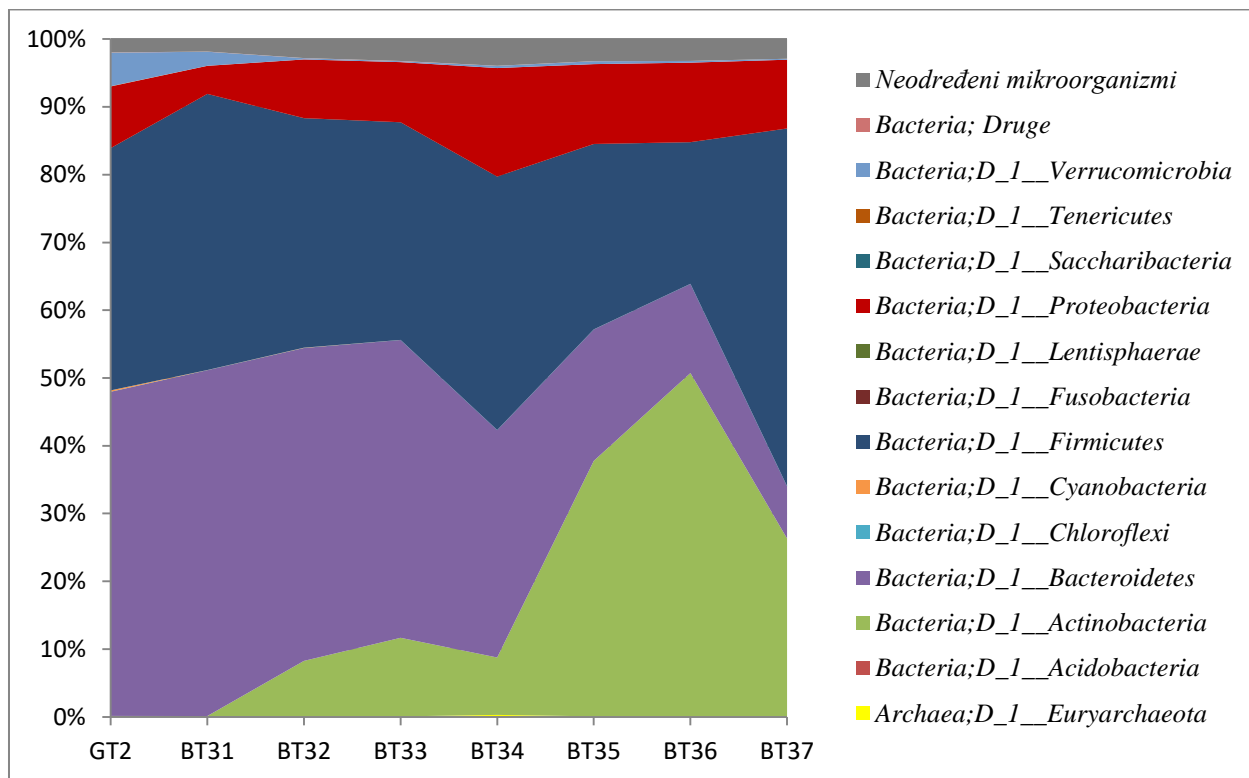
Posljednjih godina je drastično porastao interes za istraživanje mikrobiote, njenog utjecaja na zdravlje domaćina, promjene njenog sastava uslijed promjena u prehrani, zdravstvenog stanja domaćina ili nekih drugih faktora poput starosti, spola, okoliša, upotrebe lijekova i slično. Unatoč etičkim ograničenjima, i dalje se češće provode *in vivo* istraživanja, no razvojem i usavršavanjem *in vitro* sustava, takav trend se želi promijeniti. Upravo zbog veće mogućnosti kontroliranja procesa i njegove prilagodljivosti, u ovom radu je korišten *in vitro* sustav za ispitivanje utjecaja dodanog prebiotika na sastav mikrobiote čije promjene sastava tijekom procesa su prikazane grafovima u nastavku poglavlja.

#### 4.1. TAKSONOMSKA RAZNOLIKOST MIKROBIOTE

Prva stavka koja se istraživala je bila taksonomska raznolikost mikrobiote uzgajane u bioreaktoru. Ona se prikazuje površinskim dijagramima iz kojih je vidljiva promjena u taksonomskoj zastupljenosti prikazana na razini koljena, razreda, reda, obitelji te roda mikroorganizama. Šifre navedenih razina se nalaze u tabličnim prikazima zajedno s postotkom prisutnosti pojedine bakterijske vrste. Šifra D\_1 označava bakterijsko koljeno, D\_2 razred, D\_3 red, D\_4 porodica te šifra D\_5 označava bakterijski rod.



**Slika 11.** Površinski dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskih koljena u prvom uzgoju i uzorku.



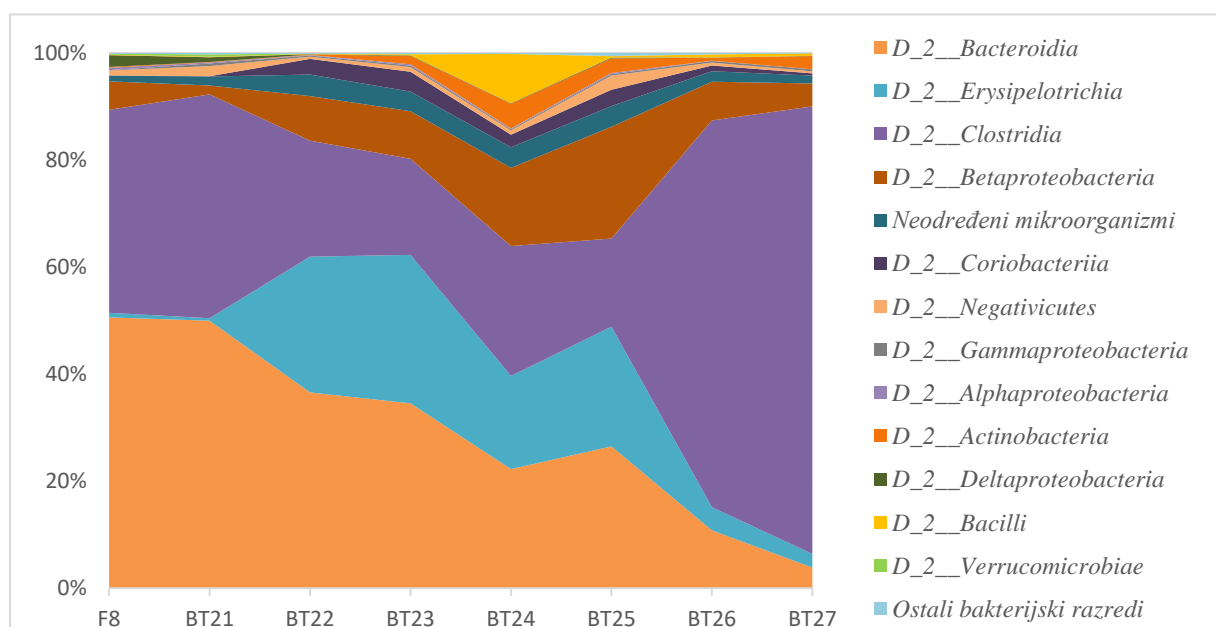
**Slika 12.** Površinski dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskih koljena u drugom uzgoju i uzorku.

Na slici 11 i 12 prikazana je dinamika promjene zastupljenosti bakterijskih koljena u analiziranim uzorcima izuzetima iz bioreaktora tijekom dva uzgoja mikrobiote. Iz slika je vidljivo da je u oba uzgoja najzastupljenije koljeno *Firmicutes* označeno tamno plavom bojom, potom slijedi koljeno *Bacteroidetes* označeno ljubičastom bojom, pa zeleno obojeno koljeno *Actinobacteria* i naposljetku crveno obojeno koljeno *Proteobacteria*. U sastavu mikrobiote iz uzoraka svježeg fecesa označenih sa šiframa F8 i GT2, udjel koljena *Firmicutes* je bio u rasponu od 35,7 - 39,8 %, a koljena *Bacteroidetes* 47,8 - 50,6 % što potkrepljuje već spomenutu činjenicu da su upravo spomenuta koljena najzastupljenija u sastavu crijevne mikrobiote (Dethlefsen i sur., 2014). Njihova zastupljenost se tijekom perioda prilagodbe mikrobiote na uvjete u bioreaktoru, koja je trajala 4 sata (uzorci BT21 i BT31), nije značajno mijenjala. U kasnijim fazama procesa prvog uzgoja, nakon prihrane mikrobiote s hranjivom podlogom u koju je dodan prebiotik Nutriose® FB06, vidljivo je kontinuirano opadanje zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* i porast zastupljenosti koljena *Firmicutes*, dok je u drugom uzgoju također došlo do opadanja zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* uz istovremeno smanjivanje zastupljenosti koljena *Firmicutes* zbog porasta zastupljenosti koljena *Actinobacteria*. Razlog smanjenja prisutnosti bakterija koljena *Bacteroidetes* može se pripisati sastavu hranjive podloge korištene u procesu. SIEM hranjiva podloga ne obiluje mastima i proteinima koji su glavni izvor hranjivih tvari potrebni za rast bakterija koljena *Bacteroidetes*

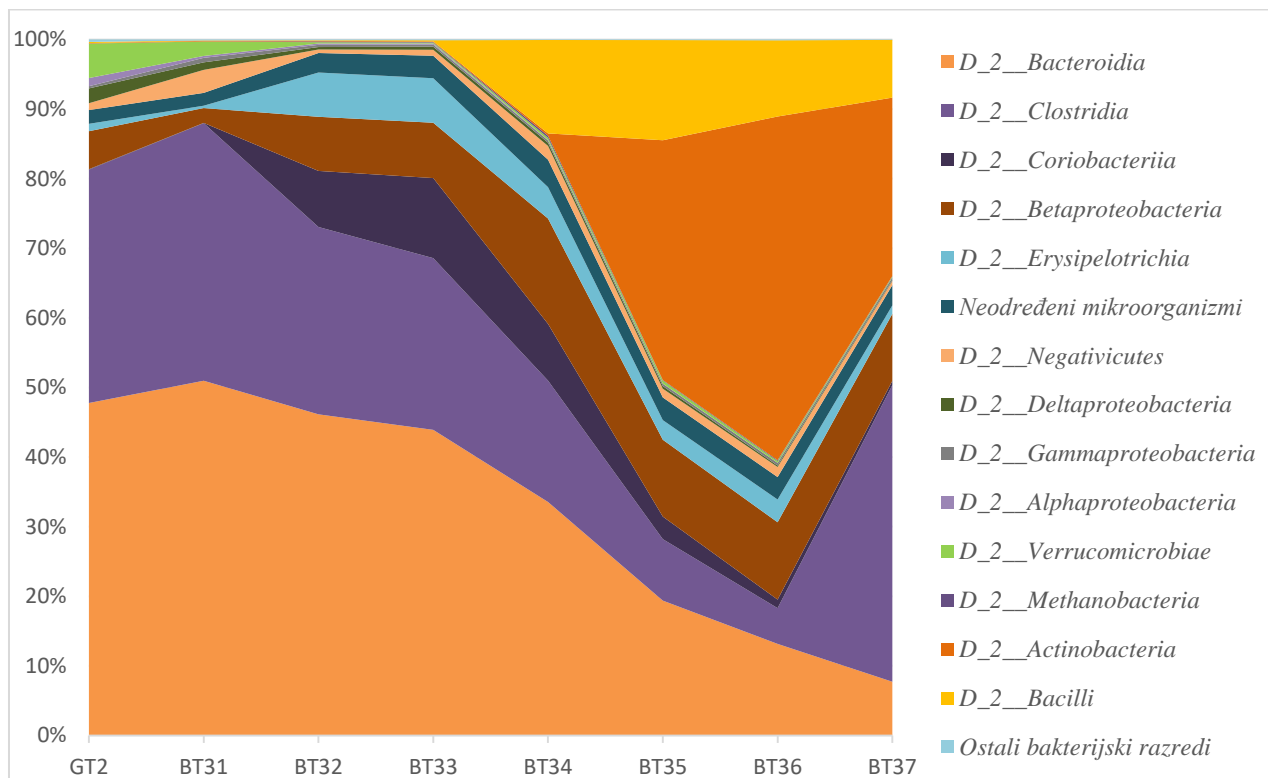


što im je onemogućilo da se prilagode promjenjenim okolišnim uvjetima (DSMZ, 2017). Smanjenje zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* u odnosu na zastupljenosti koljena *Firmicutes* može se povezati i s dodatkom prehrambenih vlakna koji su glavni susprat fermentacijskog procesa bakterija koljena *Firmicutes* (Walker i sur., 2011).

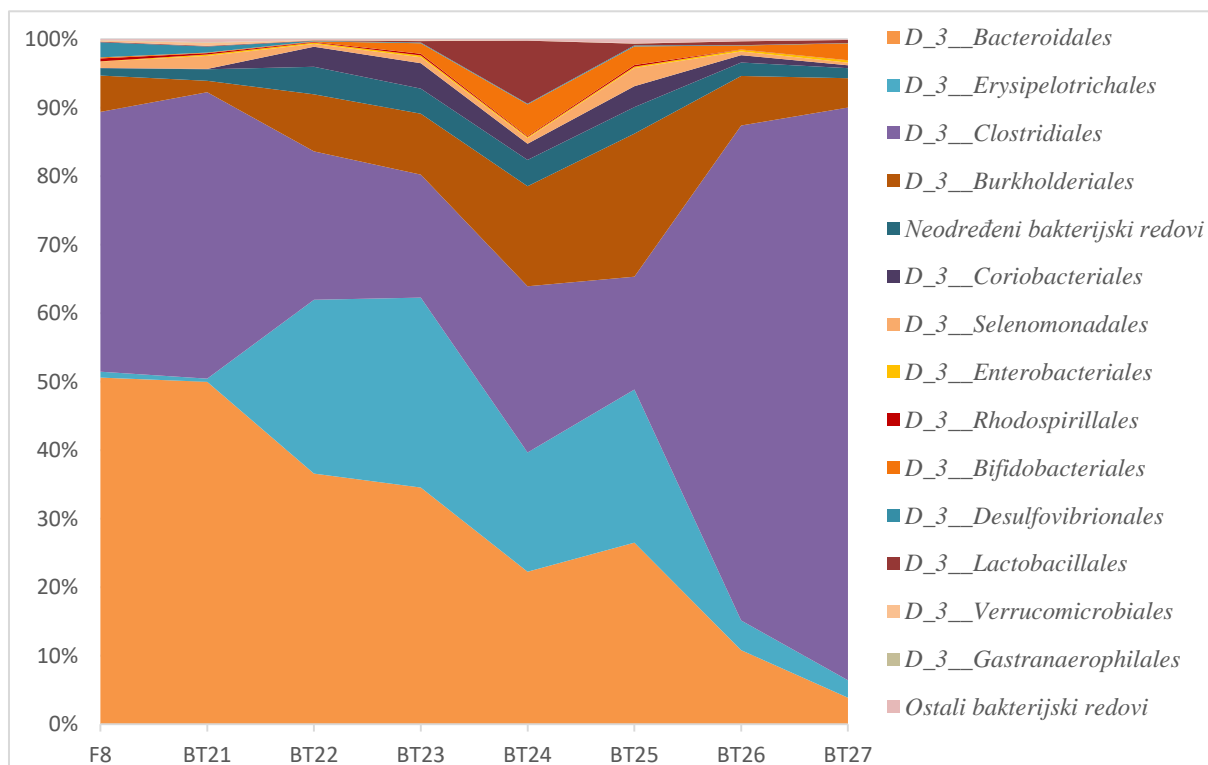
Zastupljenost koljena *Actinobacteria* u drugom uzgoju (uzorci BT34 – BT37) je s 11,6% nakon prvog dana porasla na 37,7 – 50,6% drugog i trećeg dana, s tim da je potkraj procesa njegova zastupljenost opada na 26,2% te opet dolazi do značajnog povećanja koljena *Firmicutes*. Ovaj trend se može objasniti kompetitivnom fermentacijom prehrambenih vlakana između bakterija koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria*. Za razliku od drugog uzgoja, u prvom uzgoju se zastupljenost koljena *Actinobacteria* nije značajno mijenjala te je tijekom cijelog procesa varirala između 1,6 – 7,0%. Još jedna razlika među uzgojima je vidljiva u prisutnosti koljena *Verrucomicrobia* - u drugom uzgoju je koljeno detektirano u uzorku svježeg fecesa GT2 u količini 4,9% nakon čega se njegova zastupljanost smanjila na 2,1% tijekom faze prilagodbe te se u kasnijim fazama uzgoja više ne detektira. Razlika u sastavu crijevne mikrobiote između prvog i drugog uzgoja može biti zbog različite koncentracije dodanog prebiotika u prihrane što je izazvalo veće promjene u sastavu crijevne mikrobiote drugog uzgoja. Mogući razlog može biti različiti sastav crijevne mikrobiote početnog uzorka budući da uzimani feces nije bio homogeniziran.



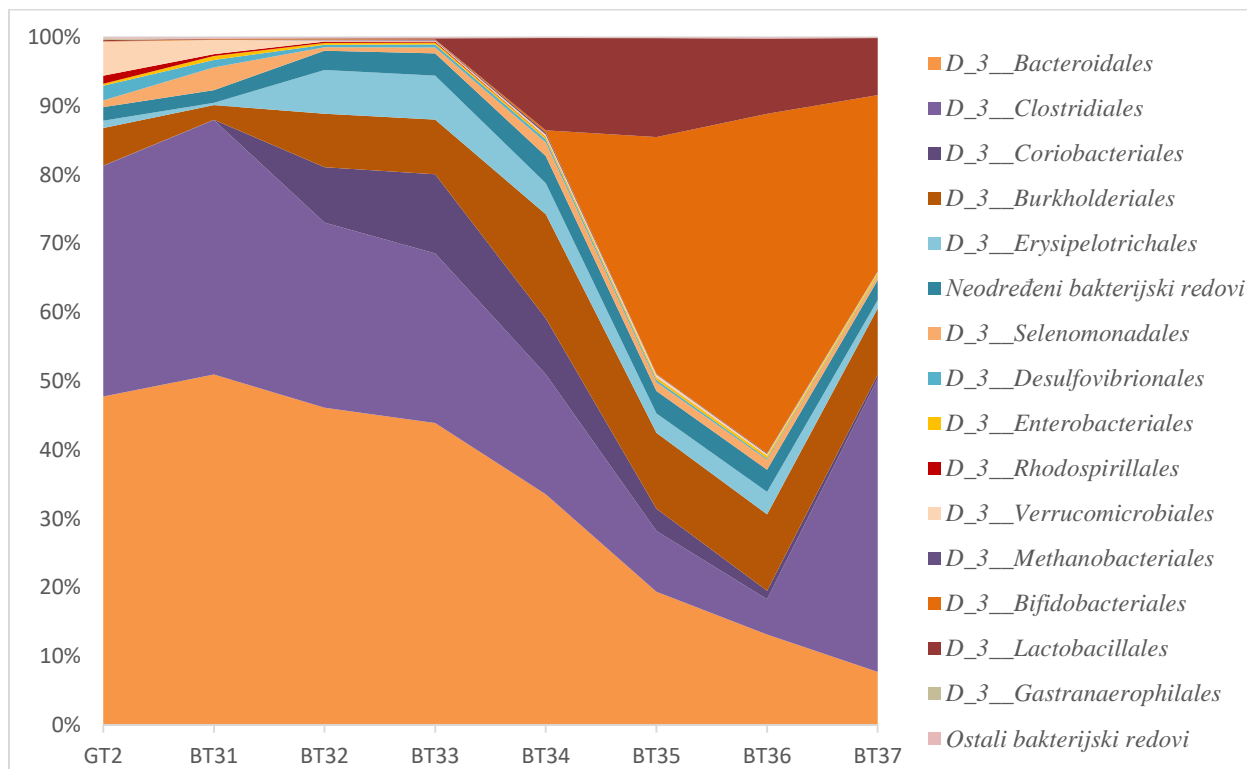
**Slika 13.** Prostorni dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskog razreda u prvom uzgoju i uzorku s legendom najzastupljenijih razreda



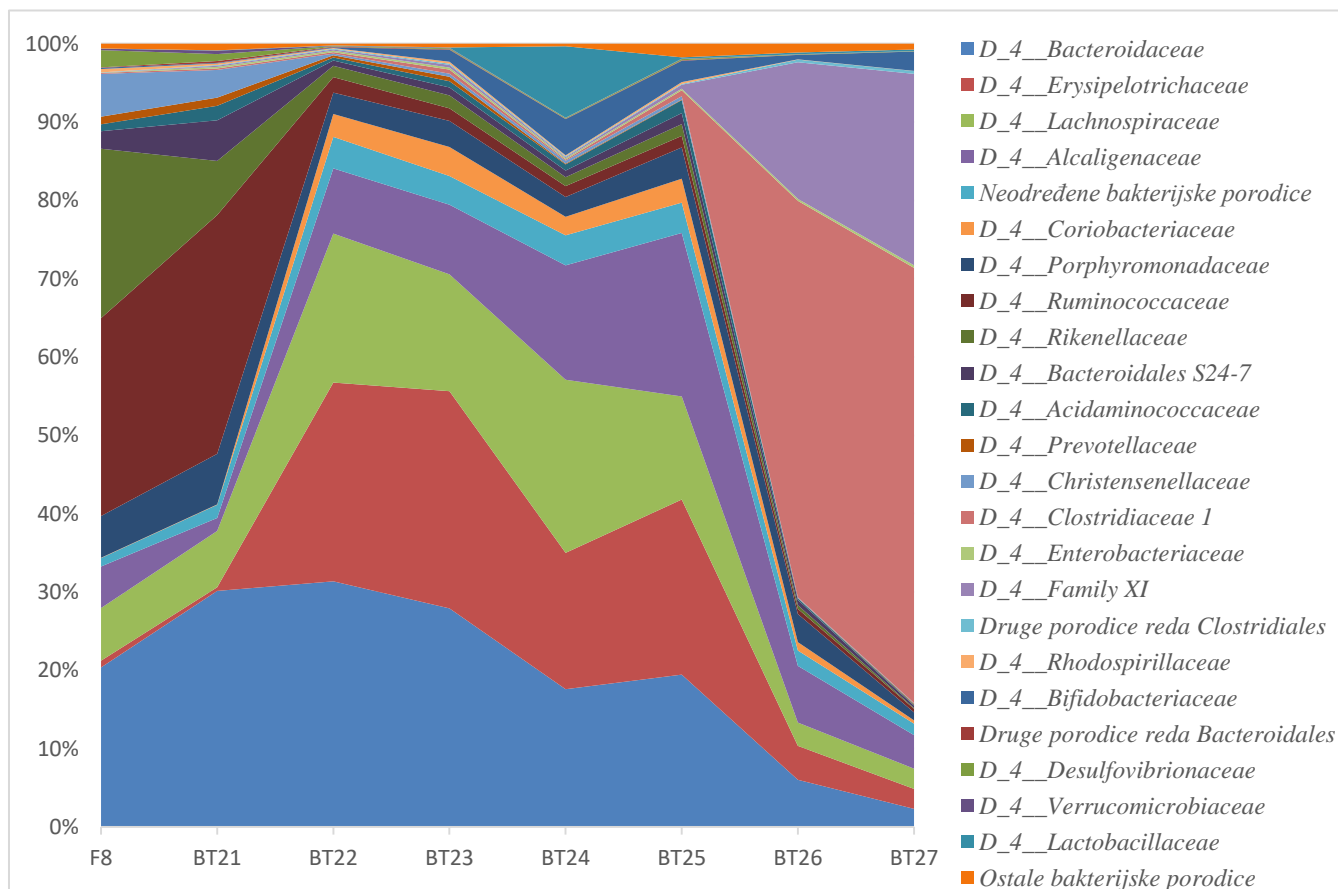
**Slika 14.** Prostorni dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskog razreda u drugom uzgoju i uzorku s legendom najzastupljenijih razreda



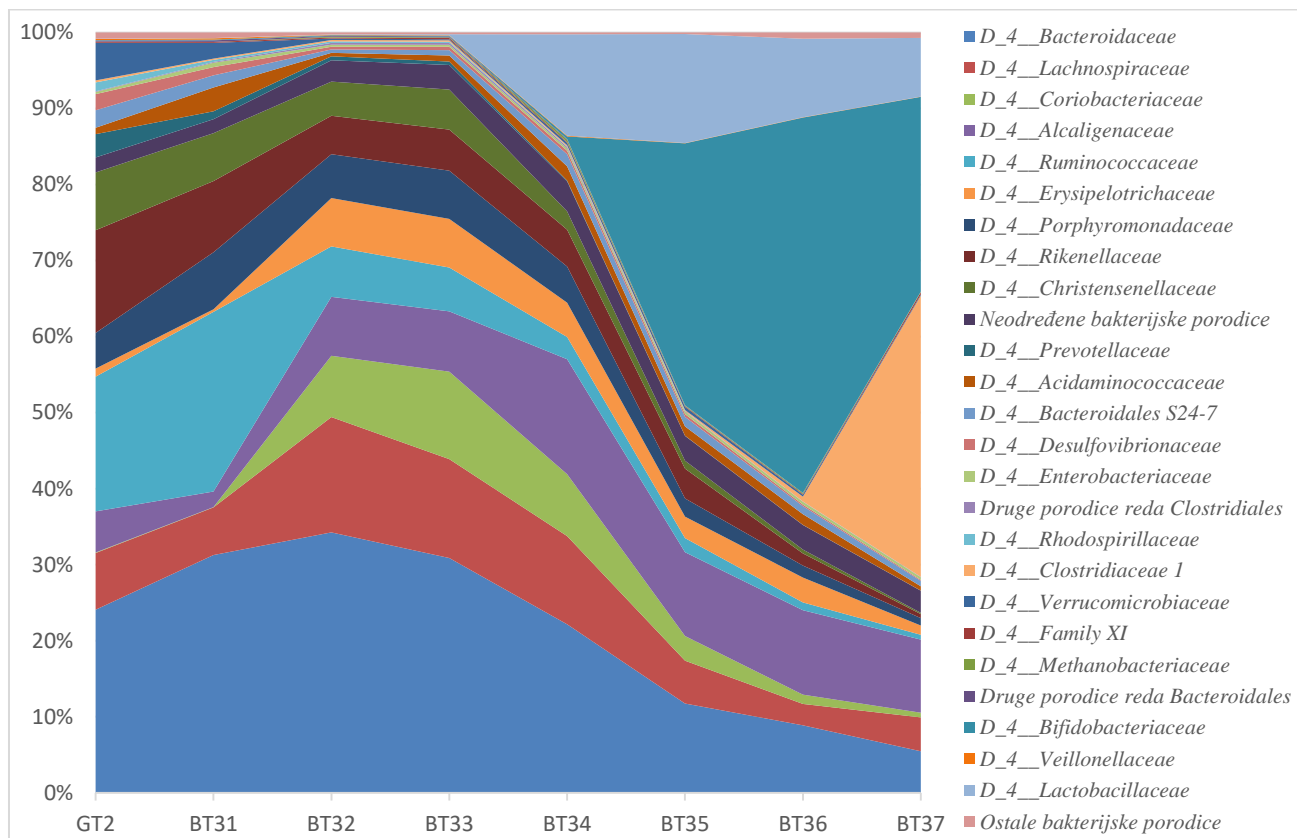
**Slika 15.** Prostorni dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskih redova u prvom uzgoju i uzorku s legendom najzastupljenijih redova



**Slika 16.** Prostorni dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskih redova u drugom uzgoju i uzorku s legendom najzastupljenijih redova



**Slika 17.** Prostorni dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskih porodica u prvom uzgoju i uzorku s legendom najzastupljenijih porodica

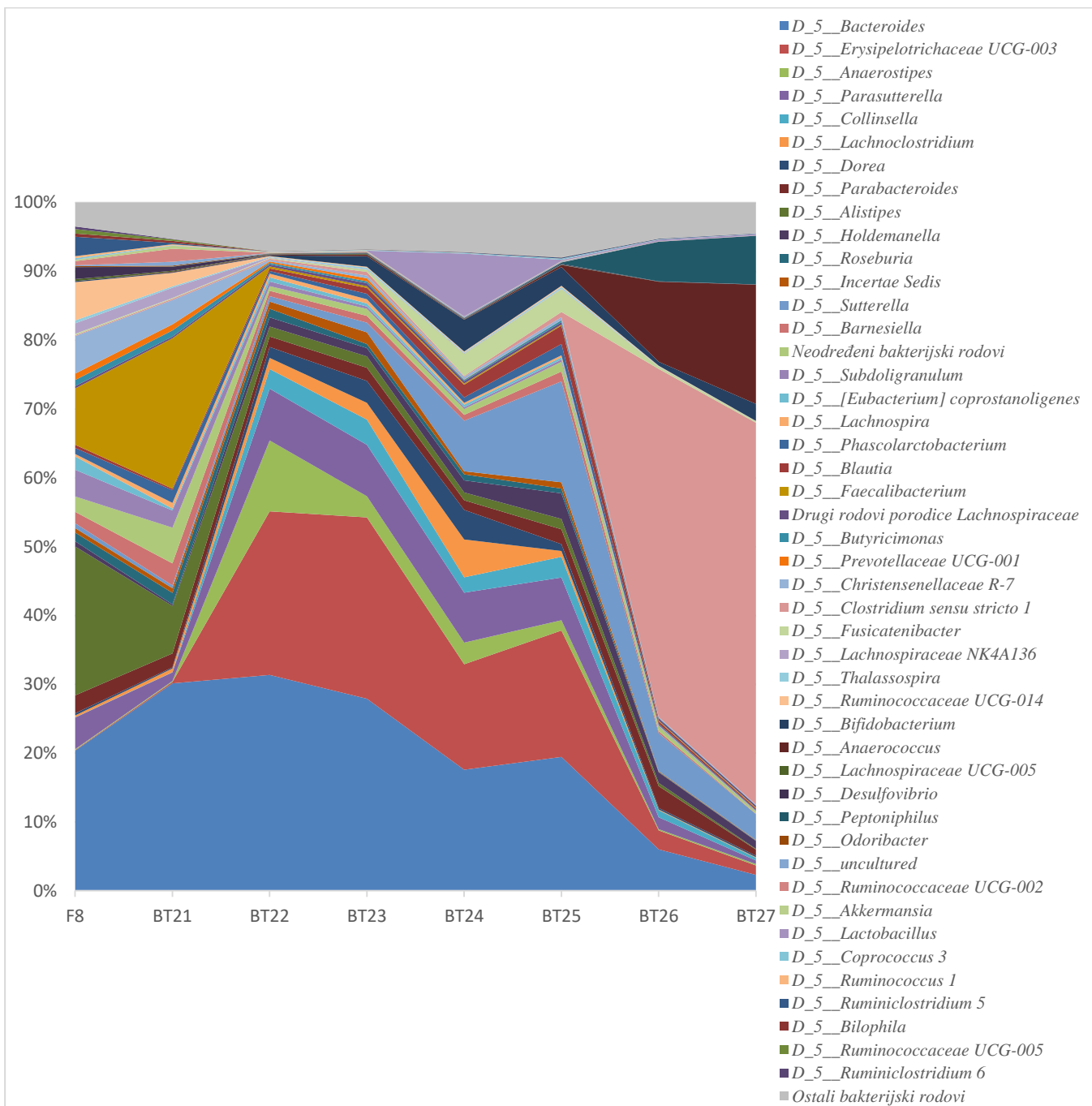


**Slika 18.** Prostorni dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskih porodica u drugom uzgoju i uzorku s legendom najzastupljenijih porodica

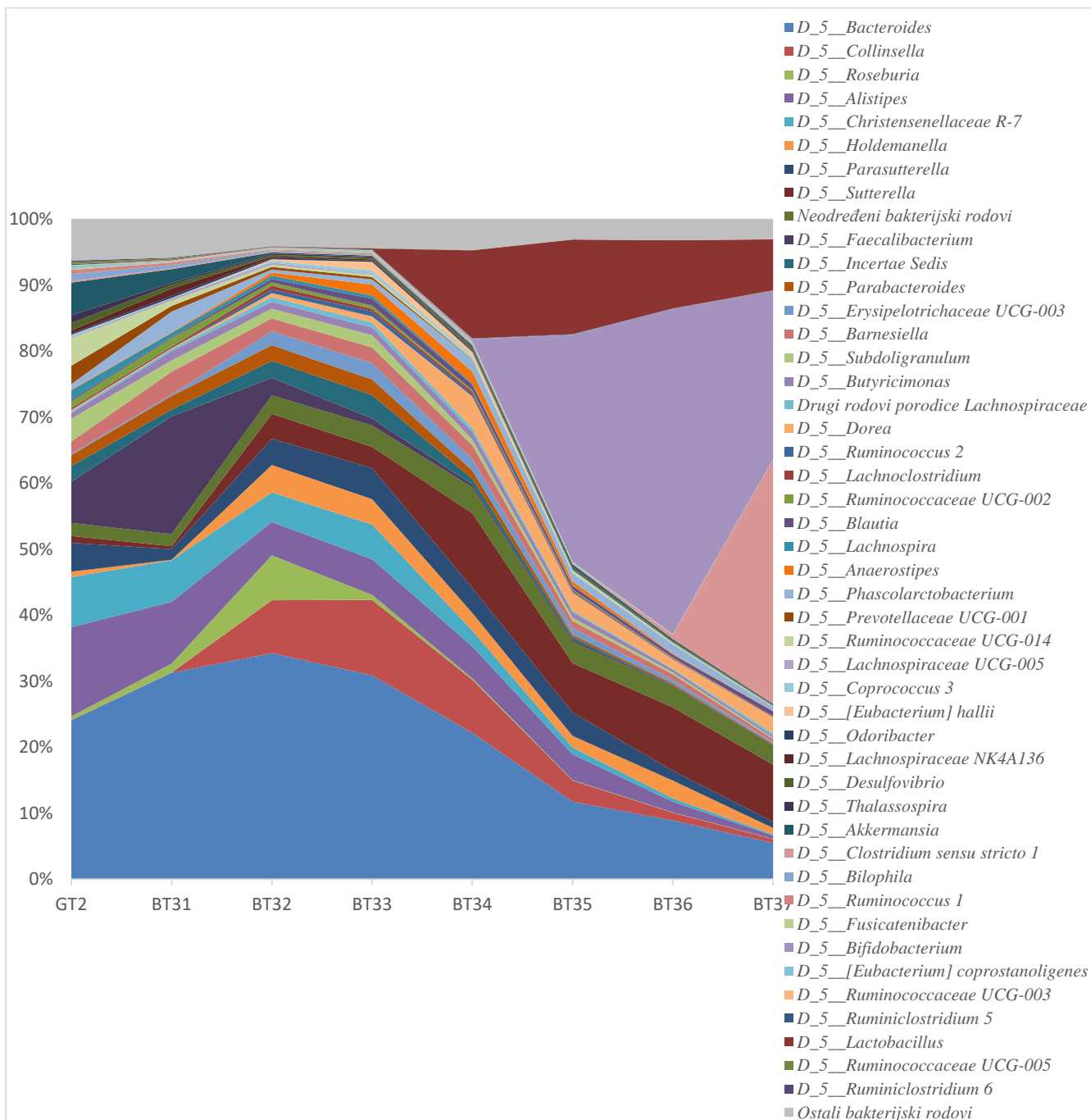
Pregledom taksonomskih podjela od bakterijskog razreda na slikama 13 i 14 pa preko bakterijskog reda na slikama 15 i 16 te naposljetku bakterijske porodice na slikama 17 i 18, vidljiv je i logičan porast složenosti u sastavu analizirane mikrobiote. Sa slika 17 i 18 je vidljivo da su u uzorcima svježeg fecesa najzastupljeniji pripadnici bakterijskih porodica *Bacteroidaceae* s 20,4 – 24,1%, *Rikenellaceae* s 13,5 – 21,6% i *Ruminococcaceae* s 17,7 – 25,3% te su u sličnim količinama prisutni i u uzorku izuzetom iz bioreaktora nakon faze prilagodbe. Dodavanjem hranjive podloge s prebiotikom i mijenjanjem pH vrijednosti shodno dijelu debelog crijeva koji se simulirao u prvom uzgoju dolazi do značajnog smanjenja zastupljenosti porodica *Rikenellaceae* i *Ruminococcaceae*, dok dolazi do porasta zastupljenosti porodice *Bacteroidaceae* koja se postepeno smanjuje tokom trajanja procesa. Ista pojava je vidljiva i u drugom uzgoju, ali je taj trend manje izražen. Bakterije iz porodice *Rikenellaceae* su većinom komenzalne bakterije u debelom crijevu koje prisutne u malim koncentracijama imaju povoljan utjecaj na zdravlje čovjeka. One obitavaju u crijevnoj mikrobioti pretilih osoba s prehranom bogatom mastima te su zato prisutne u početnom uzorku i nestaju do kraja uzgoja (Clarke, i sur., 2013). Također, u početnim danima procesa je vidljiv porast zastupljenosti bakterija iz porodica *Lachnospiraceae* i *Erysipelotrichaceae*, dok u posljednjoj fazi procesa su zastupljeni u vrlo malim količinama. Ovakve promjene u

crijevnoj mikrobioti nastaju zbog karakteristike bakterija porodice *Erysipelotrichaceae* da nastanjuju probavni trakt osoba koje konzumiraju "zapadnjačku" prehranu te da bi se njihov rast održao potrebna je prehrana bogata mastima (Kaakoush, 2015). Bakterije *Lachnospiraceae* sudjeluju u razgradnji prehrambenih vlakana u debelom crijevu što objašnjava povećanje njihove koncentracije nakon uvođenja prihrana, te kada se njihova zastupljenost smanji probavni sustav je podložan povećanom prerastanju bakterija iz reda *Costridiales*, pretežito patogenih bakterija (Segata i sur., 2015; Song i sur., 2013).

U zadnjoj fazi procesa, u prvom uzgoju dolazi do drastičnog porasta zastupljenosti bakterija iz porodica *Clostridiaceae I* i *Porodica XI* iz reda *Clostridiales*. U drugom uzgoju također raste zastupljenost porodice *Clostridiaceae I*, ali ne i *Porodica XI*, već drugog i trećeg dana procesa značajno raste zastupljenost porodice *Bifidobacteriaceae* što se povezuje s dodatkom prebiotika. U drugom uzgoju je prisutnost porodice *Verrucomicrobiaceae* u uzorku svježeg fecesa GT2 i uzorku BT31, koja pripada koljenu *Verrucomicrobia*, a čija prisutnost u prvom uzgoju nije detektirana, razlog tomu može biti uvođenje ne homogeniziranog fecesa u bioreaktor za uzgoj. Zastupljenost porodice *Alcaligenaceae*, pripadnice koljena *Proteobacteria*, nije se značajnije mijenjala tijekom cijelog procesa u oba uzgoja .



**Slika 19.** Površinski dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskih rodova u prvom uzgoju i uzorku s legendom najzastupljenijih rodova.



**Slika 20.** Površinski dijagram koji prikazuje zastupljenost bakterijskih rodova u drugom uzgoju i uzorku s legendom najzastupljenijih rodova.

Intervencija prebiotikom dovela je do značajnih taksonomskih promjena na razini roda u oba uzgoja (slike 19 i 20). Bakterije roda *Bifidobacterium* pripadnice koljena *Actinobacteria* su porasle do 49,3% u zadnjih 36 h procesa nakon uvođenja prihrane u drugom uzgoju (uzorci BT35, BT36, BT37) dok su u prvom uzgoju postignuti slični omjeri rasta ali u manjem postotku. Važno je napomenuti da se u drugom uzgoju pojavio rod *Lactobacillus* s zastupljenošću do 14,34% nakon što je dodana posljednja prihrana. Bakterije roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* su poznate kao probiotičke kulture s pozitivnim utjecajem na

ljudsko zdravlje koji su opisani u poglavlju 2.2.3. Utjecaj prebiotika na zastupljenost probiotičkih bakterija vidljiv je njihovim naglim porastom nakon uvođenja prihrane obogaćene prebiotikom Nutriose® FB06 no očituje se i prema udjelu dodanog prebiotika. U prvom uzgoju dodan je probiotik u koncentraciji od 9,4 g/L što dovodi do puno manjeg porasta bakterija roda *Bifidobacterium* nego u drugom uzgoju gdje je prebiotik dodan u koncentraciji od 15 g/L.

U bakterijskom koljenu *Firmicutes* u uzorcima svježeg fecesa i adaptacijskog perioda najzastupljeniji rod je *Faecalibacterium* - 21.85% u uzorku BT21. 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 se moglo pripisati nedostatku esencijalnih kiselina poput propionske, iso-butirične, n-valerične i iso-valerične kiseline i nedostatku ekstrakta kvasca u prilagođenom mediju za rast bakterija (Heiniken i sur., 2014).

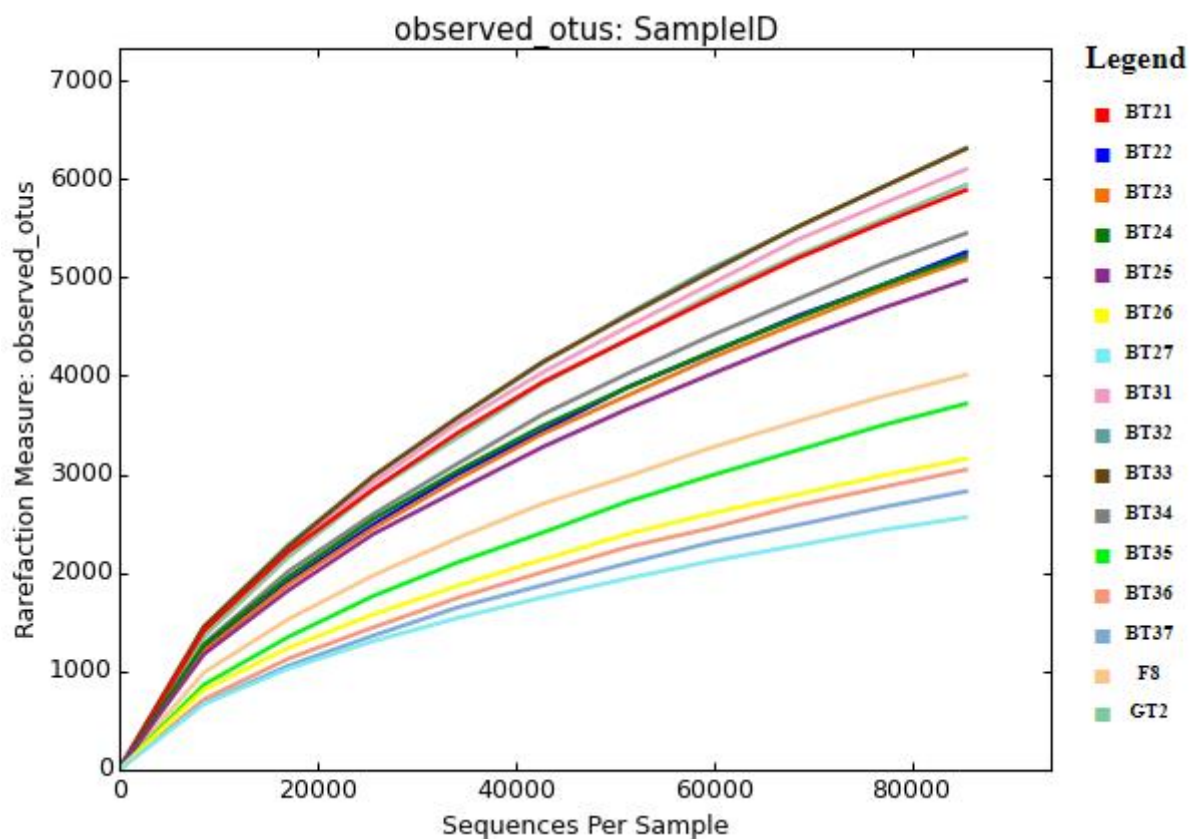
Na razini roda bakterija iz koljena *Firmicutes* u drugom uzgoju nije došlo do povećanja zastupljenosti rodova, izuzevši *Clostridium sensu stricto 1* u BT37, već je vidljiva velika raznolikost rodova unutar crijevne mikrobiote. Dodatak prebiotika u većim koncentracijama može imati utjecaj na održavanje biološke raznolikost crijevne mikrobiote. U procesu prvog uzgoja, od *Firmicutes* koljena u uzorcima nakon adaptacije do treće prihrane (BT22-BT25) prevladava rod *Erysipelotrichaceae UCG-003*, te zatim dolazi do porasta zastupljenosti rodova *Clostridium sensu stricto 1* i *Anaerococcus* dok od koljena *Bacteroidetes* prevladavaju rodovi *Bacteroides* i *Alistipes* u oba uzgoja. Rod *Bacteroides* sačinjavaju vrste bakterija koje imaju sposobnost razgradnje jednostavnih šećera i polisaharida, što može objasniti održavanje njihove prisunosti u prvim polovicama uzgoja (slika 19 i 20) (Conlon i Bird, 2015).

U koljenu *Verrucomicrobia* je najzastupljeniji rod *Akkermansia* s bakterijske vrste koje razgrađuju mucin te ga potom koriste kao izvor ugljika, dušika i energije za vlastiti rast (Derrien i sur., 2008). Nedostatak mucina u korištenoj hranjivoj podlozi objašnjava potpuno smanjivanje roda *Akkermansia* daljnim tijekom procesa.



## 4.2. ALFA RAZNOLIKOST

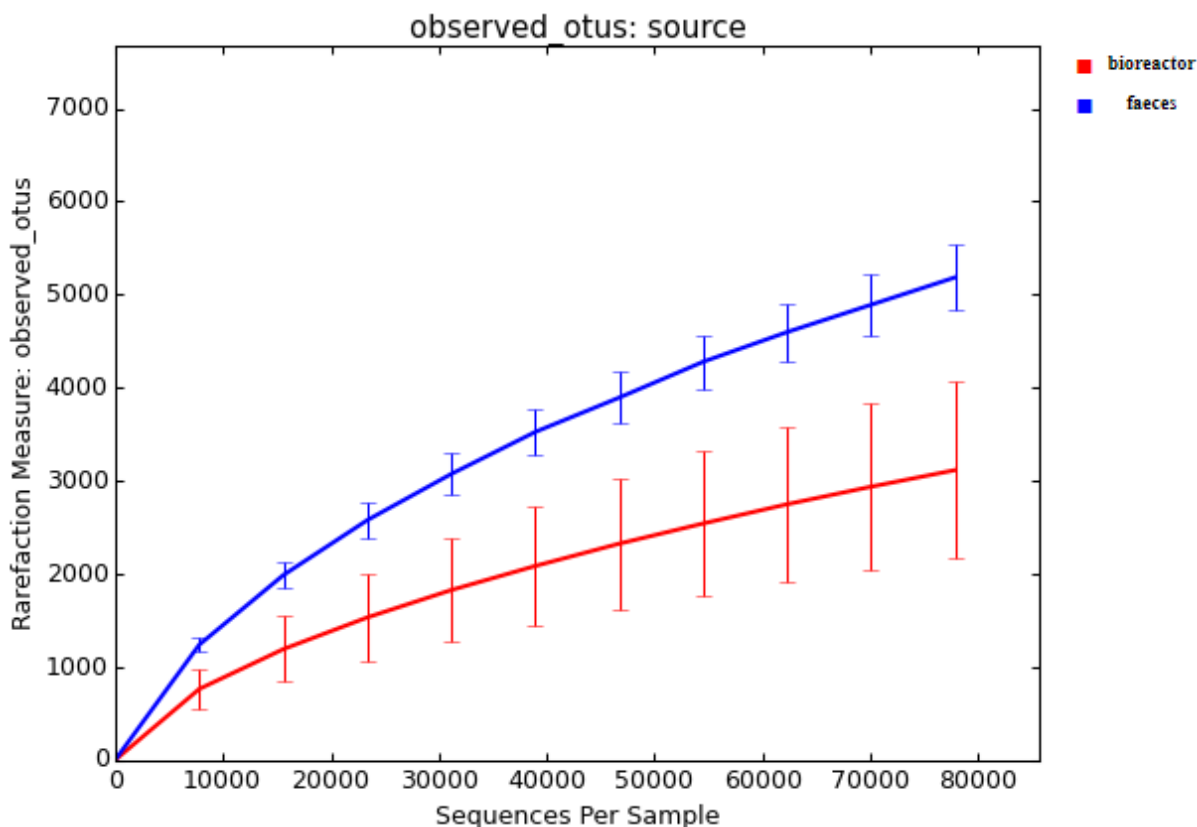
Alfa raznolikost predstavlja raznolikost vrsta u svakom pojedinom uzorku ili staništu te opisuje bogastvo vrsta u jednom uzorku. U određivanju sastava mikrobiote  $\alpha$  – raznolikost služi za utvrđivanje bioraznolikost bakterijskih zajednica, odnosno da bi se utvrdilo da li je dubina sekvencioniranja bila dovoljna za pojedini uzorak. Alfa raznolikost se određuje u QIIME programu na način da se svaki uzorak nasumično poduzorkuje bez zamjenjivanja u različitim intervalima, te se za svaki interval odredi prosječan broj OTU-a i prikaže u odnosu na veličinu poduzorka. Točka u kojoj se broj OTU-a ne povećava s daljnjim uzorkovanjem je točka u kojoj je uzeto dovoljno poduzoraka za preciznu karakterizaciju zajednice. Za prikaz rezultata  $\alpha$  – raznolikost koriste se grafovi s regresijskim krivuljama poput grafova prikazanih na slikama 18. Svaka krivulja prikazuje broj procijenjenih OTU-ova u određenoj vremenskoj točki procesa za oba uzgoja s naznačenom razinom greške.



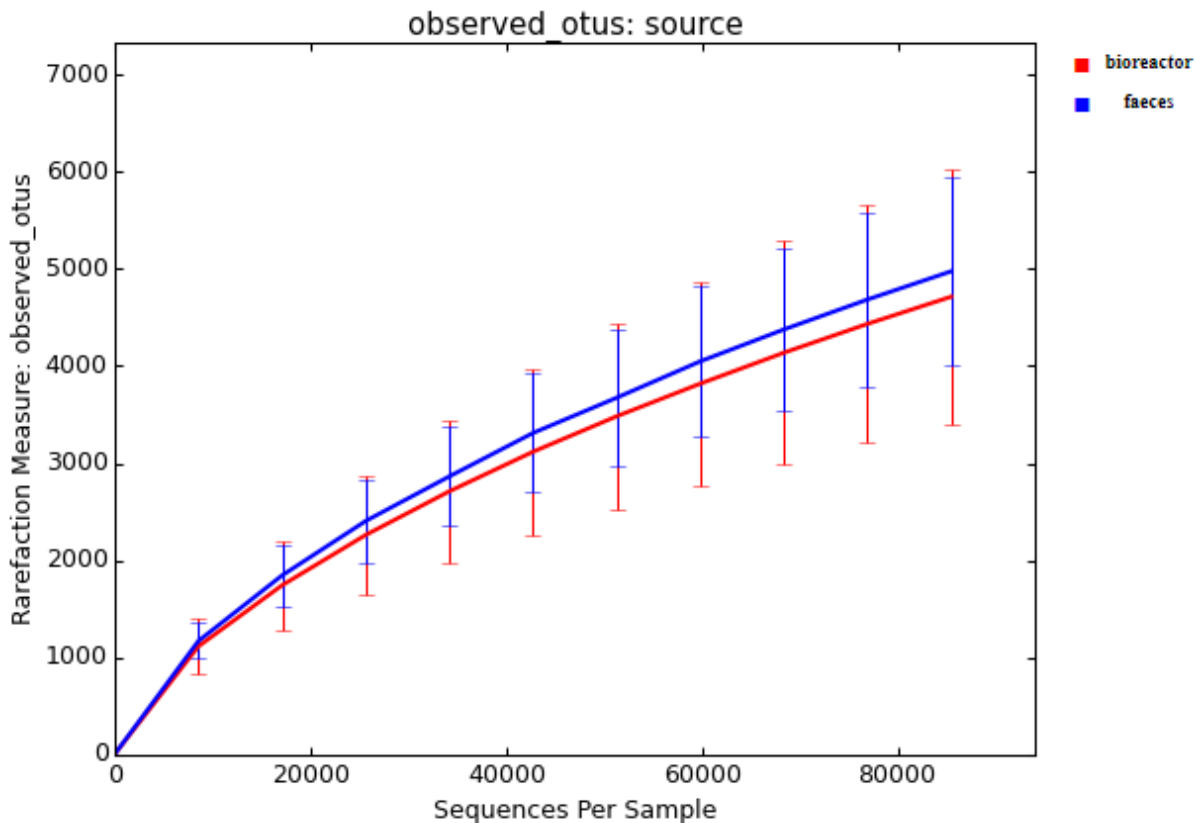
**Slika 21.** Alfa raznolikost dvaju paralelnih uzgoja u ovisnosti procijenjenih OTU-ova i sekvenci po uzorku za svaki pojedini uzorak

Na slici 21 prikazana je  $\alpha$ -raznolikost koristeći observed otus metriku. Na x-osi prikazan je broj sekvenci po uzorku, a na y-osi broj opaženih (određenih) OTU-ova. Iz grafa je vidljivo da najveću alfa raznolikost ima uzorak BT33 koji predstavlja uzorak izuzet iz biorektora

nakon prvog dana, potom ga slijede uzorci adaptacijskog perioda (BT32 i BT21) te uzorak svježeg fecesa drugog uzgoja (GT2). Nakon toga nešto manju raznolikost ima uzorak drugog uzgoja, BT34, uzet nakon druge prihrane. Uzorci BT22, BT23, BT24, BT25 imaju vrlo sličnu raznolikost koja je vidljiva iz preklapanja njihovih krivulja u grafu. Uzorak F8, svježi fecesa prvog uzgoja, sadrži još manji broj bakterijskih vrsta od predhodnih uzoraka. Raznolikost uzoraka smanjuje se redom – BT35, BT26, BT36, BT37, te najmana raznolikost zamijećena kod uzorka BT27 koji predstavlja zadnji dan prvog uzgoja. Oscilacije kao što su mala raznolikost vrsta unutar uzorka F8 te veliko bogatsvo u uzorku BT33 može biti djelomično zbog nasumičnosti postupka sekvencioniranja kojim nisu pokrivena sve sekvence po uzorku. Regresijske krivulje prestaju na 85 500 sekvenci po uzorku, iz razloga što je to bio maksimalni broj sekvenci u jednom od uzoraka. Krivulje nisu postignule izgled hiperbole, odnosno nisu se ustalile što može indicirati na to da rezultati broja vrsta nisu maksimalni. Veći broj sekvenci po uzorku dao bi pouzdanije podatke, odnosno veći broj vrsta u svakom uzorku.



**Slika 22.** Prikaz  $\alpha$  – raznolikosti regresijskim krivuljama u ovisnosti procijenjenih OTU-ova i sekvenci po uzorku za uzorke izuzete iz bioreaktora s normalnom hranjivom podlogom i uzorak svježeg fecesa (Zubčić, 2017).

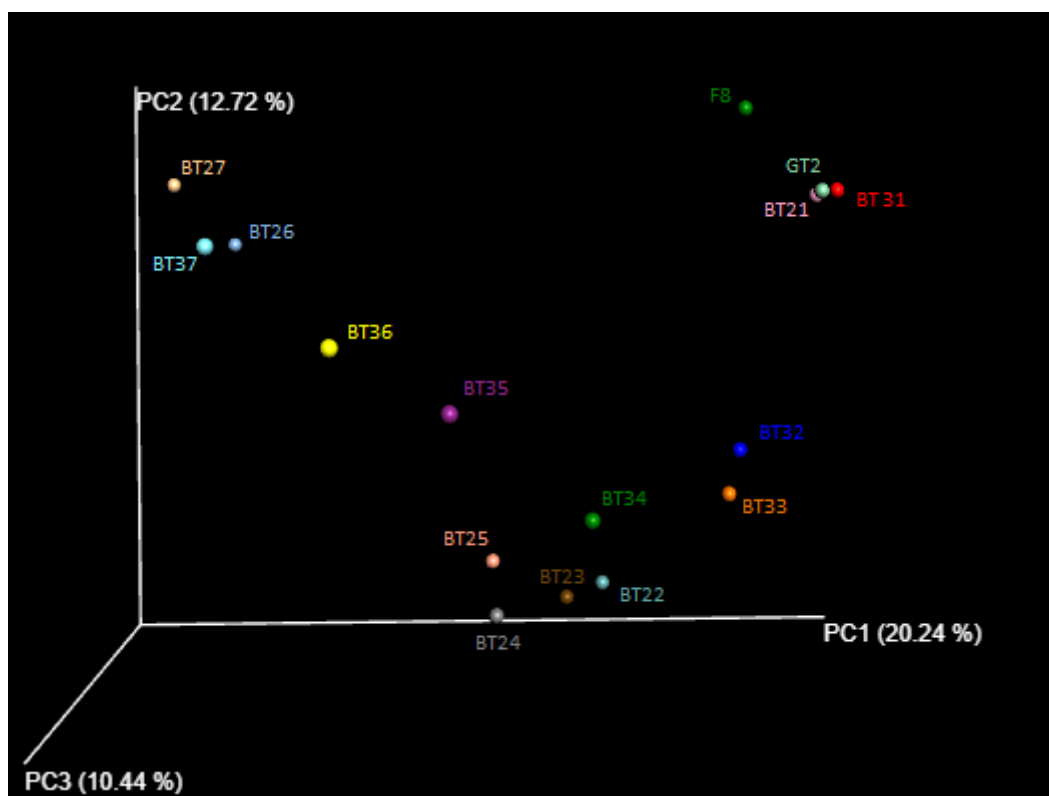


**Slika 23.** Prikaz  $\alpha$  – raznolikosti regresijskim krivuljama u ovisnosti procijenjenih OTU-ova i sekvenci po uzorku, za uzorke izuzete iz bioreaktora s hranjivom podlogom koja sadrži prebiotik i uzorak svježeg fecesa.

Svaka krivulja na slikama 22 i 23 predstavlja određenu kategoriju, plava krivulja prikazuje alfa raznolikost uzoraka svježeg fecesa dok crvena prikazuje uzorke uzete iz bioreaktora tijekom procesa uzgoja mikrobiote. Iz pozicija krivulja u grafu na slici 20 je vidljiva nešto veća alfa raznolikost kod uzoraka svježeg fecesa od uzoraka uzetih iz bioreaktora. Ovakav rezultat je za očekivati budući da već postojeća literatura navodi da tijekom uzgoja mikrobiote u *in vitro* sustavima dolazi do smanjenja bioraznolikosti mikrobiote u sustavu (Maathuis i sur., 2009). Usporedbom slika 22 i 23 može se pretpostaviti da na bioraznolikost ima utjecaj i hranjiva podloga u uzgoju. Na slici 22 pristupa je veća  $\alpha$  – raznolikost u uzorku fecesa nego kod uzoraka izuzetih iz bioreaktora s normalnom hranjivom podlogom, dok je broj bakterijskih vrsta u bioreaktoru s hranjivom podlogom koja sadrži prebiotik vrlo sličan broju bakterijskih vrsta u uzorku fecesa (slika 23). Na temelju toga može se reći da dodatak prebiotika pomaže održavanju raznolikost mikrobiote u bioreaktoru u odnosu na samu hranjivu podlogu.

### 4.3. BETA RAZNOLIKOST

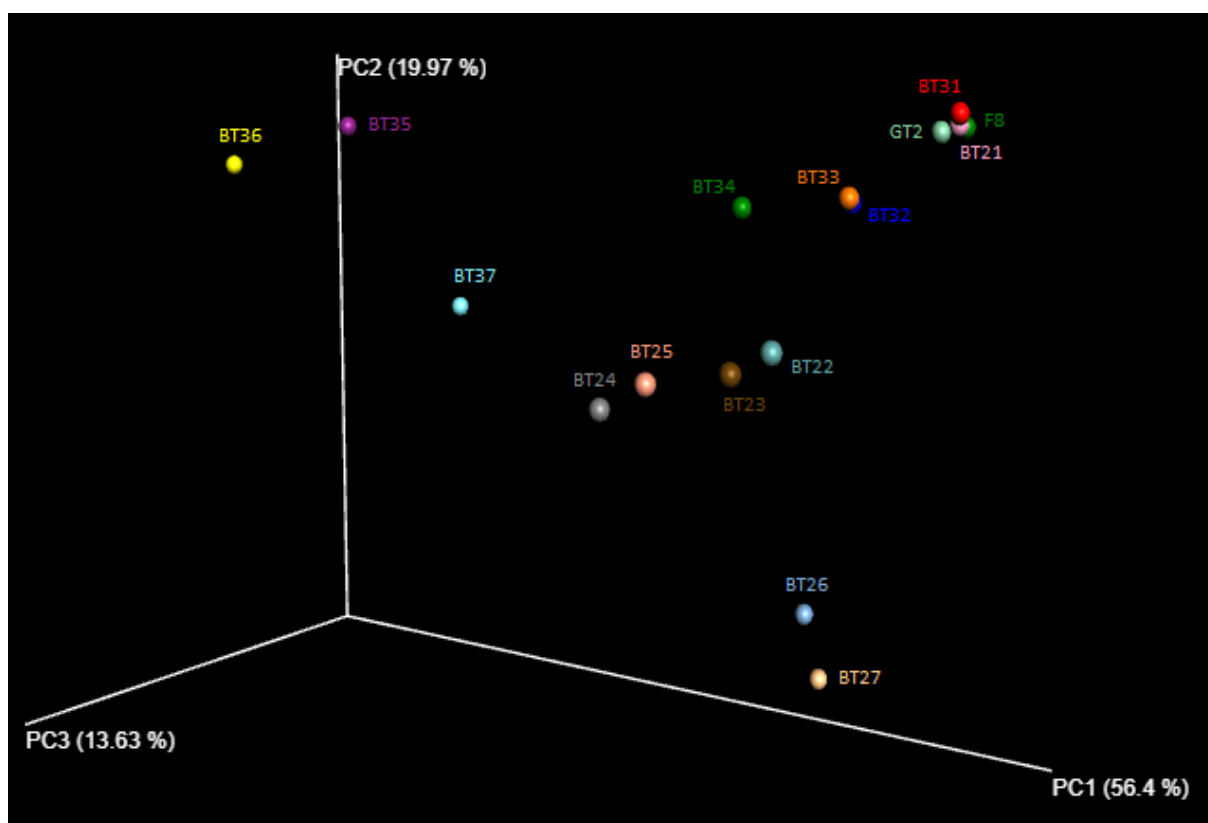
Za razliku od alfa raznolikosti koja predstavlja raznolikost vrsta u svakom pojedinom uzorku, beta raznolikost predstavlja raznolikost između više uzoraka u analizi što potom omogućuje uočavanje sličnosti prisutne crijevne mikrobiote. Za vizualizaciju beta raznolikosti se koristi PCoA (eng. „Principal Coordinates Analysis“), odnosno osnovna koordinatna analiza. PCoA metoda funkcionira na način da smješta uzorke u 3D okvir na temelju udaljenosti među uzorcima koja se određuje UniFrac metrikom. Postoje dvije UniFrac metrike, težinska i netežinska. Razlikuju se po tome što netežinska daje informaciju samo o prisutnosti/odsutnosti taksonomskih grupa u uzorcima dok težinska obuhvaća i prisutnost/odsutnost i zastupljenost taksonomskih grupa. Na slici 24 se nalazi netežinski PCoA prikaz taksonomskih grupa svih uzoraka grupiranih po danima uzgoja, a na slici 25 je težinski PCoA prikaz na kojem su vidljive sličnosti, odnosno različitosti uzoraka na temelju prisutnosti i zastupljenosti mikrobnih vrsta u uzorcima iz oba uzgoja.



**Slika 24.** PCoA prikaz  $\beta$  - raznolikosti netežinskom UniFrac metodom.

Netežinska UniFrac mjera prilagođena je za detektiranje razlike u prisutnosti ili odsutnosti vrsta bakterija u različitim uzorcima. PCoA analiza pokazuje grupiranje uzoraka po vremenskim točkama procesa uzgoja. Beta raznolikost je slična za uzorke adaptacijskog perioda BT31 i BT21, te uzorak fecesa iz drugog uzgoja GT2. Vidljivo je da se prisutnost bakterijskih vrsta mijenja u sličnim obrascima među uzorcima ovisno o vremenskoj točki

procesa. Prema tome prisutne su slične taksonomske grupe u uzorcima nakon prve dvije prihrane u prvom uzgoju, BT22, BT23, BT24, BT25, te u drugom uzgoju BT32, BT33, BT34, BT35. Bakterijske vrste prisutne u navedenim uzorcima se donekle počinju razlikovati od bakterijskih vrsta prisutnih u uzorcima uzetim nakon treće prihrane u oba uzgoja te su ti uzorci sastavom bakterija međusobno puno sličniji što je vidljivo iz njihove male udaljenosti na slici 21. Bliskost sastava uzoraka dvaju uzgoja prema vremenskim točkama potvrđuje reproducibilnost samog procesa *in vitro* kultivacije uz naglašenu individualnu komponentu svakog uzorka, što je potvrđuju dostupna istraživanja (Cordonnier i sur., 2015; Aguirre i sur., 2014). Odstupanja koja su vidljiva kod uzorka F8 mogu biti posljedica greške kod uzorkovanja, provođenja PCR-a te mnogih drugih čimbenika ili zbog same razlike mikrobiote fecesa. No, kao što je već navedeno u poglavlju 4.2 razlog ovih odstupanja može biti i nasumičnost samog postupka sekvencioniranja.



**Slika 25.** PCoA prikaz beta raznolikosti težinskom UniFrac metodom.

Težinska UniFrac mjera prilagođena je za otkrivanje razlika zastupljenosti mikroorganizama, čak i kada skupine organizama prisutne u svakom uzorku ostaju iste. Rezultati se, očekivano, razlikuju od rezultata dobivenih netežinskom mjerom, jer su to dvije metode (kvantitativna i kvalitativna) zasnovane na različitim temeljima te nije za očekivati da se isti u potpunosti podudaraju. U ovom slučaju imamo drugačija grupiranja nego u prethodnom – uzorci su sličniji sastavom unutar uzgoja što se može povezati s taksonomskom raznolikošću na razini

roda. Na slici 19 je vidljivo povećanje zastupljenosti roda *Clostridium sensu stricto 1* u uzorcima BT26 i BT27 prvog uzgoja, dok je u drugom uzgoju došlo do povećanja zastupljenosti bakterijskog roda *Bifidobacterium* u uzorcima BT35 i BT36 što se može povezati s koncentracijom dodanog prebiotika. Relativno iste bakterije vrste su prisutne u oba uzgoja ali dodatkom većih koncentracija prebiotika raste zastupljenost bakterija koje su poželjne i korisne organizmu.

Nakon uspješno provedenog procesa uzgoja mikrobiote debelog crijeva u *in vitro* sustavu uočen je potencijalni utjecaj prebiotika na održavanje bioraznolikosti i povećanje zastupljenosti poželjnih bakterijskih vrsta u crijevima. U budućim istraživanjima kako bi se bolje razjasnila navedena korelacija potrebno je uspostaviti optimalnu hranjivu podlogu s obzirom na pojedina bakterijska koljena, potom definirati sastav crijevne mikrobiote te onda nastaviti daljnja ispitivanja s prebioticima. Potrebno je definirati koncentraciju prebiotika s najznačajnim utjecajem na crijevnu mikrobiotu koja nema negativan utjecaj na domaćina kako bi se dalje mogao proučavati njegov utjecaj na cijeli organizam.

## **5. ZAKLJUČCI**

- 1.) Uzorak svježeg fecesa za inokulaciju potrebno je prethodno homogenizirati u dijalizatu kako bi se dobio što točniji početni sastav crijevne mikrobiote.
- 2.) Zbog gubitka pojedinih mikroorganizama u *in vitro* uvjetima potrebno je dodatno optimiziranje hranjive podloge kako bi se gubici unutar crijevne mikrobiote sveli na minimum.
- 3.) Uzgojem u bioreaktoru dolazi do gubitka pojedinih bakterijskih rodova što je vidljivo iz analiza  $\alpha$ -raznolikosti. Dodatak prebiotika Nutriose® FB06 u hranjivu podlogu za uzgoj crijevne mikrobiote u *in vitro* uvjetima pomaže održavanju raznolikosti mikrobiote te je učinak proporcionalan dodanom prebiotiku.
- 4.) Veća koncentracija prebiotika prisutna u hranjivoj podlozi potiče povećanje zastupljenosti poželjnog bakterijskog roda *Bifidobacterium*.
- 5.) Na osnovu rezultata beta raznolikosti potencijalno je moguća ponovljivost samog procesa *in vitro* kultivacije uzevši u obzir varijacije samog inokuluma.



## **6. LITERATURA**

- 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
- 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**, 7125-7130.
- Cani, P. D., Lecourt, E., Dewulf, E. M., Sohet, F. M., Pachikian, B. D., Naslain, D., De Backer, F., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M. (2009) Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Amer. J Clin. Nutr.* **90**, 1236–1243.
- Chen, J., He, X., Huang, J. (2014) Diet Effects in Gut Microbiome and Obesity. *J. Food Sci.* **79**, 1-10.
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., O’Sullivan, O. R., Ross, P., O’Toole, P. W., Shanahan, F., Cotter, P. D. (2013) Targeting the Microbiota to Address Diet-Induced Obesity: A Time Dependent Challenge. *PLoS One*. **8**, e65790. doi: 10.1371/journal.pone.0065790
- 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.
- Conlon, M. i Bird, A. (2015) The impact of diet and lifestyle on the gut microbiota and human health. *Nutrients* **7**, 17-44.
- 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.
- 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.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B.,

- Dutton, R. J., Turnbaugh, P. J. (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559-563.
- 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.
  - Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M., Relman, D. A. (2006) Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol. Evol.* **21**, 517–523.
  - Devillard, E., McIntosh, F. M., Duncan, S. H., Wallace, R. J. (2007) Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. *J Bacteriol.* **189**, 2566-2570.
  - Dewulf, E. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Possemiers, S., Holle, A. V., Muccioli, G. G., Deldicque, L., Bindels, L. B., Pachikian, B. D., Sohet, F. M. (2011) Inulin-type fructans with prebiotic properties counteract GPR43 overexpression and PPAR $\gamma$  - related adipogenesis in the white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *J Nutr. Biochem.* **22**, 712–722.
  - DSMZ (2017) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, <https://www.dsmz.de>. Pristupljeno 31. kolovoza 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.
  - 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.
  - Heinken, A., Khan, T. M., Paglia, G., Rodionov, D. A., Harmsen, H. J., Thiele, I. (2014) Functional Metabolic Map of *Faecalibacterium prausnitzii*, a Beneficial Human Gut Microbe. *J Bacteriol.* **196**, 3289-3302.
  - Hess, J. R., Birkett, A. M., Thomas, W., Slavin, J. L. (2011) Effects of short-chain fructooligosaccharides on satiety responses in healthy men and women. *Appetite* **56**, 128–134.
  - Hobden, M. R., Martin-Morales, A., Guérin-Deremaux, L., Wils, D., Costabile, A., Walton, G. E., Rowland, I., Kennedy, O. B., Gibson, G. R. (2013) In Vitro Fermentation of NUTRIOSE® FB06, a Wheat Dextrin Soluble Fibre, in a Continuous

Culture Human Colonic Model System. *PLoS One* **8**, e77128.

- 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.
- Honer-Devine, M.C., Carney, K.M., Bohannon, B. J. M. (2003) An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc. R. Soc. London* **271**, 113-122.
- 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.
- Kaakoush, N. O. (2015). Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **5**, 84. doi: 10.3389/fcimb.2015.00084
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Collins, J. J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 423–435. doi:[10.1038/nrmicro2333](https://doi.org/10.1038/nrmicro2333)
- Lan, Y., Kriete, A., Rosen, G. (2013) Selecting age-related functional characteristics in the human gut microbiome. *Microbiome*. **1**, 2-11.
- Lefranc-Millot, C., Guerin-Deremaux, L., Wils, D., Neut, C., Miller, L., Saniez-Degrave, M. (2012) Impact of a Resistant Dextrin on Intestinal Ecology: How Altering the Digestive Ecosystem with NUTRIOSE<sup>®</sup>, a Soluble Fibre with Prebiotic Properties, May Be Beneficial for Health. *J Int. Med. Res.* **40**, 211–224.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022–1023.
- 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.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G. T. (2003) Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 67-72
- Marques, T. M., Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Ryan, C. A., Stanton, C. (2010). Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 149–156.
- 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.

- 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.
- Neyrinck, A. M., Possemiers, S., Verstraete, W., De Backer, F., Cani, P. D. (2012) Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburi spp.*) by chitin–glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *J Nutr. Biochem.* **23**, 51-59.
- Oelschlaeger, T. A. (2010) Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 57–62.
- Ouwehand, A. C., Vaughan, E. E. (2006) *Gastrointestinal Microbiology*, Taylor & Francis Group, New York.
- Parekh, P. J., Arusi, E., Vinik, A. I., Johnson, D. A. (2014) The role and influence of gut microbiota in pathogenesis and management of obesity and metabolic syndrome. *Front. Endocrinol.* **5**, doi: 10.3389/fendo.2014.00047
- 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.
- Roux, S., Enault, F., Bronner, G., Debroyas, D. (2011) Comparison of 16S rRNA and protein-coding genes as molecular markers for assessing microbial diversity (*Bacteria* and *Archaea*) in ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.* **78**, 617-628.
- Rastogi, G., Sani, R.K. (2011) *Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment*. U: *Microbes and Microbial Technology* (Ahmad, I., Ahmad, F., Pichtel, J.), Springer, New York, str. 29-57.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Meheust, A. (2010) Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* **104**, 1-63.
- 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.
- Schroeder, B. O., Bäckhed, F. (2016) Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* **22**, 1079 – 1089. doi: 10.1038/nm.4185

- Segata, N., Kinder-Haake, S., Mannon, P., Lemon, P. L., Waldron, L., Gevers, D., Huttenhower, C., Izard, J. (2015) Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* **13**, 42-50. doi: 10.1186/gb-2012-13-6-r42
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS One* **14**, e1002533.
- Simpson, H. L., Campbell, B.J. (2015) Review article: Dietary fibre-microbiota interactions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **42**, 158–179.
- Song, Y., Garg, S., Girotra, M., Maddox, C., von Rosenvinge, E. C., Dutta, A., Fricke, W. F. (2013). Microbiota Dynamics in Patients Treated with Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *PLoS one*, **8**, e81330. doi: 10.1371/journal.pone.0081330
- Tamburini, S., Shen, N., Wu, H. C., Clemente, J. C. (2016) The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat. Med.* **22**, 713 – 722. doi:10.1038/nm.4142
- Tremaroli, V., Backhed, F., (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**, 242-249.
- User and Maintenance manual for Jupiter 2.0.(2016), Solaris Biotechnology SRL, Porto Mantovano, Italija
- 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., 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.
- Xu, Z., Knight, R. (2014) Dietary effects on human gut microbiome diversity. *Br. J Nutr.* **113**, 1–5.
- Ziesemer, K. A., Mann, A., Sankaranarayanan, K., Schroeder, H., Ozga A. T. Brandt, B. W., Zaura, E., Waters-Rist, A., Hoogland, M., Salazar-García, A., Aldenderfer, M., Speller C., Hendy, J., Weston, D. A., MacDonald, S. J., Thomas, G. H., Collins, M. J., Lewis, C. M., Hofman, C., Warinner, C. (2015) Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification. *Sci. Rep.* **5**, doi:10.1038/srep16498
- Zubčić, M. (2017) Testiranje utjecaja hranjive podloge na sastav crijevne mikrobiote u *in vitro* sustavu. *Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.*
- 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.
- Ward, D. V., Gevers, D. , Giannoukos, G. (2012) Evaluation of 16S rDNA-Based Community Profiling for Human Microbiome Research. *PloS one* **7**.
  - Wilson, B., Whelan, K. (2017) Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **32**, 64–67.
  - Woods, M. N., Gorbach, S. L. (2001) Influences of fibre on the ecology of the intestinal flora. U: Handbook of Dietary Fibre in Human. Nutrition, (ured. Gene A. Spiller), CRC Press, New York, str. 257-270.

## **7. PRILOZI**



**Prilog 1.** Tablica s parametrima proces prvog uzgoja kroz adaptacijski period (plavo), ulazni dio debelog crijeva (crveno), poprečni dio debelog crijeva (zeleno), silazni dio debelog crijeva (plavo) i ponovni feces (narančasto).

	Uzorak 1.	Uzorak 2.	Uzorak 3.	Uzorak 4.	Uzorak 5.	Uzorak 6.	Uzorak 7.	Uzorak 8.	Uzorak 9.	Uzorak 10.	Uzorak 11.
<b>Datum uzimanja uzorka</b>	16.09.	17.10	17.10	17.10	18.09	18.09	18.09	19.09	19.09	19.09	20.09
<b>Vrijeme uzimanja uzorka</b>	22.00h	07.54h	16.01h	22.03h	08.04h	16.05h	22.02h	08.03h	16.00h	21.58h	08.30h
<b>Trajanje uzgoja (od inokulacije)</b>	0h (P1)	10h	18h	24h (P2)	34h	42h	48h (P3)	56h	66h	72h	82h
<b>Volumen uzorka</b>	34 mL	30 mL	30 mL	30 mL	32 mL	33 mL	29 mL	32 mL	31 mL	30 mL	30 mL
<b>Volumen medija prije prihrane</b>	330 mL	~ 600 mL	~ 600 mL	~ 600 mL	~ 590 mL	~ 550 mL	~ 550 mL	~ 900 mL	~ 900 mL	~ 900 mL	~ 850 mL
<b>Volumen oduzet iz biorektora</b>	/	/	/	285 mL	/	/	125 mL	/	/	/	/
<b>Volumen dane prihrane</b>	300 mL	/	/	300 mL	/	/	420 mL	/	/	/	/
<b>Volumen medija nakon prihrane</b>	~ 680 mL	~ 600 mL	~ 600 mL	~ 590 mL	~ 590 mL	~ 550 mL	~ 850 mL	~ 900 mL	~ 900 mL	~ 850 mL	~ 850 mL
<b>Vrijeme davanja prihrane</b>	22.16h - 22.31h (15min)	/	/	22.25h - 22.39h (14 min)	/	/	22.21h - 22.38h (17 min)	/	/	/	/
<b>pH (zadani kod uzimanja uzorka)</b>	5.80	5.80	5.80	5.80	6.20	6.20	6.20	6.80	6.80	6.80	6.80
<b>pH (stvarni kod uzimanja uzorka)</b>	5.82	5.69	5.77	5.80	6.21	6.23	6.00	6.81	6.88	7.21	7.67
<b>T/°C (zadana)</b>	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
<b>T/°C (stvarna)</b>	36,8°	37,1°C	36,8°	37,8°C	36,8°	37,1°C	38,4°C	37°C	37,1°C	36,8°C	37°,1C
<b>ORP (-)</b>	257 mV	569 mV	500 mV	410 mV	598 mV	596 mV	488 mV	635 mV	576 mV	550 mV	641 mV

**Prilog 2.** Tablica s parametrima proces drugog uzgoja kroz adaptacijski period (plavo), ulazni dio debelog crijeva (crveno), poprečni dio debelog crijeva (zeleno), silazni dio debelog crijeva (plavo) i ponovni feces (narančasto).

	Uzorak 1.	Uzorak 2.	Uzorak 3.	Uzorak 4.	Uzorak 5.	Uzorak 6.	Uzorak 7.	Uzorak 8.
<b>Datum uzimanja uzorka</b>	07.02.	08.02	08.02	09.02	09.02	10.02	10.02.	11.02
<b>Vrijeme uzimanja uzorka</b>	22.54h	11.16h	22.55h	10.57h	22.57h	11.01h	22.55h	11.40h
<b>Trajanje uzgoja (od inokulacije)</b>	0h (P1)	12h	24h (P2)	36h	48h (P3)	60h	72h	82h
<b>Volumen uzorka</b>	34 mL	32 mL	30 mL	32 mL	30 mL	32 mL	31 mL	30 mL
<b>Volumen medija prije prihrane</b>	300 mL	~ 600 mL	~ 600 mL	~ 680 mL	~ 630 mL	~ 800 mL	~ 770 mL	~ 720 mL
<b>Volumen oduzet iz biorektora</b>	/	/	300 mL	/	300 mL	/	/	/
<b>Volumen dane prihrane</b>	300 mL	/	350 mL	/	440 mL	/	/	/
<b>Volumen medija nakon prihrane</b>	~ 600 mL	~ 600 mL	~ 650 mL	~ 680 mL	~ 770 mL	~ 800 mL	~ 770 mL	~ 720 mL
<b>Vrijeme davanja prihrane</b>	23.22h - 23.35h (13min)	/	23.14h – 23.35h (21 min)	/	23.15h – 23.28h (23 min)	/	/	/
<b>pH (zadani kod uzimanja uzorka)</b>	5.80	5.80	5.80	6.20	6.20	6.80	6.80	6.80
<b>pH (stvarni kod uzimanja uzorka)</b>	6.41	5.59	5.78	6.19	6.21	6.78	6.80	7.27
<b>T/°C (zadana)</b>	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
<b>T/°C (stvarna)</b>	37,3°	37,3°C	37,1°C	36,8°	37,1°C	36,8°C	37,1°C	37°,1C
<b>ORP (-)</b>	235 mV	557 mV	531 mV	598 mV	475 mV	417 mV	523 mV	588 mV