

# Održivost crijevne mikrobiote u in vitro uvjetima

---

**Malešić, Elena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:587792>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 09.2021.

Elena Malešić

1213/N

**ODRŽIVOST CRIJEVNE  
MIKROBIOTE U *IN VITRO*  
UVJETIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Antonija Starčevića, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Eme Svetličić, mag.ing.

## **ZAHVALA**

Hvala Luciji, Mirni, Barbari i Glembayu što su ovaj Fakultet začinili inteligentnim humorom, višesatnim političkim i društvenim raspravama, ponekim tračevima, korisnim skriptama te pravim životnim vrijednostima i stavovima koje smo dijelili od prvog dana.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

### ODRŽIVOST CRIJEVNE MIKROBIOTE U *IN VITRO* UVJETIMA

*Elena Malešić, 1213/N*

**Sažetak:** Crijevna mikrobiota u posljednje vrijeme sve je više fokus istraživanja te joj se pripisuju brojni pozitivni učinci na zdravlje čovjeka. Osim toga, sve se više povezuje mikrobna populacija donjeg dijela gastrointestinalnog trakta s etiologijom mnogih bolesti poput infekcije *Clostridium difficile*, upalnih bolesti crijeva i pretilosti. U svrhu liječenja takvih patoloških stanja, u novije vrijeme koristi se i fekalna mikrobna transplantacija kao alternativa klasičnim metodama liječenja. S obzirom na njene brojne nedostatke, cilj ovog rada je bio uzgojiti crijevnu mikrobiotu u uvjetima *in vitro* te ju usporediti s onom u nativnom fecesu iz kojeg potječe (inokulumu), kako bi se ustvrdilo je li moguće u takvim uvjetima dobiti stabilnu zajednicu mikroorganizama dovoljno visoke raznolikosti. Alfa i beta raznolikost te taksonomski profil crijevne mikrobiote uzoraka određeni su 16S rRNA sekvenciranjem te obradom podataka u QIIME 2 programu. Prema rezultatima ovog rada, uočena je smanjena bakterijska raznolikost uzoraka fecesa uzgojenih u bioreaktoru te promjena u taksonomskoj zastupljenosti bakterijskih vrsta u usporedbi s inokulumom. Unatoč tome, *in vitro* kultivacija uzoraka fecesa bi mogla poslužiti kao temelj za liječenje fekalnom mikrobnom transplantacijom uz prijeko potrebna dodatna istraživanja.

**Ključne riječi:** *crijevna mikrobiota, in vitro uzgoj, fekalna transplantacija, 16S rRNA sekvenciranje, QIIME 2*

**Rad sadrži:** 51 stranica, 14 slika, 6 tablica, 77 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *izv.prof.dr.sc. Antonio Starčević*

**Pomoć pri izradi:** *Ema Svetličić, mag.ing*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Blaženka Kos*
2. *Izv.prof.dr.sc. Antonio Starčević*
3. *Izv.prof.dr.sc. Jurica Žučko*
4. *Doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc* (zamjena)

**Datum obrane:** 29. rujna 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

### VIABILITY OF INTESTINAL MICROBIOTA DURING *IN VITRO* CULTIVATION

*Elena Malešić, 1213/N*

**Abstract:** The intestinal microbiota has recently become the focus of research and is credited with numerous positive effects on human health. In addition, the microbial population of the lower gastrointestinal tract is increasingly associated with the etiology of various diseases such as *Clostridium difficile* infection, inflammatory bowel disease and obesity. To treat such pathological conditions, fecal microbial transplantation has recently been used as an alternative to already established methods of treatment. Given the numerous shortcomings of fecal transplantation, the aim of this study was to cultivate the intestinal microbiota *in vitro* and compare it with the native feces from which it originates (inoculum) in order to determine whether it is possible to obtain a stable and sufficiently diverse community of microorganisms in such controlled conditions. Alpha and beta diversity as well as the taxonomic profile of the intestinal microbiota of the samples were determined by 16S rRNA sequencing and data processing was performed using the QIIME 2 program. According to the results of this work, a decrease in the bacterial diversity of fecal samples cultivated in the bioreactor and changes in the taxonomic representation of bacterial species compared to the inoculum were observed. Nevertheless, *in vitro* cultivation of fecal samples could serve as a basis for fecal microbial transplantation treatment with additional research required.

**Keywords:** *gut microbiota, in vitro cultivation, fecal transplantation, 16S rRNA sequencing, QIIME 2*

**Thesis contains:** 51 pages, 14 figures, 6 tables, 77 references

**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:** *assoc.prof. Antonio Starčević, PhD*

**Technical support and assistance:** *Ema Svetličić, mag.ing*

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Blaženka, Kos*, Full professor
2. PhD. *Antonio, Starčević*, Associate professor
3. PhD. *Jurica, Žučko*, Associate professor
4. PhD. *Andreja Leboš Pavunc*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 29th September 2021

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. MIKROBIOTA I GASTROINTESTINALNI TRAKT .....	2
2.1.1. Funkcija crijevne mikrobiote .....	2
2.1.2. Raznolikost mikrobiote .....	5
2.1.3. Bolesti povezane disbalansom crijevne mikrobiote (disbioza) .....	7
2.2. METODE PRIPREME UZORKA ZA METAGENOMSKO ISTRAŽIVANJE MIKROBIOTE .....	9
2.2.1. Dizajn eksperimenta .....	9
2.2.2. Priprema fekalnog uzorka .....	9
2.2.3. Biopsijsko uzorkovanje crijevne mikrobiote .....	11
2.2.4. <i>In vitro</i> sustavi za karakterizaciju mikrobiote .....	12
2.3. METODE SEKVENCIRANJA I BIOINFORMATIČKA ANALIZA .....	13
2.3.1. 16S rRNA sekvenciranje .....	13
2.3.2. Sekvenciranje cijelog genoma .....	14
2.3.3. Bioinformatička analiza podataka – QIIME2 .....	14
2.4. FEKALNA TRANSPLANTACIJA .....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	18
3.1. MATERIJALI .....	18
3.1.1. Hranjiva podloga za anaerobni uzgoj u bioreaktoru .....	18
3.1.2. Mikrobna kultura za inokulaciju .....	19
3.1.3. Laboratorijska oprema za pripremu, praćenje procesa i obradu uzoraka .....	19
3.2. METODE .....	22
3.2.1. Priprema hranjive podloge .....	22
3.2.2. Priprema fekalnog transplanta .....	22
3.2.3. Uzgoj u bioreaktoru .....	23
3.2.4. Izolacija DNA iz uzoraka .....	24
3.2.5. Sekvenciranje 16S rRNA marker gena .....	24
3.2.6. Obrada podataka sekvenciranja u QIIME 2 programskom paketu .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	26
4.1. ALFA RAZNOLIKOST .....	27



4.2. BETA RAZNOLIKOST .....	29
4.3. REZULTATI TAKSONOMSKE ZASTUPLJENOSTI MIKROORGANIZAMA U UZORKU .....	31
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>43</b>

## 1. UVOD

Ljudski gastrointestinalni trakt predstavlja jednu od najvećih površina (250 – 400 m<sup>2</sup>) koja služi kao posrednik između domaćina, okolišnih faktora i antigena u organizmu. Pojam crijevne mikrobiote odnosi se na zbroj svih bakterija, arheja i eukariota koloniziranih unutar gastrointestinalnog trakta, formirajući kroz evoluciju s domaćinom kompleksni mutualistički odnos (Backhed, 2005). Dosadašnjim istraživanjima je ustanovljeno da broj bakterijskih stanica u ljudskom organizmu dostiže i 10<sup>14</sup>, što ga čini do 10 puta većim od broja stanica ljudskog tijela. Također, ukupna količina genetičkog materijala mikrobiote tzv. mikrobioma je približno 100 puta veća od količine ljudskog genoma (Maneesh i sur., 2014) zbog čega figurativno možemo reći da humani mikrobiom čini čovjeka više prokariotskim nego eukariotskim organizmom.

Sukladno ovim činjenicama, za očekivati je da je sastav mikrobiote posredno ili neposredno povezan sa zdravstvenim stanjem ljudi. Tako se danas brojne bolesti i razna stanja mogu povezati s profilom crijevnih bakterija i to s naglaskom na populaciju donjeg dijela gastrointestinalnog sustava. Današnji tehnološki napredak kao i razvoj kompleksnih računalnih alata omogućio je interdisciplinarni pristup u proučavanju mikrobiote čovjeka. Jedan od takvih računalnih alata je i QIIME 2, korišten u ovom radu za praćenje *in vitro* uzgoja crijevne mikrobiote u vidu genomičkih analiza koje odražavaju različitosti u sastavu mikrobnih populacija. U novije vrijeme koristi se i fekalna mikrobna transplantacija kao alternativna metoda liječenja kod kroničnih infekcija bakterijama kao što je *C. Difficile*, upalnih bolesti crijeva, ali i pretilosti. Ta metoda ipak nailazi na brojne prepreke, kako etičke, tako i praktične pa bi alternativa bila omogućiti ponovljivu kultivaciju mikrobne populacije u *in vitro* sustavu sa što većom raznolikosti sastava i reprezentativnim vrstama po uzoru na *in vivo* sustave.

Upravo zato je svrha ovog rada ispitati svojstva fecesa uzgajanog u bioreaktoru koji stimulira uvjete prisutne u debelom crijevu kako bi se dobio uvid u dinamiku promjene raznolikosti crijevne mikrobiote tijekom *in vitro* uzgoja u odnosu na nativni uzorak fecesa – inokulum.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MIKROBIOTA I GASTROINTESTINALNI TRAKT

#### 2.1.1. Funkcija crijevne mikrobiote

Povoljni utjecaj mikrobiote u ljudskom zdravlju očituje se u brojnim fiziološkim funkcijama poput jačanja crijevnog integriteta i formiranja crijevnog epitela (Natividad i Verdu, 2013), iskorištenja energije (den Besten i sur., 2013), zaštite protiv patogena (Bäumler i Sperandio, 2016) i regulacije imunološkog sustava domaćina (Gensollen i sur., 2016). Velikim dijelom posljedica je to prisutnosti enzima za razgradnju kompleksnih ugljikohidrata koje posjeduju određene bakterije prisutne u debelom crijevu. Pa tako fermentacijom složenih ugljikohidrata nastaju kratkolančane masne kiseline od kojih su najbitnije propionat, butirat i acetat koje uobičajeno nastaju u omjeru 1:1:3 unutar gastrointestinalnog trakta (Louis i sur., 2014). Spomenute kratkolančane masne kiseline brzo se apsorbiraju unutar epitelnih stanica, a imaju ključnu ulogu u regulaciji staničnih procesa kao što su ekspresija gena, kemotaksija, diferencijacija, proliferacija i apoptoza. Propionat najvećim dijelom proizvode bakterije iz koljena *Bacteroidetes*, dok su za proizvodnju butirata najvećim dijelom zaslužne bakterije iz koljena *Firmicutes* (Morrison i Preston, 2016). Što se tiče učinka na zdravlje domaćina, nastali butirat se povezuje s antiupalnim i antikancerogenim djelovanjem te služi kao važan izvor energije kolonocitima (Corrêa-Oliveira i sur., 2016). Osim toga, kratkolančane masne kiseline reguliraju homeostazu jetrenih lipida i glukoze pa tako propionat može aktivirati glukoneogenezu, a acetat i butirat lipogenezu. Također, važnu ulogu imaju i u regulaciji imunološkog sustava i upalnom odgovoru tako što utječu na proizvodnju citokina stimulirajući nastanak IL-8, odgovornih za održavanje i obnavljanje epitelnog integriteta. Također prepoznat je i učinak kratkolančanih masnih kiselina u regulaciji apetita i energetske bilance čovjeka putem receptorski posredovanih mehanizama (Chambers i sur., 2015).

Još jedna ključna uloga crijevne mikrobiote očituje se u sintezi esencijalnih vitamina koje domaćin sam za sebe ne može proizvesti. Bakterije mliječne kiseline glavni su proizvođači vitamina B<sub>12</sub> čiju sintezu ne mogu provoditi životinje, biljke i gljive (Martens i sur., 2002). Bakterije roda *Bifidobacteria* su zaslužne za proizvodnju folata, povezanog s brojnim metaboličkim procesima poput obnavljanja DNA i njene sinteze (Pompei i sur., 2007). Ostali vitamini koje proizvode crijevne bakterije su: vitamin K, riboflavin, biotin, nikotinska kiselina, pantotenska kiselina, piridoksin i tiamin.

Međutim, ovi mehanizmi se lako mogu narušiti dođe li do promjene u sastavu crijevne mikrobiote tzv. disbioze. Upravo zahvaljujući brojnim novim metodama za otkrivanje i karakterizaciju složenih mikrobni ekosustava moguće je povezati njihov profil s nastankom brojnih crijevnih, ali i izvan-crijevnih bolesti (Chang i Lin, 2016). Kako ne bi došlo do patoloških promjena gastrointestinalnog sustava te kako bi se održala homeostaza organizma, probavni sustav ograničava izlaganje mikrobiote imunološkom sustavu domaćina putem kompleksne i dinamične crijevne barijere. Tu barijeru čini nekoliko integriranih komponenti uključujući fizičke (epitelni i slojevi mukusa), biokemijske (enzimi i antimikrobni proteini) te imunološke (IgA i imunološke stanice epitela) faktore (Hooper i Macpherson, 2010).

Raznolikost mikrobiote tj. njezin sastav ovisi prvenstveno o samom domaćinu, ali i okolišnim čimbenicima pa je tako dosadašnjim istraživanjima dokazano da prehrana ima jedan od bitnijih utjecaja (Donaldson i sur., 2016). Tako je npr. primijećena vrlo velika razlika u sastavu crijevne mikrobiote između pojedinaca čija se prehrana temeljila većinski na hrani životinjskog podrijetla i onih biljnog podrijetla. Prehrana biljnog podrijetla, posebice konzumacija rezistentnog škroba i neškrobnih polisaharidnih vlakana dovodi do veće bioraznolikosti mikrobiote (David i sur., 2013). Za usporedbu, studija De Filippa i sur. (2010) pokazuje kako se kod afričke dojenčadi u čijoj su prehrani dominirali škrob, vlakna i biljni polisaharidi pronađeni rodovi bakterija *Actinobacteria* i *Bacteroidetes* u zastupljenosti 10,1 % i 57,7 %, dok je taj udio kod europske djece čija se prehrana bazirala najviše na šećerima, škrobu i životinjskim proteinima, smanjen i iznosi 6,7 % i 22,4 %. I konzumacija polifenola kao i vlakana potiče rast dobrih bakterijskih vrsta koje su zaslužne za proizvodnju kratkolančanih masnih kiselina te suzbija rast bakterija koje proizvode lipopolisaharidne endotoksine (*E. Coli*, *Enterobacter cloacae* itd.) (Moreno-Indias i sur., 2016). Zanimljiva je i činjenica da umjetni zaslađivači, mnogo niže kalorijske vrijednosti od običnih šećera, iako imaju GRAS ("generally recognised as safe") status, imaju negativan utjecaj na mikrobiotu. Pa tako, na životinjskim modelima konzumacija sukraloze značajno smanjuje udio rodova *Bacteroides*, *Clostridia* i aerobnih bakterija te povećava pH fecesa (Abou-Donia i sur., 2008), a potiče i ekspresiju bakterijskih proupalnih gena (Bian i sur., 2017). Također, konzumacija sveprisutnih emulgatora iz hrane smanjuje udio korisnih bakterijskih vrsta, a podržava rast proupalnih (Chassaing i sur., 2015).

Na raznolikost mikrobne populacije isto tako utječe pojavnost mutacija i horizontalnog prijenosa gena, ali primijećeno je i sintrofičko ponašanje pojedinih bakterijskih vrsta prilikom kojeg produkt fermentacije jedne bakterijske vrste služi kao hranidbeni supstrat drugoj bakterijskoj vrsti čiji metabolički ishod ima povoljan utjecaj na zdravlje domaćina. Pa tako

npr. acetat koji nastaje kao posljedica fermentacije rezistentnog škroba od strane *R. bromii* ili laktat koji nastaje metabolizmom bakterija mliječne kiseline služi kao supstrat drugim bakterijama (*Eubacterium helii*) koje ga provode u butirat, kratkolančanu masnu kiselinu s brojnim pozitivnim učincima na zdravlje domaćina (Louis i sur., 2007).

Također, prisutnost sulfatnih spojeva u debelom crijevu, bilo u obliku sulfata i sulfita ili u obliku aminokiselina iz hrane, mogu potaknuti proliferaciju specifičnih bakterijskih vrsta koje su karakteristične kod osoba oboljelih od upalnih bolesti crijeva, iritabilnog sindroma crijeva ili pak karcinoma debelog crijeva (Carbonero i sur., 2012). Osim sulfatnih spojeva, bitnu ulogu imaju i žučne soli u tankom i debelom crijevu koje potiču germinaciju bakterijskih spora i na taj način mogu obnoviti mikrobiotu nakon disbioze uzrokovane antibioticima ili toksinima, dok njihova smanjena koncentracija u crijevu može pogodovati razvoju proupalnih bakterijskih vrsta (Kakiyama i sur., 2013).

Osim prehrane, bitnu ulogu u oblikovanju crijevne mikrobiote ima i imunološki sustav domaćina koji smanjuje vjerojatnost nastanka patološkog ishoda u vezi izloženosti bakterija tkivu domaćina, tako što se smanjuje direktni kontakt crijevnih bakterija s epitelnim stanicama i komponentama samog imunološkog sustava (Hooper i sur., 2012). Jedan od takvih mehanizama provode i Panethove stanice smještene u epitelu, izlučujući antimikrobne proteine (angiogenin 4,  $\alpha$ -defenzini, lizozimi, histatini itd.) koji mogu ubiti bakterijsku stanicu u direktnoj interakciji tako što dolazi do enzimske razgradnje njene stanične stijenke ili membrane. Smanjena ekspresija mukoznih  $\alpha$ -defenzina primijećena je kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti ilijačnog dijela (Wehkamp, 2004). Još jedna bitna komponenta imunološkog sustava je i sekretorni IgA (SigA) koji se nalazi u vanjskom sloju mukusa i odgovoran je za sprječavanje prolaska bakterija prema površini epitelnih stanica tako što posreduje u sprječavanju stvaranja njihova biofilma vežući se za IgA receptore na površini bakterijske stanice (Rogier i sur., 2014).

Okolišni faktori koji sudjeluju u oblikovanju mikrobiote uključuju geografsku lokaciju, stil života, tjelesnu aktivnost, operacije, pušenje, depresiju, ali i korištenje lijekova. Najveći utjecaj svakako imaju antibiotici koji mijenjaju fiziologiju i ekspresiju gena aktivne crijevne mikrobiote (Maurice i sur., 2013). Terapija antibioticima dramatično mijenja mikrobnu ravnotežu kratkoročno, ali i dugoročno, za posljedicu imajući smanjenu raznolikost mikrobne zajednice. Također, lijekovi poput osmotskih laksativa, progesterona i TNF -alfa inhibitora mogu promijeniti mikrobiološki sastav čak i do 10 % (Falony i sur., 2016).

### 2.1.2. Raznolikost mikrobiote

Human Microbiome Project oformljen od strane NIH (The United States National Institutes of Health) i Meta HIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) oformljen od strane Europske komisije, omogućili su nam najobuhvatnije i najnovije podatke o profilu mikrobne zajednice povezane s ljudskim organizmom. Ovim studijama identificirano je 2172 vrste izolirane iz ljudskog tijela te klasificirano u 12 koljena od kojih čak 93,5 % pripada upravo koljenu *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* te *Bacteroidetes*. Pronađeno je i da su čak 386 vrsta prisutnih u ljudskom organizmu striktni anaerobi pa ih se najčešće može naći u mukoznim regijama poput oralne šupljine ili gastrointestinalnog trakta (Hugon i sur., 2015).

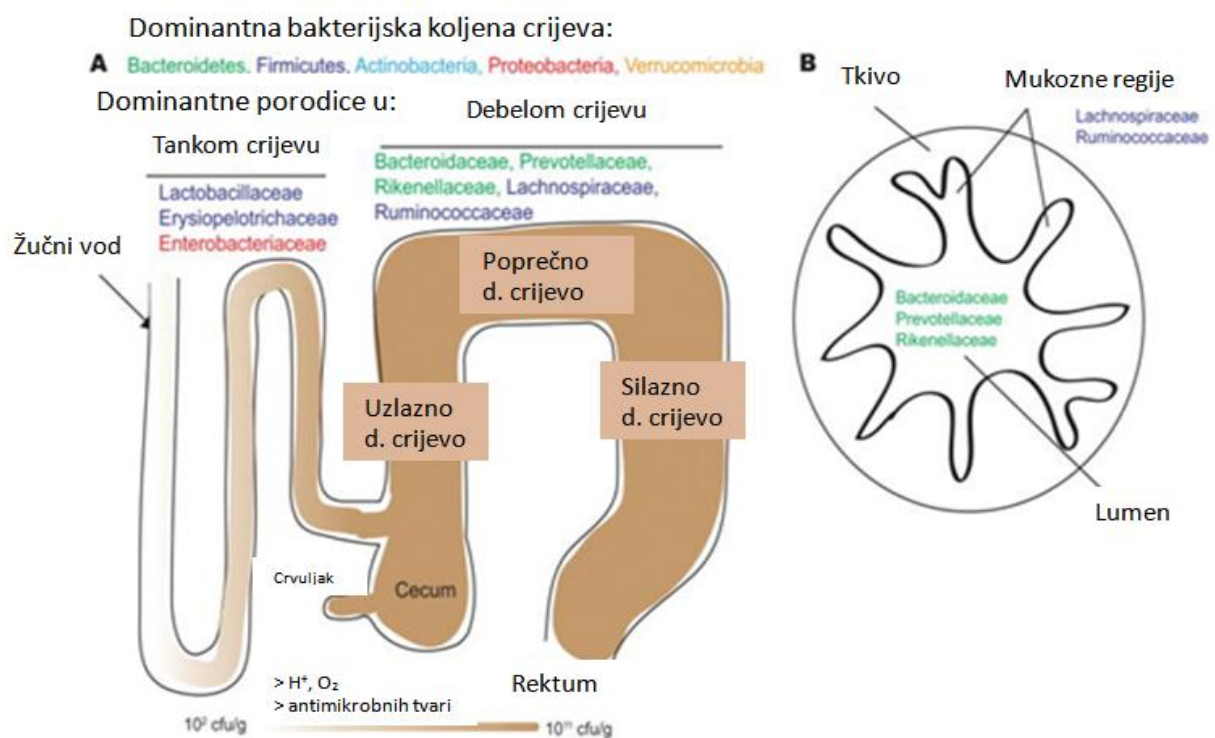
Iako je utvrđeno da mikrobni ekosustavi nastanjuju cijeli gastrointestinalni sustav, u značajno većem broju nastanjuju donji dio probavnog trakta u usporedbi s gornjim. Pa je tako u usnoj šupljini uobičajena tvorba bakterijskih biofilmova, a za želudac se dugo mislilo da je sterilan zbog nepristupačnih uvjeta (niski pH) dok nije otkrivena bakterija *Helicobacter pylori*, ali i druge bakterijske vrste.

Do trenutka rođenja, crijevo novorođenčeta je potpuno sterilno, dok se pri rođenju prolaskom kroz porođajni kanal automatski kolonizira majčinim i okolišnim bakterijama te se kompleksnost tako kolonizirane mikrobiote povećava do trenutka prijelaza dojenčadi na krutu hranu (Reinhardt i sur., 2009).

Gustoća i sastav mikrobiote unutar gastrointestinalnog trakta ovisi o mnogim čimbenicima kao što su kemijski i imunološki gradijenti unutar samog sustava te stoga bakterijska gustoća želuca iznosi  $<10^4$  bakterija  $g^{-1}$ , tankog crijeva  $10^4$ - $10^8$  bakterija  $g^{-1}$ , a debelog crijeva  $10^{11}$ - $10^{12}$  bakterija  $g^{-1}$ . Nadalje, tanko crijevo uobičajeno ima veću razinu kiselina, kisika i antimikrobnih sredstava, kao i kraće vrijeme zadržavanja probavljene hrane. Ovakve karakteristike svakako sprječavaju bakterijski rast te u takvim uvjetima jedino opstaju brzo rastući fakultativni anaerobi sa sposobnošću prianjanja na epitel odnosno sluz. Nasuprot tome, debelo crijevo pruža uvjete koji pogoduju gustom i raznolikoj bakterijskoj zajednici, ponajviše anaerobima koji imaju sposobnost iskorištenja kompleksnih ugljikohidrata koji se u tankom crijevu ne mogu probaviti. Isto tako, članovi mikrobne zajednice tankog crijeva kao glavni supstrat metaboliziraju jednostavne šećere (Zoetendal i sur., 2012), dok mikrobna zajednica debelog crijeva ovisi ponajviše o dostupnosti kompleksnih ugljikohidrata pronađenih u prehrambenim vlaknima.

U debelom crijevu prevladavaju porodice *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae* i *Rikenellaceae* (Donaldson i sur., 2016). Kao što se sastav mikrobiote i njezina gustoća razlikuje između gastrointestinalnih organa, razlikuje se i unutar istog organa pa je tako npr. unutar kolona

prisutnost koljena *Bacteroidetes* mnogo veća u uzorcima fecesa/lumena nego u mukoznom djelu kolona (Eckburg i sur., 2005), dok obrnuto vrijedi za koljeno *Firmicutes* (Van den Abbeele i sur., 2013) (slika 1). Naime, crijevni mukus ili sluz proizveden iz vrčastih stanica osigurava mikrobioti izvor ugljikohidrata *N*-acetilgalaktozamina, galaktoze i *N*-acetilglukozamina i prisutan je duž cijelog probavnog sustava, a najviše u debelom crijevu gdje je prisutan u dva sloja od kojih je vanjski sloj dostupan penetraciji bakterija. U slučaju nedostatka kompleksnih ugljikohidrata i prehrambenih vlakana kao hranidbenog supstrata, bakterije mogu početi razgrađivati mukus što može dovesti do pokretanja upalnih reakcija imunološkog sustava radi lakšeg pristupa patogenih mikroorganizama (Johansson i sur., 2011).



**Slika 1.** Mikrobna staništa u ljudskom donjem gastrointestinalnom traktu. A) Dominantna bakterijska koljena u crijevu su *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* i *Verrucomicrobia*. S obzirom na fiziološke uvjete duž gastrointestinalnog trakta (gradijent kisika, koncentracija antimikrobnih peptida, pH), tanko crijevo sadrži puno manju količinu bakterijskih stanica u usporedbi s debelim crijevom. U tankom crijevu dominiraju porodice *Lactobacillaceae* i *Enterobacteriaceae*, a u debelom crijevu *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae*. B) Presjek debelog crijeva prikazuje dominantne porodice unutar lumena (*Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* i *Rikenellaceae*) i mukoznih regija (*Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae*) (Donaldson i sur., 2016)

### 2.1.3. Bolesti povezane disbalansom crijevne mikrobiote (disbioza)

Pojava smanjene bakterijske raznolikosti u crijevu značajnije je prisutna kod pretilih osoba te osoba s upalnim bolestima crijeva, psorijatičnim artritisom, dijabetesom tipa 1 i tipa 2, atopijskim ekcemom te celijakijom u odnosu na zdravu populaciju. Spona koja povezuje smanjenu mikrobiološku raznolikost i pojavu bolesti leži u činjenici da bogatiji crijevni ekosustav ima bolju otpornost na okolišne utjecaje jer se funkcije bakterijskih vrsta koje nedostaju mogu nadomjestiti drugim prisutnim vrstama. S obzirom na to, možemo zaključiti da je mikrobiološka raznolikost dobar indikator zdravlja crijeva (Sommer i sur., 2017).

Mikrobiološka raznolikost na koncu utječe i na sami motilitet crijeva koji postaje disfunkcionalan ako se oslabi imunološki ili živčani sustav, metabolizam žučnih kiselina, sekrecija mukusa ili kapacitet fermentacije što može rezultirati simptomima konstipacije i smanjenim udjelom laktobacila i bifidobakterija (Dimidi i sur., 2017). Isto tako korištenje antibiotika jedan je od najvećih rizika za infekciju *Clostridium difficile* koji u normalnim uvjetima uobičajeno naseljava gastrointestinalni sustav, a njegovi toksini najčešće uzrokuju proljev ili čak sepsu i smrt.

Neke od bolesti koje su povezane s disbalansom crijevnog mikrobioma su i upalne bolesti crijeva koje obuhvaćaju Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. Crohnovu bolest karakterizira upala koja se može pojaviti duž cijelog gastrointestinalnog trakta i može biti diskontinuiranog tipa, dok je kod ulceroznog kolitisa upala ograničena samo na debelo crijevo. Oba oblika bolesti prate povratni simptomi kao što su proljev, vrućica i abdominalni bolovi, a glavnim razlogom pojave upale smatra se neadekvatan imuni odgovor domaćina prema crijevnoj mikrobioti. Takvu nepravilnu reakciju uključuje prejak odgovor T-limfocita prema nepatogenim antigenima (npr. *S. cerevisiae*, protein vanjske membrane *E. coli* itd.) prezentiranima na mikrobioti u crijevima. Zbog toga dolazi do dugoročnog gubitka određenih bakterijskih vrsta koje su odgovorne za održavanje crijevne mukusne barijere što za direktnu posljedicu ima povećanu izloženost bakterija epitelnim stanicama i s time veću razinu upale (Landers i sur., 2002). Studija Nagao-Kitamota i sur. (2016) dokazuje usku povezanost ove bolesti s crijevnom disbiozom kada su germ free miševi kolonizirani mikrobiotom pacijenata oboljelih od crijevnih upalnih bolesti, nakon čega su razvili ozbiljan kolitis u usporedbi s kontrolnom skupinom. Pacijentima koji boluju od upalnih bolesti crijeva svojstven je smanjeni udio koljena *Firmicutes* i to posebice vrste *Faecalibacterium prausnitzii* i *Roseburia* sp. važnih prilikom upalnog odgovora (Machiels i sur., 2014).

Bitno je spomenuti i rak debelog crijeva, višeznačnu bolest ovisnu o genetskim i okolišnim čimbenicima čija se etiologija isto tako povezuje s crijevnom mikrobiotom, a jedan je od 4



glavnih uzroka smrtnosti povezane s tumorima. U studiji provedenoj na miševima, pokazalo se kako germ free miševi imaju manju incidenciju raka debelog crijeva te usporen razvoj samog tumora u usporedbi s konvencionalno uzgojenim miševima kod kojih je između ostalog primijećena i pojava rektalnog krvarenja i anemije s naglim porastom upalnih stanica porijeklom od disfunkcionalne crijevne barijere. Osim toga, tumorsko prerastanje unutar crijevnog lumena može oštetiti crijevnu barijeru što za posljedicu ima pojačan protok crijevne mikrobiote i štetnih luminalnih metabolita u unutarnja tkiva, a time i stimulaciju imuno-upalnog odgovora i mobilizaciju mijeloidnih stanica čime se može poremetiti sastav mikrobiote (Li i sur., 2012). Sekvencioniranjem gena koji kodiraju za 16S rRNA otkriven je povećani udio koljena *Fusobacterium* te smanjen udio koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* u tumorskom tkivu u usporedbi sa zdravom populacijom, što upućuje na to da *Fusobacterium* u tumorogenezi sudjeluje putem spomenutih upalnih mehanizama (Kostic i sur., 2012).

Pretilost je također jedan kompleksni sindrom čija je glavna karakteristika dugoročna neravnoteža između energetskeg unosa i potrošnje, a osim načina života, prehrane i tjelesne aktivnosti, pretilost se sve više povezuje sa sastavom crijevne mikrobiote. Metagenomske studije otkrile su znatno veći udio koljena *Firmicutes* zaslužnog za proizvodnju butirata te smanjeni udio koljena *Bacteroidetes* u mikrobiomu debelog crijeva pretilih pacijenata u usporedbi sa skupinom normalne tjelesne mase. Ovakav nesrazmjer u sastavu mikrobiote prati povećana razina glikozid hidrolaze (zaslužne za degradaciju škroba), kratkolančanih masnih kiselina (butirat i acetat) te povećana sposobnost za iskorištenje energije (Turnbaugh i sur., 2006). Takvo povećano iskorištenje energije odnosno pojačan škrobni metabolizam posredovan crijevnom mikrobiotom, uzrokuje porast monosaharida i triglicerida u jetri što pridonosi razvoju pretilosti. S druge strane, randomizirane studije pokazale su pozitivnu korelaciju između pojačane proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina i smanjene pojave pretilosti inducirane prehranom te inzulinske rezistencije, a kod miševa je primijećen učinak butirata i propionata na kontrolu crijevnih hormona i smanjenje apetita (Lin i sur., 2012). Crijevna disbioza može potaknuti nastanak pretilosti i metaboličke komplikacije posredovanjem kod više mehanizama, a neki od njih uključuju i utjecaj na regulaciju imunološkog sustava, promijenjenu crijevnu hormonsku i energetske regulaciju te proupalne mehanizme (npr. ulazak lipopolisaharidnih endotoksina putem crijevne sluznice u portalni krvotok) (Baothman i sur., 2016).

Danas se uz crijevnu mikrobiotu povezuju i poremećaji koji nisu isključivo lokalizirani u području probavnog sustava kao npr. neurodegenerativne bolesti poput autizma, depresije, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Kod pacijenata koji boluju od takvih bolesti

primijećen je povećan udio koljena *Bacteroidetes* te roda *Clostridium* sp. i *Desulfovibrio* koji su zaslužni za proizvodnju propionske kratkolančane masne kiseline uz čiju se povišenu koncentraciju veže razvoj spomenutih bolesti (Song i Finegold, 2004; Shultz i sur., 2015).

## 2.2. METODE PRIPREME UZORKA ZA METAGENOMSKO ISTRAŽIVANJE MIKROBIOTE

### 2.2.1. Dizajn eksperimenta

Kao u svakom znanstvenom istraživanju, mikrobiom se može istraživati opažajnim (bez intervencije) i eksperimentalnim metodama, a od velike su koristi istraživanja kojima se povezuje utjecaj mikrobioma sa zdravstvenim ishodom pacijenata. Kod odabira ispitanika bitno je voditi računa o uključujućim i isključujućim kriterijima kako bi se postigla podudarnost između ispitaničkih i kontrolnih skupina i smanjio utjecaj čimbenika zabune poput starosne dobi, spola, indeksa tjelesne mase, prehrane, godišnjeg doba, korištenja lijekova, etniciteta, geografske regije i prisutnosti komorbiditeta. Dob uvelike utječe na mikrobiom, pogotovo kod ljudi mlađih od 16 godina, što je posebno bitno prilikom istraživanja kod djece kod koje se mikrobiota smatra stabilnom tek nakon navršene 3 godine (Yatsunenکو i sur., 2012). Također, ako se uspoređuje utjecaj mikrobioma među ispitanicima, bitno je ujednačiti njihovu prehranu, kako bi se mogao isključiti njezin utjecaj na sami rezultat istraživanja, a isto tako prilikom samog dizajniranja studije o mikrobiomu važno je voditi računa o podudarnosti geografske regije ispitanika. Još jedan spomenuti kriterij je i korištenje lijekova pa se tako npr. pacijent koji je uzimao antibiotike 3-6 mjeseci prije provođenja studije treba isključiti iz iste, a prema nekim studijama može proći i 4 godine dok mikrobiota ne postigne svoju inicijalnu kompoziciju (Macfarlane, 2014).

Prilikom određivanja veličine uzorka, odnosno broja ispitanika istraživači se služe statističkim alatima poput T-testa, analizom varijance,  $X^2$  testa i Dirichlet multinomijalnom raspodjelom (Xia i sur., 2018). Rezultati istraživanja mikrobioma mogu biti nepouzdana radi utjecaja raznih čimbenika poput kontaminacije te grešaka ekstrakcijskih metoda i metoda uzorkovanja i sekvencioniranja. Shodno tome, u istraživanjima se preporučuje korištenje pozitivnih i negativnih kontrola uzoraka kako bi se što točnije okarakterizirale kompleksne mikrobne zajednice ljudskog organizma, a izbjegle "lažno prisutne" mikrobne zajednice.

### 2.2.2. Priprema fekalnog uzorka

Za potrebe istraživanja ljudskog mikrobioma koriste se različiti tipovi uzoraka poput fecesa, nein vazivnog uzorka epitela crijeva ("luminal brush"), sinovijalne tekućine, urinarnog uzorka,

dentalnog plaka, sline, ali i biopsije kože i crijevne submukozne regije. Izbor tipa uzorka ovisi prvenstveno o interesu znanstvenog istraživanja, ali od svih navedenih tipova ističu se fekalni uzorci, koji su jednostavni za prikupljanje i korištenje u velikim longitudinalnim studijama i dobro koreliraju s profilom i gustoćom bakterija u lumenu debelog crijeva. S druge strane biopsijski uzorci pružaju više podataka o samim interakcijama između mikrobiote i domaćina (Claesson i sur., 2017), ali do njih je puno teže doći.

Najraširenija metoda čuvanja i skladištenja uzoraka je svakako neposredno smrzavanje, nakon čega se uzorci mogu koristiti za različite tipove sekvenciranja poput amplikon, metagenomskog i metatranskriptomskog sekvenciranja te određivanja metabolita metodama spektrometrije masa. Preporučuje se da se uzorci pohrane na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  unutar 15 min nakon prikupljanja, a zatim transportiraju u laboratorij gdje se trajnije pohranjuju na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No, u većini slučajeva uzorci se prikupljaju u domovima ispitanika, a ne u laboratorijskim uvjetima pa se tada preporučuje korištenje gotovih komercijalnih pripravaka u kojima se skladištenje može odvijati pri sobnim uvjetima čak i dulje od tjedan dana (Choo i sur., 2015). Ako se provodi 16S rRNA analiza, onda je prilikom uzorkovanja fecesa dovoljno uzeti bris s toaletnog papira, dok je za potrebe "shotgun" sekvencioniranja potrebna veća količina materijala ( $\sim 1\text{g}$ ), a u oba slučaja potrebno je uzeti uzorak uroniti u pufersku stabilizacijsku otopinu. Nedostatak ovakvog testiranja je to što mikrobne zajednice nisu homogene unutar crijeva tj. kolona pa tako ni u samom uzorku, zbog čega je otežana detekcija i kvantifikacija bakterijskih vrsta, pogotovo onih koje su prisutne u  $<0,5\%$  cjelovite mikrobiote. Prilikom skupljanja uzorka fecesa preporuča se korištenje Bristolske ljestvice stolice ("Bristol Stool Chart") koja bilježi izgled i gustoću stolice, odražavajući vrijeme prolaska kroz probavni trakt, a rangirana je u 7 razina od kojih 1. razina označava vrlo tvrdu, a 7. razina vodenastu, proljevastu stolicu (Blake i sur., 2016) (slika 2).

Sljedeći korak u pripremi uzorka je ekstrakcija DNA, a kako bi ona bila što točnije provedena, zamrznuti se uzorak fecesa ne smije odmrzavati i ponovno zamrzavati kako bi se spriječila degradacija DNA. Ne postoji univerzalna metoda ekstrakcije DNA za svaku svrhu, ali prije samog protokola ekstrakcije, stanice se moraju lizirati tj. DNA se mora ukoncentrirati. Pomoću sitnih kuglica (staklenih, keramičkih, silikonskih), genomski materijal se odvajava od ostalog staničnog materijala, čime se najlakše liziraju Gram negativne bakterije, a zatim Gram pozitivne bakterije, arheje i gljive. Zatim slijedi centrifugiranje kako bi se uklonile veće čestice, nakon čega slijedi filtracija kroz pore. Takvim se postupcima gubi virusni materijal i onemogućuje njegova detekcija u uzorku (Salonen i sur., 2010).

Bristolska ljestvica stolice		
Tip 1		Jaka konstipacija
Tip 2		konstipacija
Tip 3		normalna
Tip 4		optimalna
Tip 5		normalna
Tip 6		dijareja
Tip 7		Jaka dijareja

**Slika 2.** Bristolska ljestvica stolice. Tip 1 označava odvojene čvrste čvoriće (teško za pražnjenje), tip 2 označava oblik čvoraste kobasice, tip 3 označava oblik kobasice s napuklinama na površini, tip 4 označava oblik kobasice ili zmijske glatke površine, oblik 5 označava mekane komade s ravnim rubovima (lako za pražnjenje), tip 6 označava kašastu stolicu s nejednakim rubovima, tip 7 označava tekuću stolicu bez krutih komada (Blake i sur., 2016).

### 2.2.3. Biopsijsko uzorkovanje crijevne mikrobiote

Osim fekalnog uzorkovanja, za potrebe procjene mikrobiološkog profila, u praksi se koristi i endoskopsko biopsijsko uzorkovanje. Za razliku od fekalnog uzorkovanja, endoskopski uzeti uzorci pomoću biopsijskih škara ili luminalnih kistića su tkivni uzorci koji daju obuhvatnije informacije o mukoznoj mikrobioti i njenoj direktnoj interakciji s tkivom domaćina posebice intestinalnim limfoidnim tkivom. S druge strane, endoskopske procedure kao metode istraživanja mikrobiote imaju i neke nedostatke od kojih je glavni nedostatak da su invazivne i neugodne za pacijente, izazivaju rizik od krvarenja i infekcija, utječu na balans crijevne mikroflore, instrumenti se prilikom prolaska kroz endoskopske kanale do željene regije mogu kontaminirati njihovim sadržajem, a zbog kompleksnosti struktura, endoskopija teško doseže distalne dijelove tankog crijeva. Također, mukozna biopsija uključuje samo malu površinu za uzorkovanje zbog čega rezultati mogu ispasti nepouzdana i može doći do neuspješne detekcije rijetkih vrsta ukoliko je mikrobna populacija nejednako distribuirana unutar epitela crijeva (Heinsen i sur., 2015).

Priprema crijeva prije same biopsije zahtijeva upotrebu laksativa poput polietilen glikola (PEG) ili sulfata kako bi se očistio crijevni sadržaj u gastrointestinalnom traktu. Da bi priprema bila adekvatna feces se mora prezentirati u potpuno tekućem obliku bez čvrstih čestica, a takvo stanje izaziva disbalans mikrobiote te značajne morfološke promjene pod utjecajem PEG-a, kao što je gubitak epitelnih stanica i površinskog mukusa (Bucher i sur., 2006). Iako se biopsiju smatra zlatnim standardom za uzorkovanje mukozne mikrobiote, zbog svega navedenog, ona nije najadekvatnija metoda za buduće analize crijevne mikrobiote.

#### 2.2.4. *In vitro* sustavi za karakterizaciju mikrobiote

Da bi se prevladali nedostaci *in vivo* studija, *in vitro* fermentacijski modeli razvijeni su kao moćan alat za proučavanje mikrobiote ljudskog crijeva u visoko kontroliranim uvjetima, koji omogućuju lako i frekventno uzorkovanje u bioreaktorima koji oponašaju različita područja debelog crijeva. Temelje se na principu inokulacije fekalne mikrobiote u hranjivim medijima u fiziološkim uvjetima. Prednosti takvih modela su niska cijena postupka, laka ponovljivost, ne zahtijevaju etičko odobrenje, zamjenjuju animalne modele te omogućuju uzgoj mikrobiote ljudskog crijeva dobivenog iz uzorka fekalija u simuliranim fiziološkim uvjetima. Svoju primjenu su već našli u proučavanju utjecaja probiotika, prebiotika i lijekova na sastav mikrobiote i njen metabolizam.

Najjednostavniji model je šaržna fermentacija, kojom se ispituje utjecaj bioaktivnih komponenata, toksičnih supstanci ili raznih agensa na sastav crijevne mikrobiote, a provodi se tako da se čista kultura ili fekalna suspenzija inokulira u zatvoreni sustav u kojem nema dodatne opskrbe hranjivim tvarima. Nedostatak ovakvog modela je kratko vrijeme rada zbog brzog iscrpljivanja supstrata, nakupljanje mikrobnih metabolita i vode te smanjenje pH vrijednosti koja može spriječiti daljnju mikrobnu aktivnost.

Kontinuirana fermentacija se razlikuju od šaržne fermentacije jer se rast bakterija u fermentoru uspijeva održavati dulje vremena, što je moguće jer se konstantno obnavlja medij u sustavu i uvode svježiji nutrijenti. Također, nastali metaboliti se izlučuju iz sustava oponašajući tako *in vivo* sustav u najvećoj mogućoj mjeri. Jedan od takvih modela kontinuirane fermentacije je Reading model, sustav u tri faze. Takav složeni sustav od 3 faze predstavlja 3 regije debelog crijeva: uzlazni, poprečni i silazni kolon, oponašajući drugačije uvjete pH i fermentacijske aktivnosti prisutne u svakoj od te tri regije. Vrijednost pH kontrolirana je vanjskim podešivačem pomoću NaOH, a u fermentore se uvodi gel mucin. Osim toga, razvijen je i novi fermentacijski model PolyFermS u kojem je svježija fekalna mikrobiota najprije imobilizirana u gelu mucina gdje se umnaža do veće gustoće prisutnih

bakterijskih stanica, a tek onda aplicira u fermentacijski medij čime je vrijeme djelovanja reaktora produženo na 80 dana (Pham i Mohajeri, 2018). Među modelima kontinuirane fermentacije istakao se SHIME model (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) jer uspijeva vršiti simulaciju cjelokupnog intestinalnog trakta (gornji dio probavnog sustava, želudac, cijelo tanko i debelo crijevo). Valja spomenuti i TIM-2 model čija je prednost integracija peristaltičkog miješanja i membrane koja stimulira apsorpciju metabolita (Wiele i sur., 2015).

## 2.3. METODE SEKVENCIRANJA I BIOINFORMATIČKA ANALIZA

### 2.3.1. 16S rRNA sekvenciranje

Geni koji kodiraju za rRNA su ugl. visokokonzervirani geni tj. najmanje su varijabilni unutar genoma. Međutim, neke regije unutar 16S rRNA molekule (komponenta 30S podjedinice prokariotskog ribosoma) jednake su kod različitih bakterijskih vrsta, dok se druge više razlikuju. Sekvence ovih varijabilnih regija (V1-V9) unutar 16S rRNA gena mikroorganizama se mogu međusobno usporediti, čime je moguće odrediti njihovu filogenetičku sličnost, odnosno različitost. Upravo zbog toga, analiza gena koji kodiraju za 16S rRNA se najčešće primjenjuje u taksonomiji i filogenetičkim analizama.

Samo sekvenciranje 16S rRNA gena započinje pripremom uzorka tj. izolacijom DNA kojoj je izmjerena koncentracija te podliježe PCR (polimerase chain reaction) tehnici za pripremu DNA knjižnice. U PCR reakcijama umnažaju se određeni dijelovi DNA, a kako bi se to postiglo, ključno je korištenje početnica koje se specifično izabiru ovisno o sastavu uzorka. Svaki umnoženi produkt PCR reakcije posredovan određenom početnicom je zapravo izolirani fragment iz cjelokupne DNA molekule koji predstavlja ključnu varijabilnu regiju (V1-V9) koja reprezentira jednu grupu srodnih bakterija (Thermo Fischer Scientific Inc., 2014).

Nadalje, sekvence 16S rRNA gena umnožene lančanom reakcijom polimeraze se zatim sekvenciraju, identificiraju elektroforezom u agaroznom gelu te se zatim uspoređuju s poznatim sekvencioniranim genima pohranjenim u javno dostupnim bazama podataka poput NCBI (engl. National Center for Biotechnological Information) ili RDP (engl. Ribosomal Database Project). Na taj način omogućuje se identifikacija nepoznatih bakterijskih sojeva, tj. identifikacija sastava mješovitih bakterijskih kultura.

Međutim, 16S rRNA sekvenciranje ima i nekoliko nedostataka u samoj metodi. Pa tako nekoliko kopija 16S rRNA gena može se naći u genomu pojedinačne bakterije što je bitno

uzeti u obzir prilikom određivanja korelacije između broja gena 16S rRNA i broja bakterija prisutnih u uzorku. Također, s obzirom na to da se u metagenomičkim studijama sekvencira samo jedna ili dvije varijabilne regije, to može biti dodatna prepreka u razlikovanju vrsta, kao i činjenica da se u različitim studijama mogu koristiti različite varijabilne regije što otežava usporedbu rezultata (Thomas i sur., 2015). Osim toga, u literaturi su opisane i različite bakterijske vrste čije su 16S rRNA sekvence gotovo identične odnosno razlikuju se za manje od 0,5 % (npr. *Streptococcus* i *Enterobacter*) što može biti problem prilikom identifikacije patogenih i nepatogenih vrsta ili pak određivanja vrsta s prisutnim fenotipom antibiotske rezistencije (Rogall i sur., 1990).

Ovom metodom dobiva se specifični DNA profil, čijom se primjenom može identificirati te okarakterizirati kompleksne mikrobne ekosustave poput gastrointestinalnog trakta i dr. regija tijela, ali i fermentirane hrane, bakterijskih biofilmova, oceana, tla, rijeka itd. Sekvenciranje predstavlja brzu i učinkovitu tehniku koja omogućava razdvajanje DNA sekvenci, umnoženih PCR-om, koje se međusobno razlikuju samo u pojedinom paru baza. Ovakva metodologija našla je svoju primjenu u različitim područjima kao npr. mikrobiologiji hrane, medicinskoj mikrobiologiji i mikrobiologiji okoliša.

### 2.3.2. Sekvenciranje cijelog genoma

Sekvenciranje cijelog genoma tzv. metodom sačmarice (engl. shotgun) provodi se razbijanjem cjelokupnog DNA sadržaja, ekstrahiranog iz mikrobiote, u male fragmente koji se potom sekvenciraju i uspoređuju s referentnim genomima kako bi se procijenila prisutnost tih fragmenata u originalnom uzorku. U usporedbi sa 16S pristupom, metoda sačmarice analizira cjelokupni genetički materijal ispitivanog uzorka, zbog čega se ističe kvalitetom, raznovrsnošću, ali i količinom dobivene informacije koja se može upotrijebiti u svrhu mnogih različitih analiza. U novije vrijeme, razvojem novih tehnologija sekvencioniranja, za primjenu ove metode znatno su se smanjili troškovi i vrijeme korištenja, a i veća je točnost same metode (Manichanh i sur., 2008).

### 2.3.3. Bioinformatička analiza podataka – QIIME2

Sirove podatke dobivene sekvenciranjem potrebno je obraditi dostupnim bioinformatičkim alatima kako bi se oni mogli interpretirati u kasnijim analizama. Danas postoje brojne bioinformatičke platforme s ugrađenim algoritmima kojima se postiže kontrola kvalitete i klasteriranje sličnih sekvenci, taksonomska podjela i filogenetička rekonstrukcija, izračun mjera raznolikosti populacije kao i vizualizacija samih rezultata. Neke od danas najšire korištenih platformi za analizu sekvencija 16S rRNA gena su QIIME 2 (engl. Quantitative

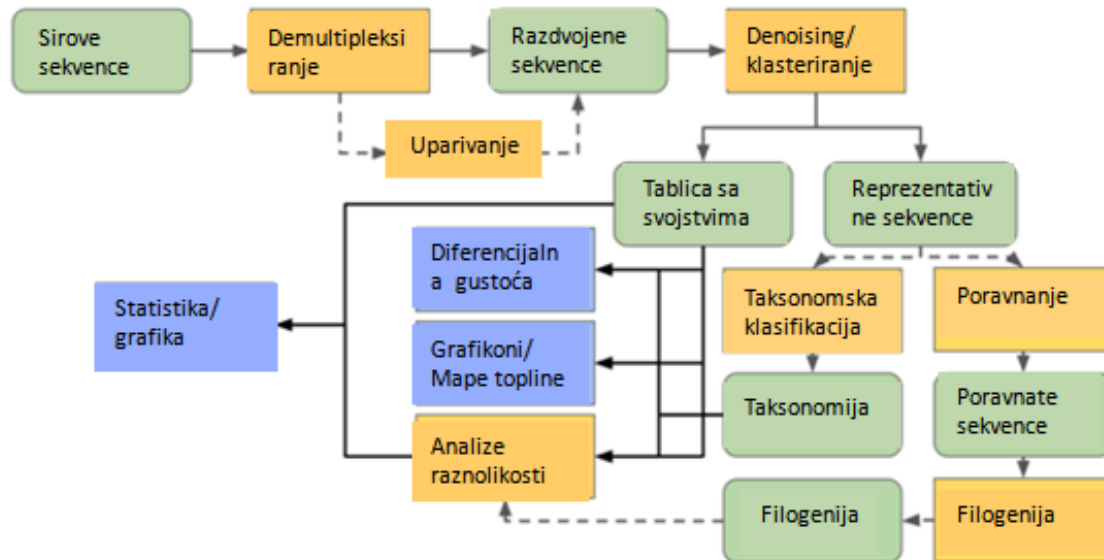
Insights Into Microbial Ecology), Bioconductor, USEARCH i Mothur (Marizzoni i sur., 2020).

Potpunu analizu u programskom paketu QIIME 2 obuhvaćaju različiti softveri, kao i različiti programski jezici s dokumentacijom spremljenom na različitim lokacijama unutar platforme. Također, potrebni su mnogi radni koraci obrade sirovih podataka, a često izlazni format jednog koraka ne odgovara ulaznom formatu sljedećeg koraka zbog čega su potrebne dodatne transformacije podataka.

Za rad softvera ulazni sirovi podaci 16S rRNA sekvenciranja moraju biti u FASTA (ne sadrži podatke o kvaliteti sekvenci) ili FASTQ (sadrži podatke o kvaliteti sekvenci) formatu. Nakon sekvenciranja, sekvence iz različitih uzoraka su međusobno pomiješane, zbog čega je nužno izvršiti demultipleksiranje tj. njihovo razdvajanje. Svaka očitana sekvenca iz pojedinog uzorka ima na sebi identificirajući barkod zbog čega je moguće demultipleksiranjem razdvojiti sekvence prema pripadajućem specifičnom barkodu koji se kasnije također uklanja. Zatim očitane sekvence prolaze kroz proces "trimanja" (engl. read trimming) čime se uklanjaju nukleotidi slabe kvalitete i konzervirane regije genetičkog materijala zajedno s početnicama. Pomoću DADA2 metode očitane sekvence uparuju se sa svojim komplementima ako je korišteno pair-end sekvenciranje te se također vrši ispravljanje pogrešaka u sekvencama (engl. denoising) (Hall i Beiko, 2018). Sama kvaliteta profila sekvence ovisi o mnogim faktorima, a neki od njih su izbor sekvencirajuće platforme, PCR tehnika, ciljani genetički marker, kao i mnoge druge eksperimentalne varijable. Posljednji izlazni podatak je tablica sa svojstvima (engl. FeatureTable[Frequency]) poznata i kao OTU (engl. operational taxonomic units) tablica i sekvence (engl. FeatureData[Sequence]) koje se koriste u daljnjim analizama za određivanje taksonomije, alfa i beta raznolikosti te statističkim analizama (slika 3).

Nizom naredbi, QIIME 2 omogućava vizualizaciju taksonomskih profila uzoraka u obliku interaktivnih grafova koji su realizirani putem algoritama taksonomske klasifikacije. Sami grafovi mogu prezentirati podatke na osnovu željene taksonomske razine ili raširenosti specifične taksonomske grupe. Dostupan je i prikaz filogenetičke raznolikosti (engl. phylogenetic diversity), odnosno distribucija evolucijski različitih vrsta unutar uzorka. Tako se pomoću ovog softvera može dobiti prikaz  $\alpha$ - i  $\beta$ - raznolikosti. Alfa raznolikost opisuju raznolikost vrsta tj. procjenu broja vrsta unutar uzorka, a ona se može prikazati Faithovom filogenetičkom raznolikosti, Shannonovim indeksom, *evennes* i *observed OTUs* metrikom. S druge strane, beta raznolikost opisuje razlike u prisutnim vrstama između više uzoraka, a prikazuje se Jaccard, Bray-Curtis te UniFrac distancom koja može biti težinska (weighted) ili





**Slika 3.** Prikaz pojednostavljene sheme obrade podataka u QIIME 2 programu (QIIME 2, 2020)

netežinska (unweighted). Za svaku od ovih mjera beta raznolikosti, QIIME2 automatski generira PCoA (eng. Principal Coordinates Analysis) trodimenzionalnu vizualizaciju koja koristi matricu udaljenosti i tako vizualno daje istraživaču informaciju o identifikaciji sličnih tj. različitih uzoraka. Osim same karakterizacije uzoraka, dostupna je i rarefakcijska analiza koja određuje je li istraživani uzorak sekvenciran do zadovoljavajuće dubine, odnosno jesu li detektirane sve prisutne vrste u uzorku (Hall i Beiko, 2018).

U programskom paketu QIIME2 moguće je eksperimentiranje s različitim parametrima, komponentama i modulima što rezultira akumulacijom brojnih izlaznih datoteka unutar samog programa zbog čega je lako izgubiti trag o tome koje su naredbe i parametri korišteni u kojoj fazi kreiranja datoteka. Upravo iz tog razloga QIIME2 omogućava povijesni prikaz (engl. provenance) svakog koraka transformacije ulaznih i izlaznih datoteka, korištenih naredbi i softverskih verzija kao i vrijeme potrebno za realizaciju određene naredbe.

#### 2.4. FEKALNA TRANSPLANTACIJA

U novije vrijeme sve je veća potreba za alternativnijim načinima liječenja patoloških stanja poput bakterijskih infekcija, pretilosti, metaboličkog sindroma i upalnih bolesti crijeva zbog slabe efikasnosti i nedostataka klasičnih metoda. Tako npr. standardna terapija infekcije *Clostridium difficile* uključuje upotrebu antibiotika (Zar i sur., 2007) koja dugoročno uzrokuje antibiotsku rezistenciju patogenih bakterijskih vrsta i time otežava daljnji oporavak pacijenata. No, fekalna transplantacija se pokazala uspješnom u liječenju spomenute

bakterijske infekcije (zaustavljanjem simptoma dijareje) i to u prosjeku u 87 – 90 % slučajeva (Rossen i sur., 2015) (Cammarota i sur., 2014). "Moć" fekalne transplantacije dokazana je i u studiji na životinjama kod pretilih osoba i osoba prekomjerne tjelesne mase čiji su fekalni mikrobi transplantirani u germ free miševе uzrokovali veći porast tjelesne mase nego što su to uzrokovali fekalni transplantati osoba normalne tjelesne mase (Goodrich i sur., 2014).

Fekalna transplantacija se provodi apliciranjem fecesa zdravog donora u pacijenta kako bi se vratila raznolikost i stabilnost mikrobne zajednice u crijevu. Donor mora biti zdrav, ne smije uzimati antibiotike prije transplantacije te mora prethodno proći detaljne pretrage. Za samu transplantaciju feces se miješa s fiziološkom otopinom, homogenizira se i filtrira, a zatim se supernatant transportira u debelo crijevo pacijenta putem kolonoskopije, nazogastrične sonde ili klistira. Kako bi se povećala vjerojatnost oporavka potrebno je osim prijenosa samih mikroorganizama uključiti i prisutne metabolite poput kratkolančanih masnih kiselina (Xiao i sur., 2020). Volumen korištenih suspenzija fecesa za potrebe fekalne transplantacije variraju između 200 i 500 mL, a veći volumeni su pokazali i veću vjerojatnost uspjeha same metode (Aroniadis i Brandt., 2013).

Unatoč tome, opsežne pretrage, sigurnost i prihvatljivost metode, etički faktori te deficit standardizacije protokola veliki su nedostaci primjene same metode. Stoga je potrebno napraviti daljnje studije u kojima će se riješiti postojeći problemi posebice razvojem i integracijom *in vitro* sustava u primjeni tradicionalne fekalne mikrobne transplantacije.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

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

U eksperimentalnom dijelu rada korištena je SIEM (Simulated Ileal efflux medium) kompleksna hranjiva podloga. SIEM hranjiva podloga simulira neprobavljene komponente hrane koje iz zadnjeg dijela tankog crijeva, ileusa, ulaze u debelo crijevo. Ovakva hranjiva podloga sadrži karakteristike tipične za zapadnjački način prehrane. Sastav podloge naveden je u tablici 1. Osim toga priprema se otopina soli čiji je sastav prikazan u tablici 2.

**Tablica 1.** Sastav SIEM podloge

SASTOJAK	KOLIČINA (g/L)
Pektin	4,7
Ksilan	4,7
Arabinogalaktan	4,7
Amilopektin	4,7
Kazein	23,5
Škrob	39,2
Tween 80	17,0
Baktopepton	23,5
Žučne soli	0,4

**Tablica 2.** 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
Cistein hidroklorid	0,400

Pripremljena otopina soli se sterilizira odvojeno od ostale podloge u koju se dodaje nakon sterilizacije u autoklavu.

Priprema se i otopina vitamina čiji je sastav prikazan u tablici 3. Pripremljena otopina čuva se u hladnjaku na 4 °C te se dodaje u SIEM podlogu neposredno prije korištenja. Prije inokulacije pH podloge je namješten na 5,8.

**Tablica 3.** Sastav otopine vitamina

<b>SASTOJAK</b>	<b>KOLIČINA (za 10 mL)</b>
Menadion	0,010
D-biotin	0,020
Vitamin B12	0,005
Pantotenat	0,100
Nikotinamid	0,050
p-aminobenzen	0,050
Tiamin	0,040
Destilirana voda	Do 10 mL

### 3.1.2. Mikrobna kultura za inokulaciju

U ovom radu kao izvor mikrobne kulture za inokulaciju hranjive podloge korišten je uzorak stolice petero donora. Minimum od tri uzorka smatra se zlatnim standardom te je često korišten u drugim studijama u ovom području istraživanja (Haindl i sur., 2021). Svi donori imaju iste karakteristike, dobi između 50 i 59 godina, ITM (indeks tjelesne mase) oko 30, ženskog su spola te omnivorskog tipa prehrane.

### 3.1.3. Laboratorijska oprema za pripremu, praćenje procesa i obradu uzoraka

Pribor:

- Metalne špatule
- Lađice za vaganje
- Plastična posuda s poklopcem za prikupljanje uzoraka
- Plastična posuda s poklopcem za homogenizaciju uzoraka

- Gaza 10 cm x 10 cm
- Gumice za učvršćivanje
- Automatske pipete
- Erlenmeyerove tikvice
- Silikonske cijevi različitih promjera
- Kleme
- Falcon kivete
- Spojnice
- Staklene boce

#### Bioreaktor s miješalom (Fermentor):

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

#### Uređaj za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje DNA:

- QIAamp® PowerFecal® DNA Kit, QIAGEN, Nizozemska

#### Ostali laboratorijski uređaji:

- Miješalo IKA, Werke, Eurostar, Njemačka
- Autoklav „Sutjeska“, Jugoslavija
- Analitička vaga model Eclipse EBL 314i, Adam, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Centrifuga Universal 320 R, Hettich, Njemačka
- Hladnjak, Beko, Turska
- Zamrzivač Forma 900 (-86 °C), Thermo scientific, Njemačka
- Magnetska miješalica, Heildoph, Njemačka
- Tehnička vaga, KERN fkb, Njemačka
- BioSpec Nano spektrofotometar, Shimadzu, Japan

Kemikalije za pripravu hranjivih podloga:

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

Plin pod tlakom:

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

Ostale kemikalije:

- Anaerocult (Merck, Njemačka)
- Fiziološka otopina 0,9 % NaCl (Braun, Njemačka)
- 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 4, *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

Računalni programi za analizu podataka:

- Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 2)
- Microsoft Office 2010, Microsoft, Sjedinjene Američke Države

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema hranjive podloge

Za simulaciju uvjeta u debelom crijevu pripremljena je SIEM hranjiva podloga volumena 300 ml (sastav naveden u tablici 1), uz dodatak otopine soli (tablica 2) i otopine vitamina (tablica 3). Hranjive podloge pripremljene su otapanjem izvaganih sastojaka u demineraliziranoj vodi.

### 3.2.2. Priprema fekalnog transplanta

Fekalne uzorke za inokulaciju doniralo je 5 volontera. Za pravilno sakupljanje uzoraka, dane su im čiste plastične posude te vrećica Anaeroculta koja je pričvršćena na poklopac posude za uzorkovanje. Anaerocult je reagens koji sadržava kemijske komponente te se dodaje kako bi brzo i u cijelosti vezao molekule kisika te tako omogućio anaerobne uvjete u volumenu do 2.5 L. Na taj način se sprječava odumiranje anaeroba i fakultativnih anaeroba koji čine većinu mikroorganizama u fecesu. Fekalni uzorci spremljeni su na + 4 °C do prikupljanja svih uzoraka. Sve površine u laboratoriju i posuđe su temeljito dezinficirane 70 % etanolom prije početka rada. Nadalje, uzorke je potrebno zasebno homogenizirati pomoću metalne špatule te je od svakog uzorka odvagano 50 g i dodano u plastičnu posudu za homogenizaciju. Pregledni članak o fekalnoj bakterioterapiji autora Gough i sur. (2011) pokazao je da fekalna transplantacija nije efikasna ako se u pripremnom koraku koristi manje od 50 g uzorka fecesa. Zatim je dodano 300 mL fiziološke otopine koja se koristi za održavanje osmotske ravnoteže čime se sprječava pucanje bakterijskih stanica. Na posudu s uzorkom stavljen je poklopac s otvorom za miješalo čime se umanjuje kontaminacija uzorka i laboratorija. Uzorak je homogeniziran koristeći IKA Werke Eurostar miješalicu pri početnoj brzini od 500

o/min 3-5 min te pri brzini od 1000 o/min dodatnih 2-3 min. Na čistu plastičnu posudu učvršćena je gaza dimenzija 10 cm x 10 cm te je sredina gaze utisnuta kako bi sadržaj lakše prolazio. Homogenizirani uzorci su zatim postepeno filtrirani preko gaze dok sav permeat nije prošao. Gaza s filtratom je odbačena, a permeat je spremljen na – 20 °C do inokulacije. Tako pripremljeni fekalni uzorci moraju se inokulirati unutar 30 dana od zamrzavanja.

### 3.2.3. Uzgoj u bioreaktoru

Sterilizacija hranjive podloge, pribora i aparature:

Laboratorijski bioreaktor je najprije potrebno spojiti s bocama koje sadrže kiselinu i lužinu potrebne za regulaciju pH vrijednosti, zatim s jednom praznom Erlenmeyerovom tikvicom za homogenizaciju uzorka stolice i pripremu inokuluma, te jednom Erlenmeyerovom tikvicom s pripremljenom SIEM hranjivom podlogom. Također, potrebno je baždariti pH i ORP elektrodu i zatvoriti sve otvore koji se ne koriste bilo sa silikonskom cijevi i klemom ili filterom za zrak. Bitno je zabrtviti sve druge otvore na bioreaktoru, zaštititi priključke za pH i ORP elektrodu, otvorene nastavke cijevi obložiti folijom, a čepove od vate papirom zbog pare koja nastaje tijekom sterilizacije. Kada je laboratorijski bioreaktor u kojem će se vršiti uzgoj spojen s pomoćnim dijelovima potrebno ga je sterilizirati u autoklavu pri temperaturi 121 °C na 15 minuta. Nakon sterilizacije, bitno je da se otopine soli koje su sterilizirane zasebno prebace u tikvicu s podlogom, po mogućnosti dok su još vruće kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije. Otopina vitamina ne sterilizira se, već se prebacuju u bioreaktor netom prije inokulacije.

Završno postavljanje aparature i parametara procesa:

U prethodno pripremljen bioreaktor s miješalom potrebno je uliti glicerol u zaštitnu cijev temperature sonde koja je spojena s korisničkim sučeljem. Osim toga grijači vode u plaštu bioreaktora su spojeni s kontrolnom jedinicom na kojoj se nalaze peristaltičke pumpe i koja je također povezana sa sučeljem, a isto tako se na hladilo priključuju cijevi kojima se hladna voda uvodi u plašt bioreaktora u svrhu temperature regulacije sustava. Anaerobni uvjeti u bioreaktoru se osiguravaju uvođenjem dušika u sustav u količini 0,2 NI/min. Kada su složeni svi dijelovi aparature, a prije početka samog procesa, potrebno je postaviti željene parametre. Oni se podešavaju preko korisničkog sučelja upravljačke jedinice na kojem je instaliran "Leonardo" programski paket. Kako bi se postigao autentični okoliš silaznog debelog crijeva, temperatura u sustavu postavlja se na 37 °C, a pH, ovisno o dijelu debelog crijeva koji se stimulira, na 5,8.



#### Vođenje šaržnog anaerobnog procesa:

Kada je sva aparatura postavljena, temperatura i pH podešeni, uključuje se miješanje pri početnoj brzini rotacije od 50 o/min. Prethodno zamrznuti fekalni inokolum je u međuvremenu odmrznut i prebačen u steriliziranu Erlenmeyerovu tikvicu povezanu s bioreaktorom. Inokolum se zatim prebacuje u bioreaktor peristaltičkom pumpom te se brzina miješanja poveća na 100 o/min. Prilagodba mikrobiote u trajanju od 4 sata provedena je u bioreaktoru u uvjetima koji simuliraju silazni dio debelog crijeva (37 °C i pH 5,8). Prilagodba je vođena u anaerobnim uvjetima uz malu rotaciju miješala brzinom 30 o/min. Anaerobni uvjeti se osiguravaju uvođenjem dušika pri brzini od 0,04 ml/min, a pH se automatski postavlja na 5,8 dodavanjem 5 M NaOH ili 1M HCl. Proces ukupno traje 72 sata, a uzorci se izuzimaju u volumenu od 25 ml otprilike svakih 12 sati pomoću sustava za sterilno izuzimanje uzorka. Za vrijeme ukupnog trajanja procesa od 72 sata praćeni su svi bitni parametri procesa (brzine okretaja miješala, temperatura, pH vrijednost, oksido-redukcijski potencijal). Od izuzetog uzorka od 25 ml uzima se 500 µl i sprema se na – 80 °C te će se taj alikvot koristiti za genomičku analizu crijevne mikrobiote.

#### 3.2.4. Izolacija DNA iz uzoraka

Izolacija DNA iz uzoraka napravljena je pomoću QIAamp® PowerFecal® DNA Kit-a. Najprije su uzorci od 25 ml iz bioreaktora izuzeti u Falcon kivetama te radi ukoncentriravanja biomase preneseni na centrifugiranje u trajanju od 30 sekundi, relativnu centrifugalnu silu 100 x g i program broj 2. Zatim se odlije supernatant te se uzorke ponovno postavilo na centrifugiranje u trajanju od 15 min uz 3000 x g. Ponovno se odlio supernatant te se dobio uzorak volumena otprilike 20 ml, a izolacija DNA je dalje napravljena prema uputama proizvođača kita. Koncentracija DNA je mjerena na Shimadzu BioSpec Nano spektrofotometru, a slijepa proba je bio elucijski pufer korišten u QIAamp® PowerFecal® DNA Kit-a u kojem se nalazi DNA prije same izolacije.

#### 3.2.5. Sekvenciranje 16S rRNA marker gena

Sekvenciranje DNA obavljeno je u certificiranom laboratoriju Molecular Research Lab, Shallowater, Texas, USA. Korištena je metoda sekvenciranja sparenih krajeva (engl. pair-end sequencing) pomoću Illumina MiSeq uređaja. Korištene su početnice F341 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' i R806 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' za umnažanje V3 i V4 varijabilnih regija gena koji kodira za 16S rRNA primjenom lančane reakcije polimeraze (PCR) u 30 ciklusa. Nakon umnažanja fragmenta 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 knjižnice upotrebom Illumina TruSeq DNA library protokola te zatim sekvencirani Illumina MiSeq platformom. Rezultat sekvenciranja prebačen je u FASTQ datoteku.

### 3.2.6. Obrada podataka sekvenciranja u QIIME 2 programskom paketu

Instalacija programa QIIME 2 ovisi o korištenom operativnom sustavu, a detaljne upute nalaze se na QIIME mrežnoj stranici (<https://docs.qiime2.org/2021.4/interfaces/q2studio/>). Kao što je ranije spomenuto, sirovi podaci sekvenciranja fragmenta gena 16S rRNA nalaze se u obliku FASTQ ulaznih datoteka, pri čemu jedna datoteka odgovara očitanim sljedovima nukleotida u prednjem (engl. forward) načinu čitanja, a druga u stražnjem (engl. reverse) načinu čitanja slijeda. Zatim se prednji i stražnji slijed nukleotida spoje u cjelovitu sekvencu, koja sadrži sekvence iz svih uzoraka i pohranjuje se u jednom dokumentu. Kako bi se razdvojile sekvence prema pojedinom uzorku, vrši se demultipleksiranje tj. razdvajaju se sekvence prema barkodovima (specifični slijedovi nukleotida) koji se stavljaju na početke ili krajeve sekvenci i označavaju iz kojeg uzorka potječe koja sekvenca. Slijedovi kojima prvih 8 nukleotida nije u potpunosti odgovaralo korištenim barkodovima su odbačeni iz daljnjih analiza. Sekvence su prošle kontrolu kvalitete korištenjem DADA 2 programa koji je optimiziran za ispravljanje grešaka sekvenciranja Illumina platformom. Slijedovi svakog uzorka su klasterirani u operacijske taksonomske jedinice (OTU) s minimalnom pokrivenošću od 97 % i minimalnom identičnošću od 97 %, što odgovara definiciji OTU-a na taksonomskom nivou vrste, a to je izvršeno pomoću UCLUST algoritma integriranog u QIIME 2 programski paket. Posljednji izlazni podaci su tablica sa svojstvima i sekvence koje se zatim uspoređuju sa poznatim sekvencama iz baza podataka kojima je već određena taksonomija. Kako bi mogli analizirati metrike alfa i beta raznolikosti koji se baziraju na filogeniji potrebno je izračunati filogenetsko drvo sekvenci. Za određivanje beta raznolikosti tj. različitosti/sličnosti bakterijskih zajednica prisutnih u uzorcima koristi se UniFrac metrika. Dobiveni su dokumenti sa sufiksom qzv (QIIME Zipped Visualization) što predstavlja vizualizaciju rezultata dobivenih QIIME 2 programom te se mogu otvarati i preko QIIME 2 View-a (<https://view.qiime2.org/>).

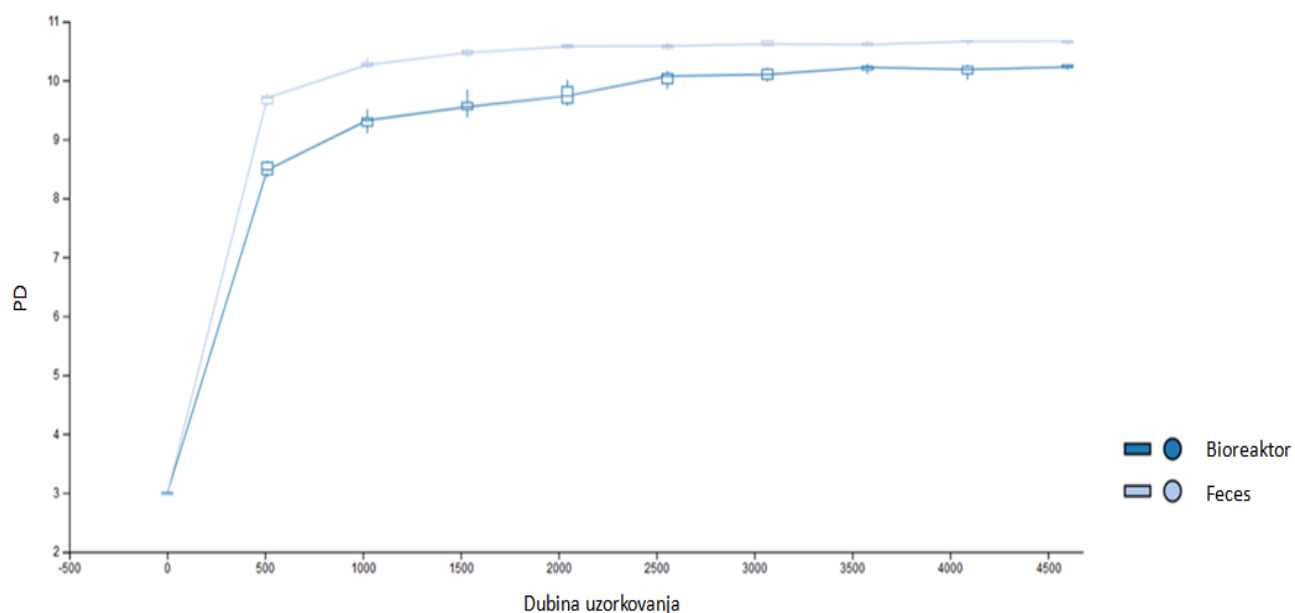
#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je usporediti kultiviranu mikrobiotu fecesa s onom u nativnom fecesu iz kojeg potječe (inokulumu), kako bi se ustvrdilo je li moguće dobiti stabilnu zajednicu mikroorganizama koju je moguće uzgojiti u *in vitro* uvjetima, a koja može poslužiti kao temelj za liječenje fekalnom mikrobnom transplantacijom. Glavni uvjet je u bioreaktoru producirati mikrobiotu s dovoljno velikom raznolikošću i reprezentativnim taksonomskim profilom debelog crijeva.

U ovom radu ispitao se utjecaj *in vitro* kultivacije na 5 različitih uzoraka fecesa koji potječu od donora istih karakteristika te su napravljene genomičke analize. Usporedila se alfa raznolikost uzoraka pomoću Faithove filogenetičke raznolikosti na temelju načina uzgoja uzoraka (nativni feces/uzgoj u bioreaktoru) te pomoću Shannonovog indeksa na temelju vremena provedenog u bioreaktoru (uzorkovanje nakon 0, 12, 24, 36, 48, 60 i 72 h). Također ispitala se beta raznolikost PCoA metodom (engl. Principal Coordinate Analysis) u kojoj su uzorci smješteni u trodimenzionalni prostor, a međusobna udaljenost je određena UniFrac metrikom. Raznolikost uzoraka tj. njihova međusobna filogenetička sličnost određena je netežinskom UniFrac metrikom na temelju vremena provedenog u bioreaktoru te težinskom UniFrac metrikom na temelju načina njihovog uzgoja (nativni feces/uzgoj u bioreaktoru). Osim definiranja alfa i beta raznolikosti, napravljena je i analiza taksonomske zastupljenosti mikroorganizama u ispitanim uzorcima. Okarakterizirane su sličnosti i razlike između nativnih fecesa 5 različitih donora prema udjelu bakterijskih koljena. Zatim se njihova taksonomska zastupljenost na razini koljena i roda uspoređivala s uzorcima fecesa kultiviranih u bioreaktoru. Prilikom prikazivanja rezultata alfa i beta raznolikosti, korištene su vizualizacije .qzv dokumenata u QIIME 2 View-u, a za taksonomsku zastupljenost mikroorganizama korišteni su kružni i 100 % stupčasti dijagrami te tablice s pripadajućim udjelima pojedinih taksonomskih kategorija.

#### 4.1. ALFA RAZNOLIKOST

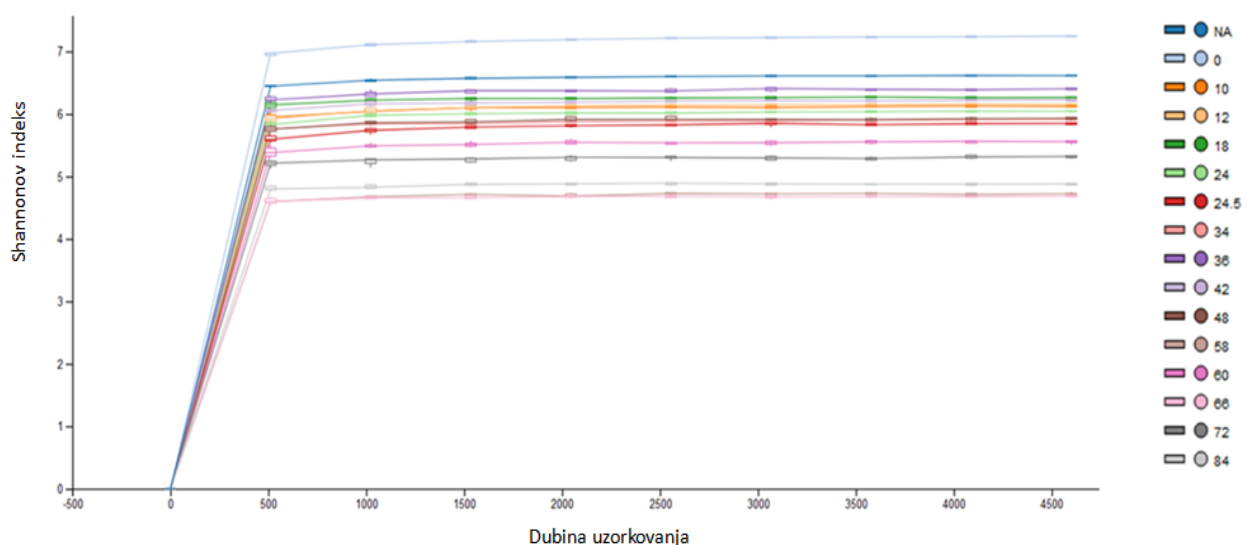
Alfa raznolikost nam daje informaciju o tome koliki je broj različitih vrsta prisutan u pojedinom uzorku ili staništu. Jedna od metoda mjerenja alfa raznolikosti je Faithova filogenetička raznolikost (PD). Ona mjeri raznovrsnost s obzirom na to koliko se evolucijski različitih tj. udaljenih vrsta nalazi u uzorku, ali ne uzima u obzir distribuciju vrsta već samo njihovu prisutnost. Na slici 4 možemo vidjeti rarefakcijsku krivulju koja prikazuje PD vrijednost uzoraka u odnosu na metodu uzgoja (bioreaktor/nativni feces). Vidljivo je da uzorci nativnih fecesa imaju veću vrijednost (10,3) u usporedbi s uzorcima uzgojenim u bioreaktoru (9,8). Takva pojava smanjenja genetičke raznolikosti kod uzoraka uzgajanih u *in vitro* uvjetima se može objasniti uvjetima postavljenima u bioreaktoru koji se minimalno mijenjaju tokom procesa kao i hranjivom podlogom koja je konstantnog sastava. Rarefakcijske krivulje nam također daju podatke o dubini uzorkovanja (engl. sequencing depth) čije se vrijednosti nalaze na x-osi krivulje. Iz slike 4 je vidljivo da je dosegnuta horizontalna asimptota za obje skupine kod približno 2500 sekvenci po uzorku što označava da su detektirane sve prisutne vrste u uzorku tj. da je u potpunosti određena njihova bakterijska bioraznolikost.



**Slika 4.** Rarefakcijska krivulja koja pokazuje alfa raznolikost (PD) uzoraka na temelju njihovog uzgoja (bioreaktor/nativni feces)

Za razliku od Faithove filogenetičke raznolikosti, Shannonov indeks je popularno korišten indeks raznolikosti koji uzima u obzir ne samo prisutnost pojedinih vrsta već i njihovu zastupljenost tj. broj prisutnih OTU unutar uzorka zbog čega ima prednost u prezentiranju rijetkih bakterijskih vrsta čiji se OTU pojavljuje manjom učestalošću. Vrijednost Shannonovog indeksa u pravilu će biti veća ako je u uzorku prisutan manji broj različitih OTU ali s jednakom distribucijom unutar uzorka, nego ako je prisutan veći broj različitih OTU s manjom učestalošću.

Tako na slici 5 vidimo rarefakcijsku krivulju koja pokazuje Shannonov indeks uzoraka na temelju vremena (u satima) provedenog u bioreaktoru. Vidljivo je da najveći Shannonov indeks (6,5 – 7) imaju uzorci u nultom satu adaptacijskog perioda u bioreaktoru te uzorci nativnog fecesa. Uzorci koji su proveli između 10 i 58 h u bioreaktoru ne pokazuju konstantan padajući trend, ali pokazuju nešto niži Shannonov indeks (5,1 – 6,1). Najniži Shannonov indeks svakako imaju uzorci koji su proveli dulje od 60 h u bioreaktoru (4,5 – 5). Shannonov indeks <4,0 označava nisku bakterijsku raznolikost unutar ispitivane populacije (Lankelma i sur., 2017), a ta je granica dobivena na temelju intervala dobivenih unutar zdrave kontrolne skupine. Prema tome, može se reći da iako se Shannonov indeks tijekom uzgoja u bioreaktoru smanjio sa 7 na 4,5, još uvijek je bakterijska raznolikost unutar uzoraka u granicama normalne. Također i u ovom slučaju je postignuta zadovoljavajuća dubina uzorkovanja gdje je horizontalna asimptota dosegnuta kod približno 500 sekvenci po uzorku.

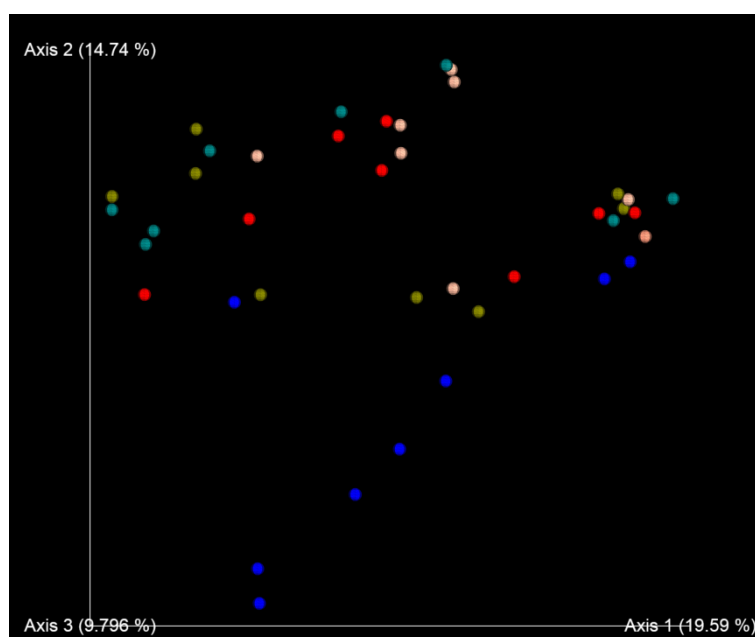


**Slika 5.** Rarefakcijska krivulja koja pokazuje alfa raznolikost (Shannonov indeks) uzoraka na temelju vremena (u satima) provedenog u bioreaktoru (NA= uzorak nativnog fecesa)

## 4.2. BETA RAZNOLIKOST

Beta raznolikost daje informaciju o tome koliko su uzorci koji se analiziraju međusobno sličnih ili različitih svojstava. Korištena metoda za određivanje beta raznolikosti u ovom radu je UniFrac metrika koja uspoređuje uzorke na temelju njihove filogenetičke sličnosti, a korištena je netežinska i težinska metrika. Unweighted (netežinski) prikaz UniFrac metrike je kvalitativna metoda koja uzima u obzir samo prisutnost pojedine bakterije, a weighted (težinski) prikaz uzima u obzir prisutnost i zastupljenost pojedine bakterije što ju čini kvantitativnom metodom. Za vizualizaciju rezultata korištena je osnovna koordinatna analiza (engl. Principal Coordinate Analysis – PCoA) koja smješta uzorke u trodimenzionalni prostor na temelju udaljenosti koja je određena UniFrac metrikom. Udaljenost između točaka na grafu u korelaciji je s filogenetičkom sličnošću između uzoraka, pa tako veća udaljenost između točaka znači veću različitost taksonomskog sastava uzoraka i obratno.

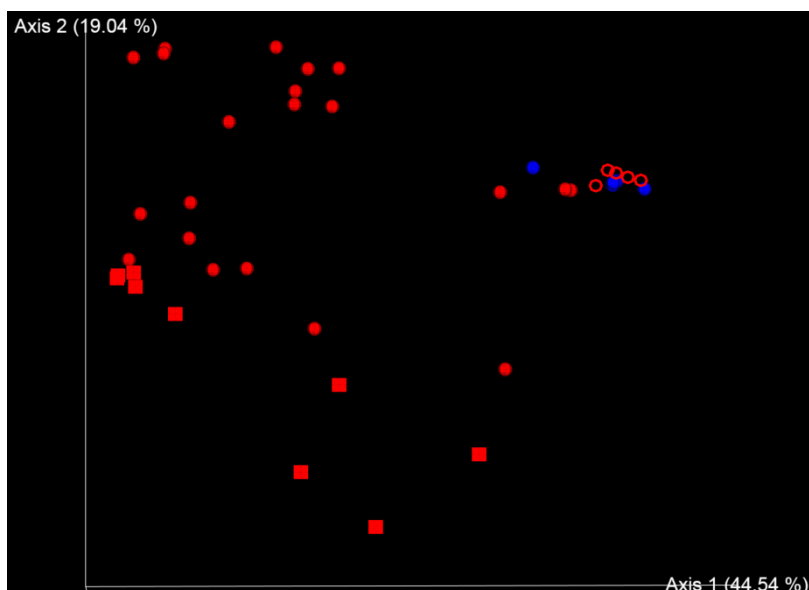
Na slici 6 vidimo beta raznolikost crijevne mikrobiote uzoraka određenu netežinskom UniFrac metrikom (istom bojom je označen uzorak nativnog fecesa s pripadajućim uzorcima uzgojenim u bioreaktoru nakon otprilike 0, 12, 24, 36, 48, 60 i 72 h). S obzirom da netežinski



**Slika 6.** PCoA dijagram beta raznolikosti crijevne mikrobiote uzoraka na temelju vremena provedenog u bioreaktoru, određene netežinskom UniFrac metrikom (ista boja označava isti set uzoraka uzgojenih u bioreaktoru nakon otprilike 0, 12, 24, 36, 48, 60 i 72 h te uzorak nativnog fecesa od kojeg potječu)

prikaz govori isključivo o prisutnosti pojedinih vrsta u uzorcima, iz slike 6 je vidljivo da su uzorci uzgojeni u *in vitro* uvjetima, a koji potječu od istog uzorka fecesa međusobno vrlo udaljeni na PCoA grafu. U prijevodu, sastav crijevne mikrobiote s obzirom na prisutne vrste se kontinuirano mijenja s vremenom provedenim u bioreaktoru pa se tako taksonomski profil uzoraka kultiviranih u bioreaktoru određeno vrijeme, međusobno uvelike razlikuje bez obzira što potječu iz istog uzorka fecesa.

Slika 7 prikazuje beta raznolikost crijevne mikrobiote uzoraka određenu težinskom UniFrac metrikom (plava boja označava uzorke nativnih fecesa, crvena boja označava uzorke uzgojene u *in vitro* uvjetima, prazni kružići označavaju uzorke koji su u bioreaktoru proveli 0 h, kvadratići uzorke koji su u bioreaktoru proveli  $\geq 60$  h). Težinski prikaz opisuje raznolikost mikrobiote s obzirom na prisutnost, ali i na zastupljenost pojedinih vrsta u uzorcima. Iz slike 7 je vidljivo da se uzorci fecesa (na grafu plava boja) međusobno nalaze jako blizu na grafu što govori o njihovom vrlo sličnom sastavu mikrobiote. Nadalje, vidimo da su uzorci izvađeni iz bioreaktora u nultom satu (na grafu prazni kružići) prema sastavu vrlo slični nativnim uzorcima fecesa. Također, prema Shannonovom indeksu prethodno smo odredili značajno nižu alfa raznolikost uzoraka koji su u bioreaktoru proveli  $\geq 60$  h, a prema ovoj analizi beta raznolikosti vidimo da se ti isti uzorci značajno razlikuju po sastavu u usporedbi s nativnim uzorcima fecesa i uzorcima koji su iz bioreaktora izvađeni u nultom satu. Čak štoviše, za zaključiti je da je sastav i zastupljenost pojedinih mikrobnih vrsta sličniji između uzoraka nativnih fecesa različitih donora nego između uzoraka fecesa uzgajanih u bioreaktoru ( $>10$  h) i pripadajućih nativnih fecesa.



**Slika 7.** PCoA dijagram beta raznolikosti crijevne mikrobiote uzoraka određene težinskom UniFrac metrikom (plava boja označava uzorke nativnih fecesa, crvena boja označava uzorke uzgojene u *in vitro* uvjetima, prazni kružići označavaju uzorke koji su u bioreaktoru proveli 0 h, kvadratići označavaju uzorke koji su u bioreaktoru proveli  $\geq 60$  h)

#### 4.3. REZULTATI TAKSONOMSKE ZASTUPLJENOSTI MIKROORGANIZAMA U UZORKU

Sirovi podaci obrade sekvenciranja u programu QIIME 2 dobivaju se u obliku biom tablice, koja sadrži sve informacije o sekvencama i taksonomskoj identifikaciji uzoraka te se ti podaci mogu prenijeti u Microsoft Excel program u obliku .xlsx formata. Nakon što je obrađena analiza alfa i beta raznolikosti uzoraka, obrada rezultata u QIIME 2 programu nam također omogućava i detaljan uvid u taksonomski sastav mikrobiote za svaki uzorak na odabranom taksonomskom nivou od koljena do vrste, iz kojeg se može vidjeti kompleksnost i različitost sastava crijevne mikrobiote tijekom fermentacijskog uzgoja u bioreaktoru.

Na slici 8 prikazana je bakterijska raznolikost nativnih uzoraka fecesa 5 donora (F1 - F5) na razini koljena. Kružni grafikoni prikazuju udio najzastupljenijih koljena u ljudskoj crijevnoj mikrobioti pa je tako vidljivo da su omjeri koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* u 4 uzoraka otprilike jednaki dok kod F1 uzorka koljeno *Firmicutes* prevladava (59,3 % : 31,9 %). Isto tako udio *Firmicutes* kod svih uzoraka kreće se između 38,3 i 59,3 %, dok je udio *Bacteroidetes* između 31,9 i 50,5 %. Nadalje, udio *Proteobacteria* u uzorcima kreće se između 6 i 15,1 %, od kojih najveći udio pokazuje uzorak F3. Koljeno *Actinobacteria* se



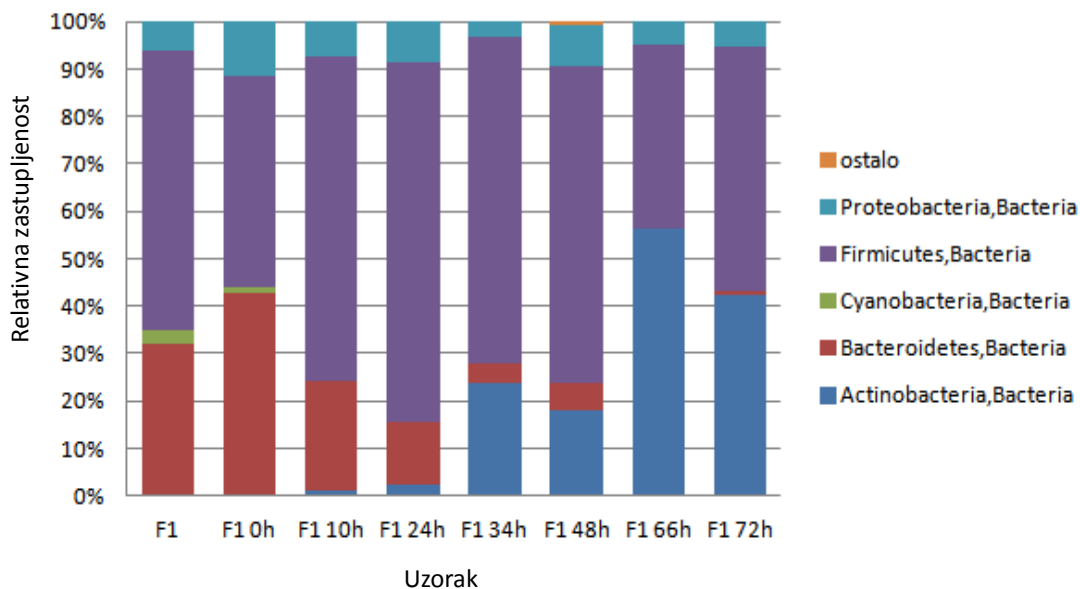


**Slika 8.** Taksonomska raznolikost nativnih uzoraka fecesa 5 donora (F1-F5) na razini koljena

pojavljuje samo u F1 i F2 uzorku nativnih fecesa s udjelom 0,3 %. *Verrucomicrobia* je prisutna u 4 uzorka i to s udjelom manjim od 1 %, osim kod uzorka F5 gdje taj udio iznosi 4,2 %. Također, kod svih uzoraka prisutno je i koljeno *Cyanobacteria* u rasponu od 0,1 do 2,5 %. Kod uzorka F5 dodatno je prisutno i koljeno *Tenericutes* u zastupljenosti 0,1 % koje na grafu spada pod kategoriju ostalo. Dobiveni rezultati u skladu su s vrijednostima Eckburg i sur. (2005) za koljena *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* i *Cyanobacteria*, dok se dobivene vrijednosti za koljena *Actinobacteria* i *Proteobacteria* razlikuju (udio *Actinobacteria* iznosi ~2,5 %, a *Proteobacteria* 0,1 – 1 %).

Nakon što je okarakteriziran bakteriološki profil nativnih fecesa na razini koljena, napravljena je i analiza taksonomske zastupljenosti nativnih fecesa i njihovih pripadajućih uzoraka uzgojenih u bioreaktoru nakon otprilike 0, 12, 24, 36, 48, 60 i 72 h također na razini koljena. Tako je na slikama 9-13 prikazan 100 % stupčasti grafikon koji prikazuje udjele bakterijskih koljena u uzorku nativnih fecesa (F1 - F5) i njihovih pripadajućih uzoraka uzgojenih u bioreaktoru (F1/F2/F3/F4/F5 0h – F1/F2/F3/F4/F5 72h). Takvi grafovi daju uvid u dinamiku promjene udjela određenih bakterijskih koljena na temelju vremena provedenog u bioreaktoru.

Pa tako na slici 9 prikazani su udjeli bakterijskih koljena za skupinu uzoraka F1 donora. Vidljivo je da udio koljena *Firmicutes* nije imao konstantan trend pada ili rasta tijekom uzgoja, ali nakon 72 h taj udio je bio nešto niži (51,9 %) nego u nativnom fecesu (59,3 %). Udio koljena *Bacteroidetes* nakon početnog porasta u 0. satu bioreaktora pokazuje konstantan pad u udjelu te s početnih 31,9 % u nativnom fecesu njegov udio iznosi samo 0,5 % nakon 72 h uzgoja u bioreaktoru. Udio koljena *Proteobacteria* se nije mnogo mijenjao tijekom uzgoja, ali je zato primijećen veliki skok u udjelu *Actinobacteria* nakon 34 h sata uzgoja te je s početnih 0,3 % u nativnom fecesu njegov udio iznosio 42,5 % nakon 72 h uzgoja. Udio *Cyanobacteria* je nakon 10 h uzgoja iznosio 0,0 %.

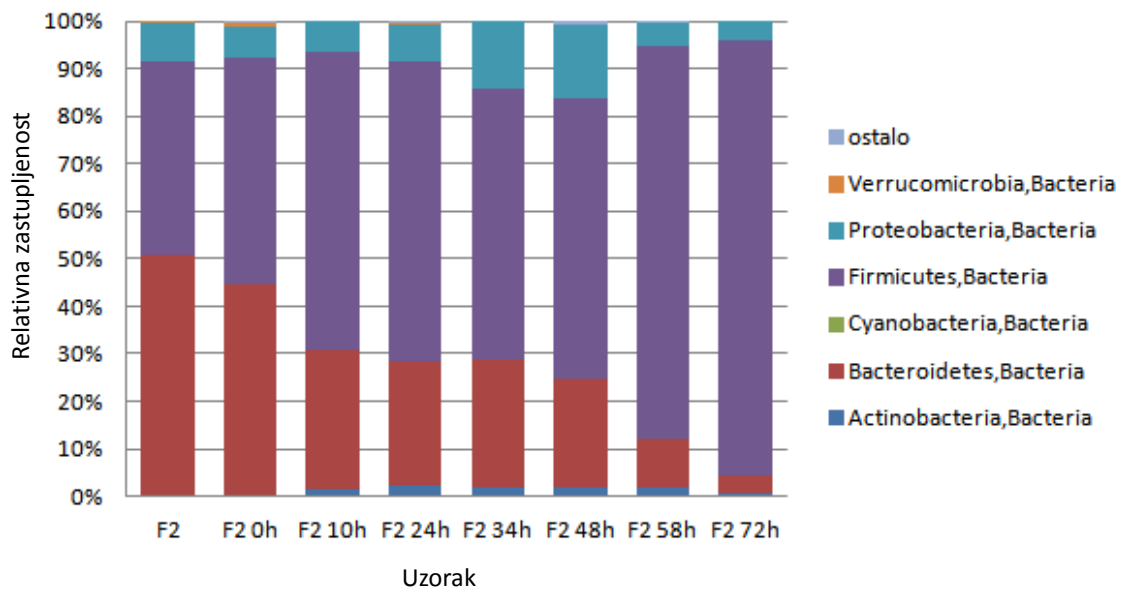


**Slika 9.** Taksonomska raznolikost bakterijskih koljena u uzorku nativnog fecesa F1 i pripadajućih uzoraka uzgojenih u bioreaktoru (F1 0h – F1 72h)

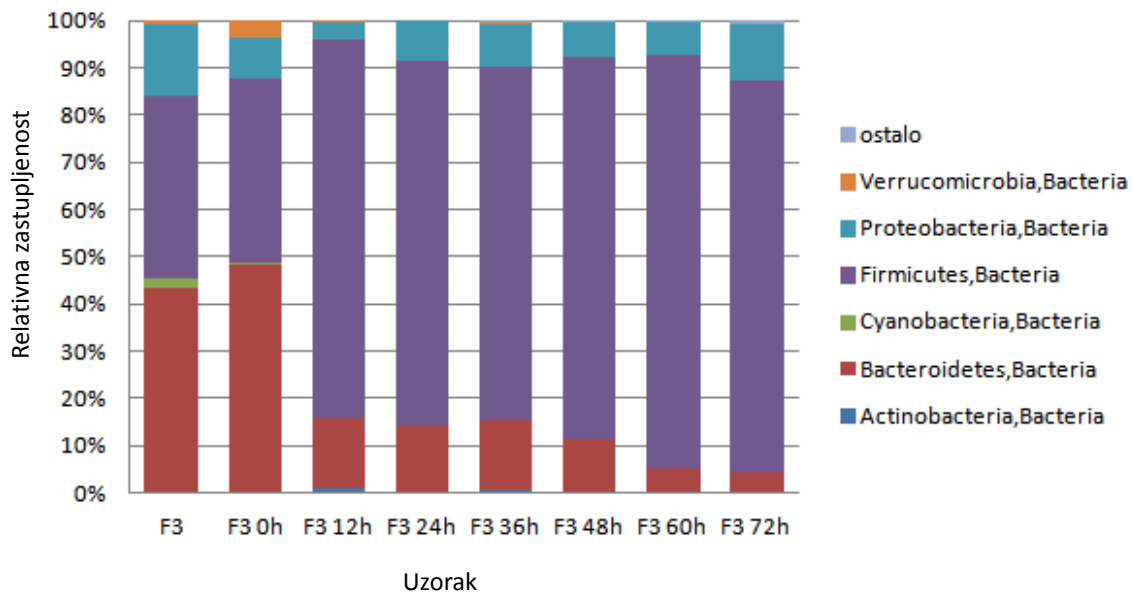
Na slici 10 prikazani su udjeli bakterijskih koljena za skupinu uzoraka F2 donora. Iz dijagrama je vidljivo da udio koljena *Firmicutes* ima rastući trend prema vremenu uzgoja u bioreaktoru pa njegova vrijednost s početnih 40,5 % u nativnom fecesu, na kraju uzgoja raste na 91,6 % ukupnih bakterija. Udio koljena *Bacteroidetes* u ovoj skupini uzoraka pokazuje konstantan padajući trend u korelaciji s vremenom uzgoja, a njegov se udio od 50,5 % u nativnom fecesu smanjuje na 3,6 % na kraju uzgoja. Udio *Proteobacteria* je s vremenom varirao ali na kraju uzgoja se smanjio za 50 % udjela u nativnom fecesu, dok se udio *Actinobacteria* nije značajno mijenjao. Udio *Verrucomicrobia* i *Cyanobacteria* je do kraja uzgoja iznosio 0,0 %.

Na slici 11 prikazani su udjeli bakterijskih koljena za skupinu uzoraka F3 donora. Udio koljena *Firmicutes* je nakon 72 h uzgoja u bioreaktoru porastao za 50 % početne vrijednosti u nativnom fecesu te je iznosio 82,7 %. Također i u ovom slučaju udio koljena *Bacteroidetes* nakon početnog porasta u 0. satu bioreaktora pokazuje finalno smanjenje u udjelu te s početnih 43,3 % u nativnom fecesu njegov udio iznosi 4,3 % nakon 72 h uzgoja u bioreaktoru. Iako je udio koljena *Proteobacteria* tijekom uzgoja varirao, na kraju uzgoja pokazuje neznatno smanjenje, dok se udio koljena *Actinobacteria* tijekom uzgoja neznatno

povećao s početnih 0,0 % u nativnom fecesu. Udio koljena *Verrucomicrobia* se smanjio, kao i koljena *Cyanobacteria* čiji je udio u 12. h uzgoja iznosio 0,0 %.

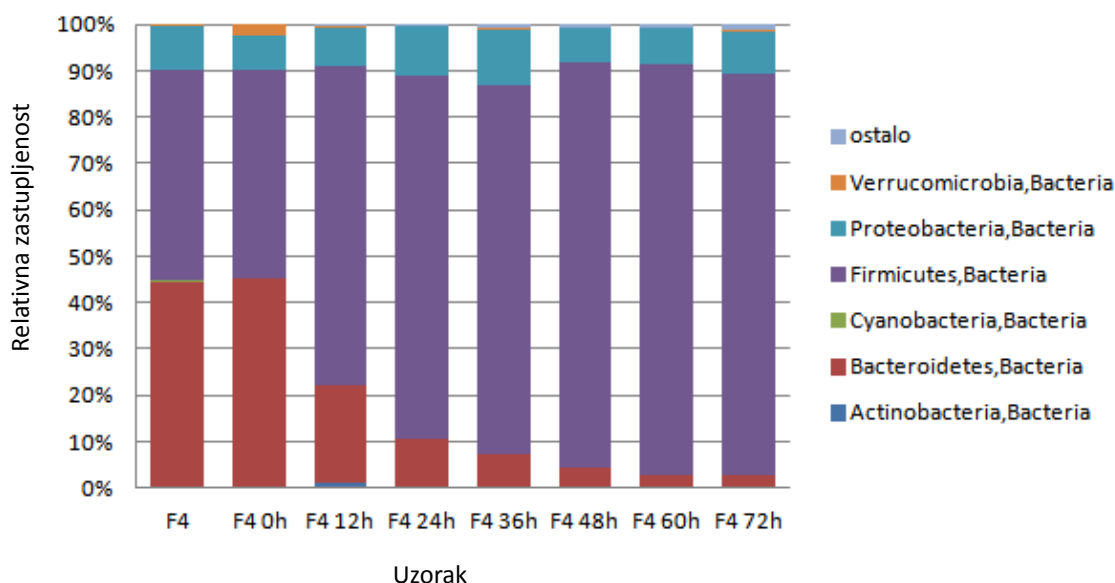


**Slika 10.** Taksonomska raznolikost bakterijskih koljena u uzorku nativnog fecesa F2 i pripadajućih uzoraka uzgojenih u bioreaktoru (F2 0h – F2 72h)



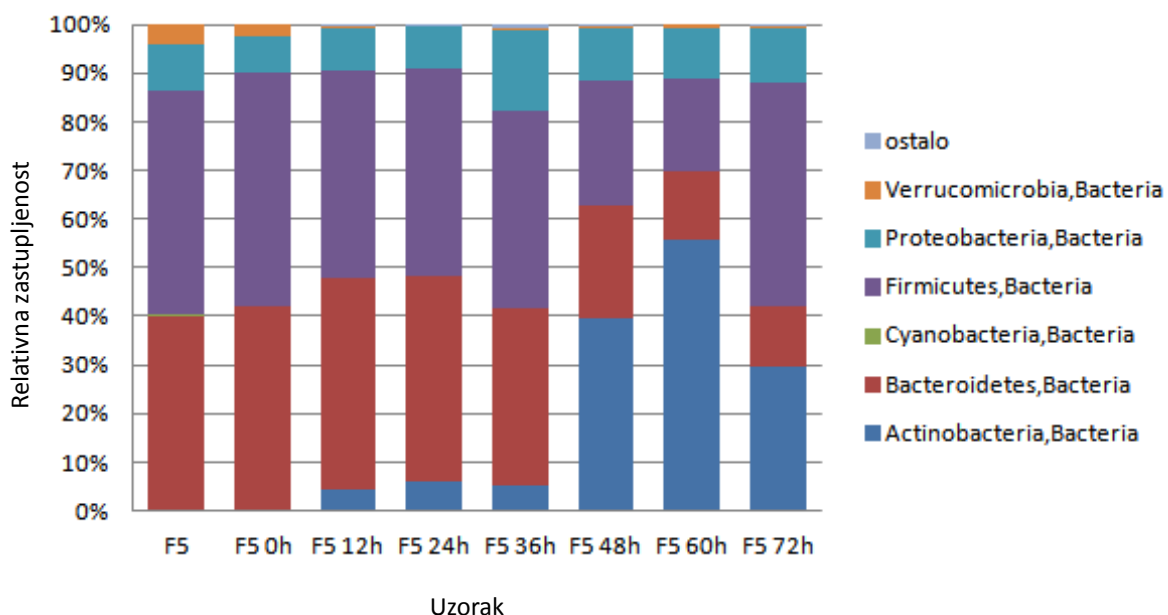
**Slika 11.** Taksonomska raznolikost bakterijskih koljena u uzorku nativnog fecesa F3 i pripadajućih uzoraka uzgojenih u bioreaktoru (F3 0h – F3 72h)

Na slici 12 prikazani su udjeli bakterijskih koljena za skupinu uzoraka F4 donora. Udio koljena *Firmicutes* se nakon 72 h uzgoja skoro duplo povećao u usporedbi s nativnim fecesom i iznosio 86,4 %. Također opet je prisutno smanjenje udjela koljena *Bacteroidetes* koji se s početnih 44,5 % u nativnom fecesu smanjio na 2,6 % nakon 72 h uzgoja u bioreaktoru. Udio koljena *Proteobacteria* se tijekom uzgoja nije značajno mijenjao, dok je udio *Actinobacteria* s 0,0 % u nativnom fecesu porastao na 0,1 % nakon 72 h uzgoja. Udio koljena *Verrucomicrobia* i *Cyanobacteria* se do kraja uzgoja u uzorcima smanjio i iznosio 0,0 %.



**Slika 12.** Taksonomska raznolikost bakterijskih koljena u uzorku nativnog fecesa F4 i pripadajućih uzoraka uzgojenih u bioreaktoru (F4 0h – F4 72h)

Na slici 13 prikazani su udjeli bakterijskih koljena za skupinu uzoraka F5 donora. Udio koljena *Firmicutes* je u ovoj skupini uzoraka do kraja uzgoja ostao isti kao u nativnom fecesu, dok se udio koljena *Bacteroidetes* ponovno smanjio s 40,2 % u nativnom fecesu na 12,1 % nakon 72 h provedena u bioreaktoru. Udio koljena *Proteobacteria* se nije mnogo mijenjao tijekom uzgoja, dok se zastupljenost koljena *Actinobacteria* (nakon početnih 0,0 % u nativnom fecesu) pojavila u uzorku nakon 12 h uzgoja te je njen udio do kraja uzgoja iznosio 29,8 %. Udio koljena *Verrucomicrobia* se ponovno smanjio u uzorcima do kraja uzgoja na 0,3 %, kao i koljena *Cyanobacteria* čiji je udio već u nultom satu uzgoja iznosio 0,0 %.

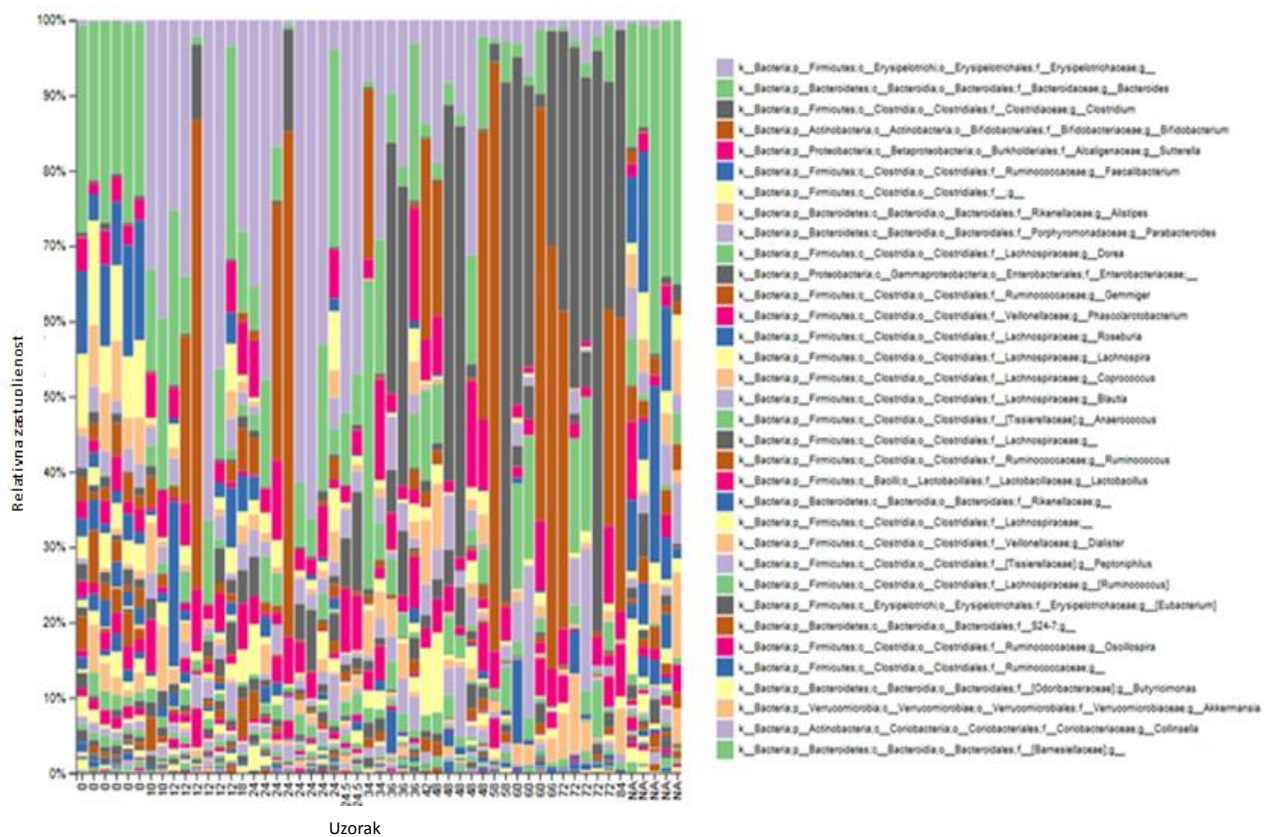


**Slika 13.** Taksonomska raznolikost bakterijskih koljena u uzorku nativnog fecesa F5 i pripadajućih uzoraka uzgojenih u bioreaktoru (F5 0h – F5 72h)

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da je u svakoj skupini uzoraka primijećeno značajno smanjenje udjela koljena *Bacteroidetes* tijekom *in vitro* uzgoja u usporedbi s udjelom u nativnom fecesu. Nadalje, udio koljena *Firmicutes* se značajno povećao u skupini uzoraka F2, F3 i F4, dok se u skupini uzoraka F1 i F5 nije mnogo mijenjao, ali također je primijećeno da se u tim dvjema skupinama značajno povećao udio *Actinobacteria* i to s početnih 0,0 % u nativnom fecesu čije prisustvo metoda zbog premale koncentracije nije detektirala, ali su očito zbog povoljnih uvjeta fermentacije, kulture s vremenom prerasle. Udio koljena *Proteobacteria* se nije mnogo mijenjao tijekom uzgoja u svim skupinama, dok se udio koljena *Verrucomicrobia* u svim skupinama smanjio do kraja uzgoja. Bakterijske kulture koljena *Cyanobacteria* nisu preživjele daljnji rast nakon 10 h fermentacije u bioreaktoru u svim skupinama uzoraka. Kategorija "ostalo" obuhvaća uglavnom bakterijska koljena *Lentisphaerae*, *Tenericutes* kao i jedno nepoznato bakterijsko koljeno te koljeno iz domene *Archaea* čija je ukupna zastupljenost u uzorcima manja od 1 %. Haindl i sur. (2021) u svom radu također su opisali smanjenu alfa raznolikost (određenu Shannonovim efektivnim indeksom) u uzorcima uzgojenima *in vitro* u usporedbi s nativnim fecesima, ali je s druge strane primijećeno povećanje udjela koljena *Bacteroidetes* te smanjenje udjela koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria* na kraju *in vitro* uzgoja. Razlog tome najvjerojatnije su drugačiji

uvjeti fermentacije (npr. izmjena hranjive podloge, varijacije u pH vrijednosti sustava, razine kisika), ali i individualne razlike u kompoziciji fecesa donora koji su u njihovom slučaju imali normalan ITM (indeks tjelesne mase).

Također, QIIME 2 kao rezultat obrade nudi i html dokument koji sadrži poveznice za vizualizaciju sastava taksonomskih skupina po uzorcima prikazanog stupčastim dijagramom. Tako je na slici 14 prikazana vizualizacija rezultata taksonomske zastupljenosti uzoraka na razini roda prema vremenu provedenom u bioreaktoru.



**Slika 14.** Stupčasti dijagram zastupljenosti bakterijskih rodova u sastavu ispitivane crijevne mikrobiote uzoraka prema vremenu provedenom u bioreaktoru (NA=uzorak nativnog fecesa)

U tablici 4 prikazani su udjeli bakterijskih rodova koljena *Firmicutes* u uzorcima nativnog fecesa te pripadajućim uzorcima uzgajanim u *in vitro* uvjetima kroz 72 h. U tablici su izdvojeni bakterijski rodovi čiji je udio iznosio > 5 % ukupnog udjela u nativnom fecesu ili uzorcima izuzetim na kraju fermentacije. Iz rezultata je vidljivo da isti bakterijski rodovi prate sličan trend u svakoj skupini uzoraka pa se tako udio rodova *Anaerococcus*, *Dialister*, *Clostridium*, *Peptoniphilus* i *Enterococcus* do kraja fermentacije povećao u svim skupinama

uzoraka s posebnim naglaskom na rod *Clostridium* koji je pokazao znatan rastući trend do kraja uzgoja. Nasuprot tomu, udio rodova *Faecalibacterium*, nepoznatog roda iz reda ("o.") *Clostridia* i porodice ("f.") *Lachnospiraceae*, *Lachnospira* i *Gemmiger* se smanjuje do kraja uzgoja približavajući se vrijednosti 0,0 %. Osim toga, rod *Lactobacillus* bitan za ljudsko zdravlje zbog svojih probiotičkih svojstava, detektiran je u nativnim fecesima u vrijednostima 0,0 % ili vrlo blizu, a čak u dvije skupine uzoraka (F1 i F5) njegov je udio porastao na ~4 %.

**Tablica 4.** Relativna zastupljenost (%) bakterijskih rodova koljena *Firmicutes* u uzorcima nativnog fecesa (F1-F5) i pripadajućim uzorcima na kraju *in vitro* uzgoja (F1 72h – F5 72h)

(%)	F1	F1 72 H	F2	F2 72h	F3	F3 72h	F4	F4 72h	F5	F5 72h
<b>Anaerococcus</b>	0,0	0,0	0,0	7,5	0,0	15,2	0,0	17,8	0,0	0,2
<b>Dialister</b>	0,0	6,0	0,0	0,3	0,0	0,2	0,3	0,7	0,3	0,0
<b>Clostridium</b>	0,6	37,1	0,2	77,2	1,2	45,3	0,5	35,1	0,4	30,2
<b>Peptoniphilus</b>	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	6,2	0,0	18,9	0,0	0,4
<b>Enterococcus</b>	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	5,7	0,0	0,0	0,0	0,6
<b>Faecalibacterium</b>	18,7	0,0	5,6	0,0	5,5	0,0	6,9	0,0	5,6	0,0
<b>o. Clostridiales</b>	6,3	0,0	8,6	0,0	6,5	0,1	12,6	0,3	13,5	1,0
<b>f. Lachnospiraceae</b>	5,9	0,0	2,8	0,0	0,7	0,0	0,6	0,0	2,2	0,0
<b>Lachnospira</b>	4,2	0,1	2,2	0,0	8,0	0,0	5,1	0,0	3,8	0,0
<b>Gemmiger</b>	2,3	0,3	3,8	0,0	0,0	0,0	5,2	0,0	5,3	0,4
<b>Lactobacillus</b>	0,1	3,7	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0

U tablici 5 prikazani su udjeli najzastupljenijih bakterijskih rodova koljena *Bacteroidetes* u uzorcima nativnog fecesa te pripadajućim uzorcima uzgajanim u *in vitro* uvjetima 72 h. Iz tablice je vidljivo da se udio svih bakterijskih rodova (*Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides* i nepoznati rod porodice *Rikenellaceae*) u uzorcima smanjio na kraju fermentacije, a čak u 50 % slučajeva se to smanjenje odnosilo na nestanak određenih bakterijskih rodova tj. njihovo prisustvo više nije bilo detektirano u uzorcima. Također, treba istaknuti rod *Bacteroides*, najzastupljeniji rod unutar koljena *Bacteroidetes*, u uzorcima nativnog fecesa (F1 – F5) prisutan u udjelu 13,5 – 27,7 % koji pokazuje najveći pad relativne zastupljenosti nakon 72 h *in vitro* uzgoja.



**Tablica 5.** Relativna zastupljenost (%) bakterijskih rodova koljena *Bacteroidetes* u uzorcima nativnog fecesa (F1 - F5) i pripadajućim uzorcima na kraju *in vitro* uzgoja (F1 72h – F5 72h)

(%)	F1	F1 72 H	F2	F2 72h	F3	F3 72h	F4	F4 72h	F5	F5 72h
<b><i>Bacteroides</i></b>	13,5	0,5	23,1	1,8	27,7	0,9	25,3	1,9	18,4	7,6
<b><i>Alistipes</i></b>	4,4	0,0	5,0	0,0	4,1	0,0	7,1	0,0	8,3	1,3
<b><i>f. Rikenellaceae</i></b>	5,5	0,0	10,0	0,0	0,8	0,0	2,4	0,0	3,2	0,0
<b><i>Parabacteroides</i></b>	3,0	0,0	4,6	0,7	3,6	3,1	2,5	0,4	3,0	0,2

U tablici 6 prikazani su udjeli najzastupljenijih bakterijskih rodova koljena ("p.") *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia* u uzorcima nativnog fecesa te pripadajućim uzorcima uzgajanim u *in vitro* uvjetima tijekom 72 h. Bakterijski rodovi *Sutterella* i nepoznati rod porodice *Enterobacteriaceae* koji pripadaju koljenu *Proteobacteria* nisu pokazali stabilan trend promjene u ispitivanim uzorcima pa se tako njihov udio nakon 72 h fermentacije u nekim uzorcima povećao, a u nekima smanjio. Nadalje, U skupinama uzoraka F1 i F5 gdje je prethodno primijećen značajan porast koljena *Actinobacteria* do kraja *in vitro* uzgoja, povećanje udjela se najvećim dijelom odnosilo na probiotički rod *Bifidobacterium*. Također, bitno je spomenuti i rod *Akkermansia*, kao jedini prisutni rod iz koljena *Verrucomicrobia*, čiji se udio smanjio u svim skupinama uzoraka na kraju fermentacije i to vrlo blizu vrijednosti 0,0 %.

**Tablica 6.** Relativna zastupljenost (%) bakterijskih rodova koljena *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia* u uzorcima nativnog fecesa (F1-F5) i pripadajućim uzorcima na kraju *in vitro* uzgoja (F1 72h – F5 72h).

(%)	F1	F1 72 H	F2	F2 72h	F3	F3 72h	F4	F4 72h	F5	F5 72h
<b><i>p. Proteobacteria</i></b>										
<b><i>Sutterella</i></b>	2,5	4,8	4,9	3,8	5,9	0,0	4,3	0,7	4,2	10,3
<b><i>f. Enterobacteriaceae</i></b>	0,0	0,2	0,0	0,2	2,4	1,2	1,3	4,7	0,2	0,2
<b><i>p. Actinobacteria</i></b>										
<b><i>Bifidobacterium</i></b>	0,3	42,3	0,3	0,6	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	28,9
<b><i>p. Verrucomicrobia</i></b>										
<b><i>Akkermansia</i></b>	0,0	0,0	0,3	0,0	1,0	0,2	0,3	0,0	4,2	0,3

Dobiveni rezultati svjedoče o smanjenoj alfa raznolikosti uzoraka uzgajanih u *in vitro* uvjetima, posebice onih koji su u bioreaktoru proveli više od 60 h. No, unatoč tomu, njihova alfa raznolikost određena Shannonovim indeksom i dalje se smatra normalnom (Shannonov indeks  $> 4$ ). Osim toga, prema analizi beta raznolikosti može se zaključiti da se uzorci nativnog fecesa prema prisutnim bakterijskim vrstama i njihovoj zastupljenosti, razlikuju od pripadajućih uzoraka uzgajanih u bioreaktoru te je razlika proporcionalna vremenu provedenom u bioreaktoru. Usporedbe radi, na temelju prisutnosti različitih vrsta i njihove relativne zastupljenosti, uzorci različitih nativnih fecesa međusobno su sličniji nego inokulumi nativnih fecesa i pripadajući izuzeti uzorci nakon uzgoja u *in vitro* sustavu kroz dulji period vremena ( $>10$  h).

Takva promjena u alfa i beta raznolikosti odraz je promjene taksonomske distribucije u uzorcima. Na temelju analize taksonomske zastupljenosti mikroorganizama u uzorcima može se reći da se do kraja *in vitro* uzgoja smanjio udio koljena *Bacteroidetes* u svim skupinama uzoraka s naglaskom na rodove *Bacteroides*, *Alistipes*, nepoznati rod porodice *Rikenellaceae* i *Parabacteroides*, kao i koljena *Verrucomicrobia* čiji je jedini predstavnik *Akkermansia*, rod bakterija s potencijalnim probiotičkim svojstvima (Zhang i sur. 2019). S druge strane udio koljena *Firmicutes* se značajno povećao kod tri skupine uzoraka s naglaskom na porast udjela roda *Clostridium* i *Anaerococcus*, ali istovremeno je kod svih skupina uzoraka bio prisutan potpuni gubitak roda *Faecalibacterium*, koji također posjeduje svojstva povoljna za zdravlje čovjeka (Miquel i sur., 2013). Kod dvije skupine uzoraka gdje nije došlo do porasta udjela koljena *Firmicutes* došlo je do znatnog porasta koljena *Actinobacteria* predvođenog rodom *Bifidobacterium*. Udio koljena *Proteobacteria* se nije mnogo mijenjao tijekom uzgoja u svim skupinama, a bakterijske kulture koljena *Cyanobacteria* nisu preživjele daljnji rast nakon 10 h fermentacije u bioreaktoru u svim skupinama uzoraka.

Promjena okoline iz *in vivo* u *in vitro* sustav može inaktivirati osjetljivije populacije bakterija te iako njihov udio može varirati tijekom uzgoja, u postavljenom *in vitro* sustavu pogodne uvjete teže je održavati. Vrlo bitan faktor je i nedostatak apsorpcije vode unutar sustava što oponaša stanje dijareje u domaćinu i time utječe na smanjenu raznolikost mikrobne populacije. Tijekom kultivacije zamijećeno je slično i usporedivo ponašanje crijevne mikrobiote u svim skupinama uzoraka, ali uz jedinstvene karakteristike koje proizlaze iz sastava originalnog fecesa donora.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Na osnovu rezultata analize alfa raznolikosti primijećena je smanjena bakterijska raznolikost uzoraka uzgajanih *in vitro* u usporedbi s nativnim uzorcima fecesa (inokulumima). To smanjenje genetičke raznolikosti prisutnih bakterija u korelaciji je s vremenom provedenim u bioreaktoru. Najnižu bakterijsku raznolikost pokazali su uzorci koji su u bioreaktoru proveli  $\geq 60$  h, iako i dalje u granicama normale (prema Shannonovom indeksu).

2. Na osnovu rezultata analize beta raznolikosti dobivenih težinskom Unifrac metrikom vidljivo je da sastav i zastupljenost različitih mikrobnih vrsta omogućava razdvajanje promatranih uzoraka na osnovu načina uzgoja (bioreaktor/nativni inokulum), posebice za uzorke koji su u bioreaktoru proveli dulje vrijeme ( $\geq 60$  h).

3. Na osnovu analize rezultata taksonomske zastupljenosti mikroorganizama primijećeno je značajno smanjenje udjela koljena *Bacteroidetes* tijekom *in vitro* uzgoja u svim skupinama uzoraka s naglaskom na rod *Bacteroides*, *Alistipes* i nepoznati rod porodice *Rikenellaceae*. Porast udjela koljena *Firmicutes* tijekom fermentacije odnosi se ponajviše na porast udjela roda *Clostridium*, uz potpuni gubitak roda *Faecalibacterium*. U skupinama uzoraka gdje nije došlo do porasta udjela koljena *Firmicutes*, zabilježen je znatan porast udjela koljena *Actinobacteria* predvođen rodom *Bifidobacterium*. Udio koljena *Proteobacteria* se nije značajnije mijenjao tijekom uzgoja, dok se udio koljena *Verrucomicrobia* i *Cyanobacteria* do kraja uzgoja smanjio u svim skupinama uzoraka.

4. Cilj ovog eksperimenta nije bio proizvesti identičnu populaciju prisutnu u *in vivo* sustavu već dobiti stabilno uzgojenu zajednicu mikroorganizama s dovoljno velikom raznolikošću reprezentativnih crijevnih bakterija koja bi se mogla koristiti kao alternativa u fekalnoj mikrobnj transplanciji. Da bi se to postiglo potrebno je u daljnjim istraživanjima produžiti vrijeme uzgoja, uključiti praćenje nastalih metabolita u uzorcima (npr. kratkolančane masne kiseline), ispitati različite parametre fermentacije (pH, brzina miješanja, razina kisika) kao i karakteristike donora različitih populacijskih skupina te razviti hranjivu podlogu koja će osigurati manji gubitak koljena *Bacteroidetes* te probiotičkih bakterijskih rodova tijekom fermentacije.

## 6. LITERATURA

16S rRNA Sequencing; An integrated research solution for bacterial identification using 16S rRNA sequencing on the Ion PGM™ System with Ion Reporter™ Software (2014) Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, SAD.

Abou-Donia, M.B., El-Masry, E.M., Abdel-Rahman, A.A., McLendon, R.E., Schiffman, S.S. (2008) Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats. *J Toxicol Environ Health A*. **71**, 1415-1429.

Aroniadis, O.C., Brandt, L.J. (2013) Fecal microbiota transplantation: Past, present and future. *Curr Opin Gastroenterol*. **29**, 79–84.

Backhed, F. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915–1920.

Baothman, O.A., Zamzami, M.A., Taher, I., Abubaker, J., Abu-Farha, M. (2016) The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes. *Lipids Health Dis*. **15**, 108.

Bäumler, A.J., Sperandio, V. (2016) Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* **535**, 85–93.

Bian, X., Chi, L., Gao, B., Tu, P., Ru, H., Lu, K. (2017) Gut microbiome response to sucralose and its potential role in inducing liver inflammation in mice. *Front Physiol*. **8**, 487.

Blake, M.R., Raker, J.M., Whelan, K. (2016) Validity and reliability of the Bristol Stool Form Scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. **44**, 693-703.

Bucher, P., Gervaz, P., Egger, J. F., Soravia, C., and Morel, P. (2006). Morphologic alterations associated with mechanical bowel preparation before elective colorectal surgery: a randomized trial. *Dis Colon Rectum*. **49**, 109–112.

Cammarota, G., Ianiro, G., Gasbarrini, A. (2014) Fecal microbiota transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. *J Clin Gastroenterol.* **48**, 693–702.

Carbonero, F., Benefiel, A.C., Alizadeh-Ghamsari, A.H., Gaskins, H.R. (2012) Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease. *Front Physiol.* **3**, 448.

Chambers, E.S., Morrison, D.J., Frost, G. (2015) Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms? *Proc Nutr Soc.* **74**, 328–336.

Chang, C., Lin, H. (2016) Dysbiosis in gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **30**, 3–15.

Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., Gewirtz, A.T. (2015) Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* **519**, 92-96.

Choo, J.M., Leong, L.E., Rogers, G.B. (2015) Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Sci Rep.* **5**, 16350.

Claesson, M.J., Clooney, A.G., O’Toole, P.W. (2017) A clinician’s guide to microbiome analysis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **14**, 585–595.

Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J.L., Vieira, A., Sato, F.T., Vinolo, M.A.R. (2016) Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunol.* **5**, e73.

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. (2013) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559–563.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a

comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* **107**, 14691–14696.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M. (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.* **54**, 2325–2340.

Dimidi, E., Christodoulides, S., Scott, S.M., Whelan, K. (2017) Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on Gut Motility and Constipation. *Adv Nutr.* **15**, 484-494.

Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K. (2016) Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* **14**, 20-32.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635–1638.

Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., Kurilshikov, A., Bonder, M.J., Valles-Colomer, M., Vandeputte, D., Tito, R.Y., Chaffron, S., Rymenans, L., Verspecht, C., De Sutter, L., Lima-Mendez, G., D'hoë, K., Jonckheere, K., Homola, D., Garcia, R., Tigchelaar, E.F., Eeckhaut, L., Fu, J., Henckaerts, L., Zhernakova, A., Wijmenga, C., Raes, J. (2016) Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* **352**, 560-564.

Gensollen, T., Iyer, S.S., Kasper, D.L., Blumberg, R.S. (2016) How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* **352**, 539–544.

Goodrich, J.K., Waters, J.L., Poole, A.C., Sutter, J.L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J.T., Spector, T.D., Clark, A.G., Ley, R.E. (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* **159**, 789-799.

Gough, E., Shaikh, H., Manges, A. R., (2011) Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* **53**, 994-1002.

Haindl, R., Engel, J., Kulozik, U. (2021) Establishment of an InVitro System of the Human Intestinal Microbiota: Effect of CultivationConditions and Influence of three Donor Stool Samples. *Microorganisms* **9**, 1049.

Hall, M., Beiko, R.G. (2018) 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. *Methods Mol Biol.* **1849**, 113-129.

Heinsen, F.A., Knecht, H., Neulinger, S. C., Schmitz, R. A., Knecht, C., Kühbacher, T., Rosenstiel, P.C, Schreiber, S., Friedrichs, A.K., Ott, S.J. (2015) Dynamic changes of the luminal and mucosa-associated gut microbiota during and after antibiotic therapy with paromomycin. *Gut Microbes* **6**, 243–254.

Hooper, L.V., Littman, D.R., Macpherson, A.J. (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* **336**, 1268–1273.

Hooper, L.V., Macpherson, A.J. (2010) Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* **10**, 159–169.

Hugon, P., Dufour, J.-C., Colson, P., Fournier, P.-E., Sallah, K., Raoult, D. (2015) A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect Dis.* **15**, 1211–1219.

Johansson, M.E.V., Larsson, J.M.H., Hansson, G.C. (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* **108**, 4659–4665.

Kakiyama, G., Pandak, W.M., Gillevet, P.M., Hylemon, P.B., Heuman, D.M., Daita, K., Takei, H., Muto, A., Nittono, H., Ridlon, J.M., White, M.B., Noble, N.A., Monteith, P., Fuchs, M., Thacker, L.R., Sikaroodi, M., Bajaj, J.S. (2013) Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J Hepatol.* **58**, 949–955.

Kostic, A., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Tabernero, J., Baselga, J., Liu, C., Shivdasani, R.A., Ogino, S., Birren, B.W., Huttenhower, C., Garret, W.S., Meyerson, M. (2012) Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* **22**, 292–298.

Landers, C. J., Cohavy, O., Misra, R., Yang, H., Lin, Y. C., Braun, J., Targan, S.R. (2002). Selected loss of tolerance evidenced by Crohns disease–associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* **123**, 689–699.

Lankelma, J. M., van Vught, L. A., Belzer, C., Schultz, M. J., van der Poll, T., de Vos, W. M., Wiersinga, W. J. (2017). Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study. *Intensive care med.* **43**, 59–68.

Li, Y., Kundu, P., Seow, S. W., de Matos, C. T., Aronsson, L., Chin, K. C., Karre, K., Pettersson, S., Greicius, G. (2012). Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APC Min/+ mice. *Carcinogenesis* **33**, 1231-1238.

Lin, H.V., Frassetto, A, Kowalik, E.J. Jr, Nawrocki, A.R., Lu, M.M., Kosinski, J.R., Hubert, J.A., Szeto, D., Yao, X., Forrest, G., Marsh, D.J. (2012) Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PloS One* **7**, e35240.

Louis, P., Hold, G.L., Flint, H.J. (2014) The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol.* **12**, 661–672.

Louis, P., Scott, K.P., Duncan, S.H., Flint, H.J. (2007) Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J Appl Microbiol.* **102**, 1197–1208.

Macfarlane, S. (2014) Antibiotic treatments and microbes in the gut. *Environ Microbiol.* **16**, 919–924.

Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijs, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Immerseel, F.V., Verbeke, K., Ferrante, M., Verhaegen, J., Rutgeerts, P., Vermeire, S. (2014) A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and



*Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1275-1283.

Maneesh, D., Konstatinos, A. P., William, A. B. (2014) Immunology of Inflammatory Bowel Disease and Molecular Targets for Biologics. *Gastroenterol Clin North Am.* **43**, 405-424.

Manichanh, C., Chapple, C.E., Frangeul, L., Gloux, K., Guigo, R., Dore, J. (2008) A comparison of random sequence reads versus 16s rDNA sequences for estimating the biodiversity of a metagenomic library. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5180–5188.

Marizzoni, M., Gurry, T., Provasi, S., Greub, G., Lopizzo, N., Ribaldi, F., Festari, C., Mazzelli, M., Mombelli, E., Salvatore, M., Mirabelli, P., Franzese, M., Soricelli, A., Frisoni, G.B. Cattaneo, A. (2020) Comparison of Bioinformatics Pipelines and Operating Systems for the Analyses of 16S rRNA GeneAmplicon Sequences in Human FecalSamples. *Front. Microbiol.* **11**, 1262.

Martens, J.H., Barg, H., Warren, M., Jahn, D. (2002) Microbial production of vitamin B-12. *Appl Microbiol Biotechnol.* **58**, 275–285.

Maurice, C.F., Haiser, H.J., Turnbaugh, P.J. (2013) Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell* **152**, 39–50.

Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Chatel, J.M., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J.M., Langella, P. (2013) *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol.* **16**, 255–261.

Moreno-Indias, I., Sanchez-Alcoholado, L., Perez-Martinez, P., Andres-Lacueva, C., Cardona, F., Tinahones, F., Queipo-Ortuno, M.I. (2016) Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food Funct.* **7**, 1775-1787.

Morrison, D.J., Preston, T. (2016) Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **7**, 189–200.

Nagao-Kitamoto, H., Shreiner, A. B., Gilliland III, M. G., Kitamoto, S., Ishii, C., Hirayama, A., Kuffa, P., El-Zaatari, M., Grasberger, H., Seekatz, A.M., Higgins, P.D.R., Young, V.B., Fukuda, S., Kao, J.Y., Kamada, N. (2016). Functional characterization of inflammatory bowel disease-associated gut dysbiosis in gnotobiotic mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* **2**, 468-481.

Natividad, J.M.M., Verdu, E.F. (2013) Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res.* **69**, 42–51.

Perez, E., Lee, C.H., Petrof, E.O. (2016) A Practical Method for Preparation of Fecal Microbiota Transplantation. *Methods Mol Biol.* **1476**, 259-267.

Pham, V.T., Mohajeri, M.H. (2018) The application of in vitro human intestinal models on the screening and development of pre- and probiotics. *Benef Microbes.* **9**, 725-742.

Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D., Rossi, M. (2007) Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Appl Environ Microbiol.* **73**, 179–185.

QIIME (2020) Overview of QIIME 2 Plugin Workflows. <<https://docs.qiime2.org/2020.8/tutorials/overview/>> Pristupljeno 30.7. 2021.

Reinhardt, C., Reigstad, C. S., Bäckhed, F. (2009) Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **48**, 249–256.

Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T., Bottger, E.C. (1990) Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol.* **40**, 323–330.

Rogier, E.W., Frantz, A., Bruno, M., Kaetzel, C. (2014) Secretory IgA is concentrated in the outer layer of colonic mucus along with gut bacteria. *Pathogens* **3**, 390–403.

Rossen, N., Fuentes, S., Van Der Spek, M., Tijssen, J., Hartman, J., Duflou, A., Lowenberg, M., van den Brink, G.R., Mathus-Vliegen, E.M.H., de Vos, W.M., Zoetendal, E.G., D'Haens,

G.R., Ponsioen, C.Y. (2015) Findings from a randomized controlled trial of fecal transplantation for patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* **149**, 110–118.

Salonen, A., Nikkila, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, M., Kekkonen, R.A., Palva, A., de Vos, W.M. (2010) Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Methods*. **81**, 127–134.

Shultz, S. R., Aziz, N. A., Yang, L., Sun, M., Macfabe, D. F., O'Brien, T. J. (2015) Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric metabolite implicated in autism, induces social abnormalities that do not differ between seizure-prone (FAST) and seizure-resistant (SLOW) rats. *Behav Brain Res*. **278**, 542–548.

Sommer, F., Anderson, J.M., Bharti, R., Raes, J., Rosenstiel, P. (2017) The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol*. **15**, 630-638.

Song, Y., Liu, C., Finegold, S. M. (2004). Real-time PCR quantitation of *Clostridia* in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol*. **70**, 6459–6465.

Thomas, V., Clark, J., Dore, J. (2015) Fecal Microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiol*. **10**, 1485-1504.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**, 1027–1131.

Van den Abbeele, P., Belzer, C., Goossens, M., Kleerebezem, M., De Vos, W.M., Thas, O., De Weirtdt, R., Kerckhof, F.M., Van de Wiele, T. (2013) Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J*. **7**, 949–961.

Wehkamp, J. (2004) NOD2 (CARD15) mutations in crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* **53**, 1658–1664.

Wiele, T.V., Abbeele, P.V, Ossieur, W., Possemiers, S., Marzorati, M. (2015) The simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME®). U:Verhoeckx K. i sur., (Ur.) The Impact of Food Bioactives on Health. Springer, Cham.

Xia, Y., Sun, J., Chen, D. (2018) Statistical Analysis of Microbiome Data with R, Springer, Singapore, str. 129–166.

Xiao, Y., Angulo, M.T., Lao, S., Weiss, S.T., Liu, Y.-Y. (2020) An ecological framework to understand the efficacy of fecal microbiota transplantation. *Nat Commun.* **11**, 3329.

Yatsunenکو, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227.

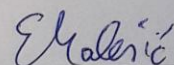
Zar, F.A., Bakkanagari, S.R., Moorthi, K.M.L.S.T., Davis, M.B. (2007) A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis.* **45**, 302–307.

Zhang, T., Li, Q., Cheng, L., Buch, H., Zhang, F. (2019) *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic. *Microb Biotechnol.* **12**, 1109-1125.

Zoetendal, E.G., Raes, J., van den Bogert, B., Arumugam, M., Booijink, C.C.G.M., Troost, F.J., Bork, P., Wels, M., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. (2012) The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J.* **6**, 1415–1426.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*



*Elena Malešić*