

# Izrada sustava za generiranje izvještaja analiza humanog crijevnog mikrobioma

---

Šerbečić, Selma

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:151058>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2023.

Selma Šerbečić

**IZRADA SUSTAVA ZA  
GENERIRANJE IZVJEŠTAJA  
ANALIZA HUMANOG CRIJEVNOG  
MIKROBIOMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakultet Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Janka Diminića te uz pomoć izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka pri izradi.

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Janku Diminiću i izv. prof. dr. sc. Jurici Žučku na strpljenju, vodstvu, savjetima i utrošenom vremenu tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Također, veliko hvala obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom studiranja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Biotehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Molekularna biotehnologija

### IZRADA SUSTAVA ZA GENERIRANJE IZVJEŠTAJA ANALIZA HUMANOG CRIJEVNOG MIKROBIOMA

*Selma Šerbečić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0113144230*

**Sažetak:** Posljednjih godina crijevnoj mikrobioti čovjeka posvećuje se sve veća pozornost budući da mikroorganizmi koji nastanjuju gastrointestinalni trakt imaju važnu ulogu u bolesti i zdravlju domaćina. Kod zdravog pojedinca sastav crijevne mikrobiote relativno je stabilan, ali je podložan različitim čimbenicima koji mogu dovesti do disbioze crijeva što za posljedicu može imati razvoj određenih bolesti. U ovom radu nakon sekvenciranja umnoženih gena podaci su obrađeni u QIIME 2 programu te Microsoft Excelu nakon čega se koristio generirani automatizirani Word kako bi svaki ispitanik dobio izvještaj o sastavu crijevne mikrobiote. Analizom dobivenih rezultata istraživane populacije ustanovljeno je da su *Firmicutes* i *Bacteroidetes* dva najdominantnija koljena, a *Bacteroides* najzastupljeniji bakterijski rod koji je detektiran kod svih ispitanika. S druge strane, rod *Prevotella* detektiran je kod samo 4 ispitanika.

**Ključne riječi:** *crijevna mikrobiota, QIIME program, Microsoft Excel, Microsoft Word*

**Rad sadrži:** 47 stranica, 17 slika, 7 tablica, 59 literaturnih navoda, 1 prilog

**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. Janko Diminić

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Janko Diminić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjenski član)

**Datum obrane:** 27. veljače 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university programme:** Molecular Biotechnology

DEVELOPMENT OF A SYSTEM FOR GENERATION OF HUMAN INTESTINAL MICROBIOME  
ANALYSIS REPORTS

*Selma Šerbečić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0113144230*

**Abstract:** In recent years, the human intestinal microbiota has received increasing attention, since the microorganisms that inhabit the gastrointestinal tract play an important role in diseases and health of the host. In a healthy individual, the composition of the intestinal microbiota is relatively stable, but it is liable to various factors that can lead to intestinal dysbiosis, which can result in the development of certain diseases. In this work, after the amplified genes were sequenced, the data were processed in the QIIME 2 program and Microsoft Excel, after which the generated automated Word was used to give each subject a report on the composition of the intestinal microbiota. Analyzing the results of the researched population, it was established that *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the two most dominant phylum, and *Bacteroides* is the most represented bacterial genus which was detected in all subjects. On the other hand, the genus *Prevotella* was detected in only 4 subjects.

**Keywords:** *gut microbiota, QIIME pipeline, Microsoft Excel, Microsoft Word*

**Thesis contains:** 47 pages, 17 pictures, 7 tables, 59 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Janko Diminić, PhD, Associate professor

**Reviewers:**

1. Jurica Žučko, PhD, Associate professor (president)
2. Janko Diminić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (member)
4. Jasna Novak, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** February 27<sup>th</sup>, 2023

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA ČOVJEKA</b> .....	2
<b>2.2. FUNKCIJA CRIJEVNE MIKROBIOTE</b> .....	3
<b>2.3. ODREĐIVANJE SASTAVA MIKROBIOTE</b> .....	5
2.3.1. Metode bazirane na sekvenciranju .....	5
<b>2.4. OMJER FIRMICUTES/BACTEROIDETES</b> .....	7
<b>2.5. FAKTORI KOJI UTJEČU NA MIKROBIOTU CRIJEVA</b> .....	8
2.5.1. Hrana.....	9
2.5.2. Antibiotici .....	10
2.5.3. Utjecaj tjelovježbe.....	11
<b>2.6. BOLESTI POVEZANE S MIKROBIOTOM</b> .....	11
2.6.1. Rak debelog crijeva i želuca .....	12
2.7.2. Upalne bolesti crijeva.....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	14
<b>3.1. PROTOKOL ZA IZOLACIJU I SEKVENCIRANJE DNA</b> .....	14
<b>3.2. OBRADA PODATAKA SEKVENCIRANJA QIIME 2 PROGRAMOM</b> .....	16
<b>3.3. OBRADA PODATAKA MICROSOFT EXCELOM</b> .....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	23
<b>4.1. SIROVI PODACI</b> .....	23
<b>4.2. IZRADA IZVJEŠTAJA ZA SVAKOG ISPITANIKA</b> .....	26
<b>4.3. FINALNI IZVJEŠTAJ ZA ISPITANIKE</b> .....	34
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	40
<b>6. LITERATURA</b> .....	41
<b>7. PRILOZI</b>	

# 1. UVOD

Nakon završetka Projekta ljudskog genoma 2003., znanstvenici su shvatili da dekodiranje ljudskog genoma nije dovoljno za razumijevanje ljudske biologije budući da postoji veliki broj mikroorganizama koji žive na i u ljudskom tijelu i znatno utječu, pozitivno i negativno, na ljudski život. Stoga su započeli novi projekt kojemu je fokus ljudski crijevni mikrobiom. Mikroorganizmi koji nastanjuju gastrointestinalni trakt čovjeka imaju važnu ulogu u zdravlju i bolesti domaćina. Kako bi se bolje razumjela njihova uloga veliki broj znanstvenika istražuje što čini „dobar“ crijevni mikrobiom, koji su mikroorganizmi korisni, a koji potencijalno štetni za domaćina te mogu uzrokovati bolesti.

U ovom radu ukratko je objašnjena crijevna mikrobiota čovjeka, njezina funkcija, čimbenici koji utječu na nju, povezanost s određenim bolestima te način određivanja crijevne mikrobiote. Današnji tehnološki razvoj molekularnih alata i tehnika omogućio je znanstvenicima detekciju i identifikaciju raznih bakterijskih vrsta koje nije moguće uzgojiti u laboratorijskim uvjetima te razumijevanje njihovih uloga u normalnom radu organizma domaćina. Kod zdravih osoba sastav crijevne mikrobiote relativno je stabilan, ali je on podložan različitim promjenama uslijed različitih čimbenika poput prehrane i okoline. Razumijevanje interakcija nutrijent-domaćin-mikrobiom omogućava otkrivanje zastupljenosti određenih bakterijskih rodova, povezanost s određenim bolestima te u budućnosti mogućnost prevencije različitih bolesti manipulacijom crijevnog mikrobioma ili promjenom prehrane.

Cilj ovog rada bio je obrada bioloških podataka u Microsoft Excelu te automatiziranje i popunjavanje predloška u Microsoft Wordu. Provedeno je sekvenciranje 16S rRNA pomoću Illumina MiSeq uređaja nakon čega su podaci obrađeni u QIIME 2 programu i Microsoft Excelu koji su služili za popunjavanje predloška u Microsoft Wordu koji je poslan svakom ispitaniku. Dobiveni izvještaji pružaju svakom ispitaniku uvid u zastupljenost pojedinih bakterija na različitim taksonomskim razinama te njihov značaj.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA ČOVJEKA

Ljudsko tijelo je ekosustav koji se sastoji od ljudskih stanica i trilijuna mikroorganizama koji koloniziraju cijelo ljudsko tijelo kao što su: usna šupljina, koža, urinarni i gastrointestinalni trakt. Pojam „mikrobiota“ odnosi se na sve mikroorganizme (arheje, bakterije, eukariotske mikrobe, viruse i bakteriofage) koji se nalaze na određenom mjestu kao što je primjerice gastrointestinalni trakt, dok se pojam „mikrobiom“ odnosi na zbirku cjelokupne genetske informacije mikrobiote (Valdes i sur., 2018). Iako se ovi termini često koriste naizmjenice mora se naglasiti da nisu sinonimi i da ih treba razlikovati pri upotrebi. Crijevnu mikrobiotu sačinjavaju mikroorganizmi koji se nalaze u crijevima i žive u simbiozi s domaćinom, a nazivaju se još i komenzalnim ili prijateljskim bakterijama jer sprječavaju nekontrolirano širenje patogenih bakterija.

Gastrointestinalni trakt čovjeka predstavlja jednu od najvećih interaktivnih površina (250-400 m<sup>2</sup>) između domaćina, okolišnih čimbenika i antigena u čovjekovom tijelu. On pospješuje procese probave i apsorpcije i služi kao površina na koju se mikroorganizmi vežu i koloniziraju je. Tijekom života, kroz čovjekov gastrointestinalni trakt prođe oko 60 tona hrane zajedno s mikroorganizmima. Fiziološki uvjeti poput pH, sadržaja žuči i vremena prolaska pridonose različitim mikrobnim zajednicama koje nastanjuju gastrointestinalni trakt. Za razliku od mnogih organa u tijelu, ljudski gastrointestinalni trakt sadrži trilijune mikroorganizama. Procjenjuje se da ljudski gastrointestinalni trakt nastanjuje više od 10<sup>14</sup> mikroorganizama (Thursby i Juge, 2017), pa tako humani mikrobiom ima i do stotinu puta veći broj gena od ljudskog genoma (Rossen i sur., 2018). Humani genom broji oko 23 000 funkcionalnih gena, dok bakterijskih gena ima oko 3 milijuna. Geni mikroorganizama kodiraju za različite mikrobne metabolite koji se otpuštaju u crijeva domaćina, apsorbiraju i distribuiraju tijelom te svojim funkcijama doprinose metabolizmu domaćina.

Mikroorganizmi koji nastanjuju gastrointestinalni trakt uvelike doprinose ljudskom zdravlju i dobrobiti, a najzastupljenije bakterije u normalnom, zdravom probavnom sustavu čovjeka su iz *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (sinonim *Bacteroidota*) koljena (Yang i sur., 2009), zatim slijede *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia* (Jandhyala i sur., 2015). Mikroorganizmi imaju brojne

uloge, a neke od njih su da služe kao prepreka protiv proliferacije patogenih mikroorganizama, pomažu u razvoju imunološkog sustava, oblikuju crijevni epitel, imaju važnu ulogu u apsorpciji hranjivih tvari i minerala, sintezi vitamina, aminokiselina i enzima, razgradnji toksina i lijekova te proizvodnji kratkolančanih masnih kiselina (engl. *short chain fatty acids*, SCFA). Glavne SCFA koje nastaju su acetat, propionat i butirat koje osiguravaju energiju epitelnim stanicama i poboljšavaju integritet epitelne barijere. Poznato je da naš crijevni mikrobiom evoluirao s nama i da promjene u ovoj populaciji mogu imati velike posljedice, korisne, ali i štetne po ljudsko zdravlje te da na njegov sastav utječu brojni čimbenici kao što su: prehrana, način života, genetika, starosna dob i ostalo. Stoga može doći i do narušavanja mehanizama što za posljedicu ima promjenu mikrobnog sastava poznatog kao disbioza (Thursby i Juge, 2017). U slučaju disbioze i narušavanja homeostaze, mikroorganizmi mogu izazvati bolesti. Ovi podaci govore koliko je mikrobiota i njezina raznolikost važna u ljudskom organizmu. Nedavno visokoproduktivno sekvenciranje neovisno o kulturi uvelike je proširilo repertoar poznatih mikroba u našem tijelu i doprinijelo boljem razumijevanju uloge mikroorganizama u ljudskom tijelu jer se samo mali dio mikroorganizama može uzgajati.

## **2.2. FUNKCIJA CRIJEVNE MIKROBIOTE**

Ključne funkcije mikroorganizama koji nastanjuju ljudski gastrointestinalni trakt povezane su s metabolizmom, regulacijom imunološkog sustava i zaštitom od patogena. Različiti geni unutar mikrobne zajednice osiguravaju veliki broj enzima i biokemijskih puteva koji se razlikuju od domaćinovih. Pa tako, mikrobi koji nastanjuju probavni sustav domaćina mogu stvarati hranjive tvari iz supstrata koje domaćin ne može probaviti. Primjerice, ksiloglukan koji se nalazi u povrću kao što je zelena salata i luk probavlja određena *Bacteroides* vrsta. 92 % osoba sadrži barem jednu *Bacteroides* vrstu koja je sposobna razgraditi ksiloglukan. Fermentacijom ugljikohidrata, u debelom crijevu, nastaju kratkolančane masne kiseline: butirat, propionat i acetat koje su bogat izvor energije za domaćina, važne su za modulaciju imunološkog odgovora i tumorigenezu u crijevima (Shreiner i sur., 2015). Acetat proizvode mnoge bakterije dok kod proizvodnje butirata prevladavaju bakterije *Firmicutes* koljena, a kod propionata *Bacteroides* vrste (Rowland i sur., 2018). Crijevna mikrobiota bitna je također u sintezi mikronutrijenata kao što je vitamin K i većina članova vitamina B skupine topljivih u vodi. Vitamin K koji je neophodan u podizanju lipoproteina visoke gustoće (engl. *High density lipoproteins*, HDL) i snižavanju

kolesterola, anaerobno sintetiziraju bakterije: *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium lentum*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterococcus faecium*. Vitamine B5 i B12 sintetizira isključivo crijevna mikrobiota, a djeluju kao koenzimi i potrebni su za normalno funkcioniranje živčanog sustava (Rossen i sur., 2018).

Nadalje, mikroorganizmi koji nastanjuju gastrointestinalni trakt bitni su u zaštiti domaćina. Mnoge bakterije izravno inhibiraju patogene natječući se za hranjive tvari ili potičući proizvodnju inhibicijskih tvari poput bakteriocina i antimikrobnih tvari. Primjerice, komenzalna bakterija *Bacteroides thetaiotaomicron* koristi ugljikohidrate koje koristi i patogen *Citrobacter rodentium* što dovodi do kompetitivnog isključivanja patogena iz crijeva. Zatim, proizvodnjom kratkolančanih masnih kiselina kao što je butirrat, smanjuje se ekspresija nekoliko gena virulencije *Salmonella enterica*. Lučenjem bakteriocina, turicin CD kojeg proizvodi bakterija *Bacteroides thuringiensis*, izravno se cilja na bacile i klostridije koje stvaraju spore. Još jedan od mehanizama crijevne mikrobiote koji ima izravan inhibitorski učinak na patogene je proizvodnja žučne kiseline. Žučnu kiselinu proizvedenu u jetri, a zatim dopremljenu u dvanaesnik modificira crijevna mikrobiota u veliki broj sekundarnih žučnih kiselina koje mogu djelovati kao antibakterijski čimbenici. Pokazano je da iscrpljivanjem mikroba uključenih u konvertiranje primarnih žučnih kiselina u sekundarne pogoduje kolonizaciji gastrointestinalnog trakta bakterijom *C. difficile* (Rolhion i Chassaing, 2016).

Još jedna važna uloga crijevne mikrobiote je u pobuđivanju, obuci i regulaciji imunološkog odgovora. Interakcije između mikroba i imunološkog sustava ovise o metabolitima i receptorima koji aktiviraju ili inhibiraju signalne puteve koji mogu biti korisni ili štetni za zdravlje domaćina. Mikrobiota se uspostavlja tijekom rođenja i sklona je fluktuacijama zbog promjene okoliša i prehrane, a nakon 2-3 godine starosti mikrobna zajednica se stabilizira. Istraživanja na miševima bez mikroorganizama (engl. *germ free*, GF) pokazala su da tijekom ranog postnatalnog razdoblja važnu ulogu u sazrijevanju imunološkog sustava ima interakcija između imunološkog sustava i crijevne mikrobiote. GF miševi, iako postoji razlika i varijante, su miševi bez prisustva ikakvih mikroorganizama, okoćeni carskim rezom i potom stavljeni u izolator koji sprječava izlaganje miševa mikroorganizmima. Hrana, voda i zrak koju miševi koriste moraju biti sterilni. Kod takvih miševa pokazano je da odsutnost crijevne mikrobiote ima dubok učinak na strukturni i funkcionalni razvoj imunološkog sustava. Negativno utječe na formiranje limfoidnih organa, te

utječe na smanjen broj CD4 stanica, smanjenu proizvodnju IgA i manje Th1 stanica. Strukturne abnormalnosti bile su najupečatljivije u blizini sluznice što govori da interakcije mikroba izravno moduliraju razvoj limfnih struktura povezanih s crijevima (eng. *Gut-associated lymphoid structures*, GALTs). Th1 odgovori mogu se obnoviti kolonizacijom domaćina različitim mikroorganizmima, primjerice *Listeria monocytogenes* potiče razvoj Th1 kroz makrofagnu proizvodnju faktora stimulacije T stanica, interleukina 12 (Tibbs i sur., 2019). Pokazano je da bakterije reda *Clostridiales*, segmentirane filamentozne bakterije, specifično induciraju diferencijaciju mukoznih Th17 stanica u lamini propriji crijeva, one zauzvrat luče proupalne citokine IL-17 i IL-22. IL-22 inducira proizvodnju antimikrobnih proteina pa miševi kojima su davane segmentirane filamentozne bakterije bili su otporniji na infekciju s *C. rodentium* (Sassone-Corsi i Raffatellu, 2015).

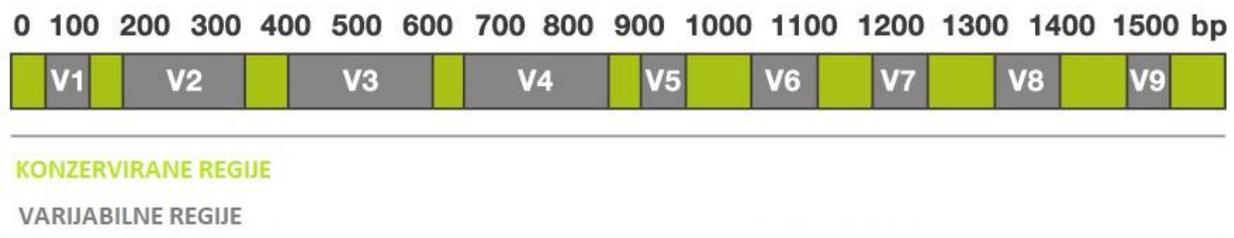
### **2.3. ODREĐIVANJE SASTAVA MIKROBIOTE**

Posljednjih godina postalo je jasno da su taksonomska i funkcionalna raznolikost mikrobiote uvelike podcijenjene. Svojstva ljudskog mikrobioma i interakcija između domaćina i mikrobiote uglavnom su bile nepoznate zbog tehnoloških ograničenja, posebice kod mikroorganizama koji se ne mogu uzgajati. Razumijevanje mikrobiote evoluiralo je tijekom godina, prvenstveno zbog metoda identifikacije mikroorganizama koje su doživjele velike promjene tijekom vremena. Prije razvoja molekularnih metoda koristile su se metode kojima su izolirane čiste stanične kulture, nakon čega je slijedila fenotipizacija uzgojenih bakterija korištenjem morfoloških i biokemijskih karakteristika. Nedostatci ove metode su: nemogućnost uspostave složenih uvjeta crijevnog okoliša i nemogućnost kultiviranja velikog broja bakterija. Kako bi se prevladala ova ograničenja, razvijeno je nekoliko molekularnih pristupa. Odabir metode ovisi o vrsti uzorka, njegovoj kvaliteti, cijeni eksperimenta i podacima koje znanstvenici žele dobiti. Posljednja dva desetljeća, nakon otkrića 16S rRNA i pojave visokoučinkovitih metoda sekvenciranja, crijevni mikrobiom uvelike je zainteresirao znanstvenike.

#### **2.3.1. Metode bazirane na sekvenciranju**

Metode bazirane na sekvenciranju koje se koriste u istraživanju mikrobioma uključuju razne pristupe – sekvenciranje amplikona, metagenoma i metatranskriptoma.

Sekvenciranje amplikona podrazumijeva sekvenciranje umnoženih sljedova gena PCR (engl. *polymerase chain reaction*) tehnikom, u našem slučaju 16S rRNA gena. 16S rRNA geni prisutni su u gotovo svim bakterijama, kodiraju za malu podjedinicu ribosoma, dugački su oko 1500 nukleotida i sastoje se od konzerviranih i 9 hipervarijabilnih regija (V1-V9) što je prikazano na slici 1. Varijabilne regije koriste se za taksonomsku klasifikaciju različitih mikrobnih organizama te pružaju informacije o njihovom smještaju unutar taksonomske hijerarhije, uključujući organizme koji se ne mogu uzgojiti u laboratoriju, dok prisutnost konzerviranih regija omogućuje dizajniranje početnica (Thomas, 2015). Sekvenciranje 16S rRNA gena započinje izolacijom DNA iz uzorka, nakon toga slijedi PCR gdje se koriste početnice koje ciljaju specifičnu regiju gena kako bi se umnožio određeni dio gena, zatim slijedi sekvenciranje i analiza podataka. 16S rRNA jedan je od najčešće korištenih markera jer je (i) prisutan u gotovo svim bakterijama, (ii) funkcija gena tijekom vremena je nepromijenjena i (iii) dovoljno je velik za informacijske analize. Sekvenciranje amplikona je jeftino, može se primjenjivati na uzorke kontaminirane domaćinovu DNA i ne zahtjeva prethodnu bakterijsku kulturu, ali je najčešće ograničeno nedovoljnom rezolucijom dobivenih podataka.



**Slika 1.** Prikaz 16S rRNA gena s konzerviranim i varijabilnim regijama (*prema Fasesan i sur., 2020*)

Metoda metagenomskog sekvenciranja sekvencira svu DNA prisutnu u uzorku. Omogućuje proučavanje bakterija, gljivica, DNA virusa i drugih mikroba. Proširuje taksonomsku rezoluciju na vrstu ili razinu soja i omogućava sklapanje cijelih mikrobnih genoma iz kratkih čitanja sekvenci DNA. Međutim, ova metoda ne može razlikovati dolazi li genomska DNA iz stanica koje su vijabilne ili ne, te je relativno skupa priprema, sekvenciranje i analiza uzorka (Qian i sur., 2020).

Metatranskriptomsko sekvenciranje koristi RNA za profiliranje transkripcije u mikrobiomima i tako daje informacije o ekspresiji gena. Metatranskriptomika omogućuje bolji uvid u usporedbi s metagenomikom, budući da može otkriti detalje o populacijama koje su transkripcijski aktivne, a ne samo identificirati genetski sadržaj bakterijskih populacija. Uključuje izolaciju ukupne RNA iz bakterija koje koloniziraju područje od interesa. Ukoliko se radi o eukariotskoj RNA, ona se može selektirati sintetiziranjem cDNA pomoću oligo-d(T) početnica jer eukariotska RNA sadrži poli-A rep. S druge strane, prokariotska RNA nema poli-A rep pa su razvijeni različiti pristupi za rješavanje ovog problema. Nedostatci ove metode su: izolacija visokokvalitetnih uzoraka RNA iz nekih bioloških uzoraka, mogućnost kontaminacije s domaćinovom RNA (biopsija) što za posljedicu ima povećanje troškova i komplikacije pri analizi podataka, mRNA ima kratak poluživot pa može biti teško detektirati brze kratkotrajne odgovore na okoliš te prisutnost mRNA nije uvijek sinonim za prisutnost proteina (Bashiardes i sur., 2016).

#### **2.4. OMJER FIRMICUTES/BACTEROIDETES**

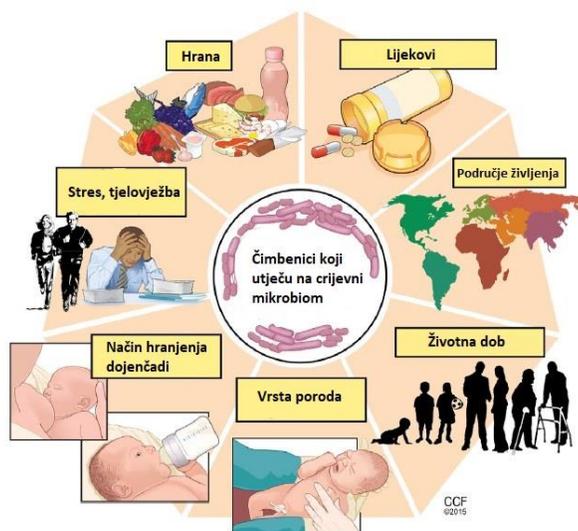
Opisivanje sastava i složenosti crijevne mikrobiote važno je za definiranje njezinih učinaka na cjelokupno ljudsko zdravlje. Ljudska crijevna mikrobiota uglavnom se sastoji od dva dominantna bakterijska koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, uključujući i druga subdominantna koljena: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* i *Tenericutes*. *Firmicutes* i *Bacteroidetes* kod zdravih osoba predstavljaju otprilike 90 % cjelokupnog sastava crijevne mikrobiote (Stojanov i sur., 2020). Ni u jednom drugom ekosustavu ova dva tipa se ne manifestiraju na tako dominantan način. Na sastav crijevne mikrobiote uglavnom ne utječu akutni poremećaji jer mu njegova plastičnost omogućava brzi povratak na početni sastav. Međutim, kontinuirana izloženost različitim čimbenicima poput stresa, konzumacije prehrambenih aditiva i zagađivača kao što su teški metali, antibiotici, organski zagađivači i mikotoksini mogu kronično promijeniti sastav te rezultirati disbiozom. Disbioza crijeva povezana je s različitim patološkim stanjima koja utječu na gastrointestinalni trakt, imunološki sustav, središnji živčani sustav te energetske metabolizam domaćina.

Omjer *Firmicutes/Bacteroidetes* ima važan utjecaj u održavanju normalne crijevne homeostaze te je povezan s nekoliko patoloških stanja. Stoga je karakterizacija bakterijskih populacija uključenih u disbiozu važna jer bi mogla pomoći u usvajanju alternativnih strategija kod upravljanja bolesti. Na primjer, povećanje patogenih vrsta moglo bi se liječiti ciljanim

antimikrobnim terapijama, a nestanak korisnih bakterija mogao bi se riješiti primjenom specifičnih probiotika (Magne i sur., 2020). Povećanje broja specifičnih vrsta *Firmicutes* i *Bacteroidetes* dovodi do pretilosti i upale crijeva. *Firmicutes* koljeno uključuje Gram-pozitivne bakterije s krutim ili polu-krutim staničnim stijenkama koje su pretežno iz rodova *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* i *Ruminococcus*. S druge strane, koljeno *Bacteroidetes* obuhvaća oko 7000 različitih vrsta Gram-negativnih bakterija koje su pretežno iz rodova *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides* i *Prevotella*. Pokazano je da je najvarijabilnije koljeno *Proteobacteria* koje pridonosi disbiozi i korelira sa smanjenjem *Firmicutes* koljena i općom mikrobnom raznolikošću kod upalne bolesti crijeva. Pripadnici *Bacteroidetes* koljena uglavnom nastanjuju distalni dio crijeva i kodiraju veliki broj enzima aktivnih na ugljikohidratima pa tako sudjeluju u opskrbi energije dobivene fermentacijom neprobavljivih polisaharida (Stojanov i sur., 2020; Johnson i sur., 2017).

## **2.5. FAKTORI KOJI UTJEČU NA MIKROBIOTU CRIJEVA**

Tijekom godina može doći do promjene crijevne mikrobiote uslijed različitih čimbenika kao što su prehrana, genetika domaćina, dob, način života, upotreba antibiotika, posjedovanje kućnih ljubimaca i ostalo. Svi navedeni čimbenici u konačnici utječu na sastav, raznolikost i funkcionalnost crijevnog mikrobioma. Promjene mogu dovesti i do poremećaja u crijevnoj mikrobioti koji je povezan s nekoliko bolesti uključujući upalne bolesti crijeva, alergije, pretilost, dijabetes, kardiovaskularne bolesti. Moduliranjem sastava i raznolikosti, kao što je korištenje probiotika, prebiotika i transplantacijom fekalne mikrobiote, mogu se postići povoljne promjene u strukturi i funkcijama mikrobiote (Hasan i Yang, 2019). U nastavku su opisani i prikazani na slici 2 neki od faktora koji utječu na mikrobiotu crijeva.



**Slika 2.** Ćimbenici koji utjeĉu na crijevnu mikrobiotu (prema Cresci i Izzo, 2018)

### 2.5.1. Hrana

Najĉešći i glavni sastojci u ljudskoj prehrani su proteini, masti i ugljikohidrati, a njihova vrsta i koliĉina utjeĉu na sastav crijevne mikrobiote. Ugljikohidrati su glavni izvor energije kod ljudi i dijele se na probavljive i neprobavljive ugljikohidrate. Probavljivi ugljikohidrati, škrob i šećeri (glukoza, fruktoza, saharoza, laktoza), razgradit će se u tankom crijevu pomoću enzima. Pokazano je da prehrana bogata glukozom, fruktozom i saharozom iz datulja povećava broj *Bifidobacteria* i smanjuje broj roda *Bacteroides*. Uloga neprobavljivih ugljikohidrata (vlakna, rezistentni škrob) je da sluŹe kao energija mikrobima koji se nalaze u debelom crijevu, sprjeĉavaju adheziju patogenih mikroba te potiču imunološko sazrijevanje i daju smjernice u sazrijevanju crijevnog mikrobioma. U tu svrhu, u Kini, proizvode se galaktooligosaharidi i fruktooligosaharidi koji se dodaju formulama za dojenĉad. Fermentacijom vlakana u debelom crijevu smanjuje se pH na 5,5-6,5 ĉime se usporava rast Gram-negativnih patogena poput *Salmonella* i *Escherichia coli* bakterija. Kod kroniĉnog nedostatka vlakana, crijevni mikrobi probavit će glikoprotein sluzi te erodirati sluznu barijeru debelog crijeva. IstraŹivanja su pokazala da nedostatak dijetalnih vlakana u prehrani moŹe biti uzrok dijabetesa tipa 2. S druge strane, konzumiranje 25-38 g vlakana svaki dan smanjuje rizik od nastajanja dijabetesa tipa 2 za 20-30 % (Su i Liu, 2021; Singh i sur., 2017). Prehrana bogata mastima i proteinima animalnog podrijetla povezana je s većim brojem *Alistipes* i *Bacteroides* vrsta, te smanjenjem *Faecalibacterium* vrste (Kolodziejczyk i sur., 2019).

Također, pokazano je da osobe čija se prehrana bazira na mediteranskoj prehrani, koju karakterizira uravnotežen unos voća, povrća, žitarica i masti, imaju manji broj *Bacillaceae* i *Proteobacteria*, a veći *Clostridium* i *Bacteroidetes*. Nadalje, vegetarijanska prehrana prepoznata je kao zdrava i korisna jer štiti domaćina od raznih kroničnih, metaboličkih i upalnih poremećaja. Kod djece koja su se hranila vegetarijanskom hranom bogatom biljnim polisaharidima, vlaknima i škrobom primijećeno je znatno povećanje broja *Firmicutes*, *Xylanibacter*, *Bacteroidetes* i *Prevotella* bakterija u usporedbi s djecom koja su jela europsku hranu bogatu ugljikohidratima. S druge strane, visoke koncentracije amonijaka povezane su s razvojem malignih izraslina. Štakori hranjeni hranom bogatom proteinima izoliranih iz sirutke ili onom s cisteinom ili treoninom rezultirali su značajnim povećanjem broja *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* rodova u njihovom izmetu (Riaz Rajoka i sur., 2017).

### 2.5.2. Antibiotici

Jednim od najvećih medicinskih napredaka 20. stoljeća smatra se razvoj antibiotika koji se koriste za sprječavanje proliferacije bakterijskih patogena, a time i za liječenje bakterijskih infekcija. Međutim, nagli porast upotrebe antibiotika u 21. stoljeću glavni je razlog za zabrinutost jer antibiotici ne djeluju samo na bakterije koje uzrokuju infekcije. Primjena antibiotika ima negativni učinak na crijevnu mikrobiotu i imunitet domaćina, a ovisi o vrsti antibiotika, njegovom mehanizmu, dozi i vremenu liječenja. Liječenje antibioticima dovodi do veće zastupljenosti gena koji su odgovorni za rezistenciju na antibiotike, promjene bakterijskih metabolita, poremećaja u bakterijskoj signalizaciji i izlučivanju antimikrobnih peptida i deregulacije crijevnih imunoloških stanica (Zhang i sur., 2019).

Korištenjem antibiotika smanjuje se ukupna raznolikost vrsta crijevne mikrobiote, uništavaju se patogeni, ali i korisne bakterije što dovodi do disbioze, odnosno poremećaja u normalnoj crijevnoj mikrobioti i rasta neželjenih mikroorganizama. Antibiotici eliminiraju osjetljive sojeve i daju prednost rasta sojevima otpornim na antibiotike. Istraživanjima se pokazalo kako različiti antibiotici ili njihove kombinacije imaju različite antimikrobne spektre te rezultiraju različitim promjenama u mikrobiomu. Na primjer, klindamicin je jedan od najčešće korištenih antibiotika širokog spektra. On cilja anaerobne bakterije koje su ključne za održavanje zdravih crijeva što uzrokuje promjenu u crijevnoj mikrobioti i dovodi do prekomjernog rasta *Clostridium difficile*, a posljedica je mogući pseudomembranozni kolitis (Yang i sur., 2021). U liječenju

*Helicobacter pylori* gdje se upotrebljava klaritromicin dolazi do smanjenja populacije *Actinobacteria* (Jakobsson i sur., 2010), a vankomicin smanjuje fekalnu mikrobnu raznolikost i apsolutni broj Gram-pozitivnih bakterija, posebice *Firmicutes* vrste (Zhang i sur., 2019). Također, pokazano je da korištenje antibiotika u djetinjstvu povezano s razvojem pretilosti, astme, alergija i IBD (engl. *inflammatory bowel disease*) kasnije u životu (Ramirez i sur., 2020).

### 2.5.3. Utjecaj tjelovježbe

Tjelesna aktivnost ima vrlo bitnu ulogu u prevenciji niza bolesti. Ključna je za održavanje metaboličke i kardiovaskularne kondicije te poboljšanje mentalnog zdravlja. Nedavna istraživanja pokazala su da se tjelesnom aktivnošću povećava raznolikost mikrobiote, odnosno udio mikroorganizma i metabolita koji doprinose zdravlju crijeva. Povećana bioraznolikost povezuje se s boljim zdravljem, dok je smanjena bioraznolikost povezana s gastrointestinalnim bolestima poput IBD i IBS (engl. *irritable bowel syndrome*).

Clarke i sur. proveli su istraživanje kod profesionalnih igrača ragbija i ustanovili da igrači imaju veću alfa raznolikost od skupine ljudi koja se ne bavi nikakvom tjelesnom aktivnošću. Zatim, istraživanje provedeno kod žena koje su vježbale najmanje 3 sata tjedno pokazalo je da imaju veći broj *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia hominis*, *Akkermansia muciniphila*. *F. prausnitzii* i *R. hominis* vrsta koje su poznate po proizvodnji butirata, a *Akkermansia muciniphila* se povezuje s poboljšanim metaboličkim zdravljem. Sportaši pokazuju niže razine bakterija iz *Bacteroidetes* i veći broj iz *Firmicutes* koljena (Gomaa, 2020; Mailing i sur., 2019). S druge strane, važno je znati da iscrpljujuće tjelesne aktivnosti mogu dati suprotne rezultate, potičući disbiozu koja pogoduje upali i stvara negativne posljedice poput dehidracije, imunosupresije i povećane propusnosti crijeva (Wegierska i sur., 2022).

## 2.6. BOLESTI POVEZANE S MIKROBIOTOM

„Sve bolesti počinju u crijevima“ – izreka je starogrčkog liječnika Hipokrata od prije gotovo 2500 godina. Mikrobiota crijeva nedavno je postala glavni predmet kliničkih istraživanja. Crijevni mikrobi mogu biti potencijalno štetni ukoliko dođe do disbioze crijeva što može uzrokovati različite bolesti poput kardiovaskularnih, bolesti dišnog sustava, dijabetesa, IBD-a mozga, raka, bolesti jetre, itd. Disbioza se odnosi na neuravnoteženost mikrobnih vrsta, obično se povezuje s oštećenom funkcijom crijevne barijere i upalnom aktivnošću. Glavne karakteristike

disbioze su gubitak korisnih mikroba, širenje štetnih mikroorganizama i gubitak mikrobne raznolikosti. Mikroorganizmi proizvode metabolite koji su pokretači različitih procesa, pa je zdravlje domaćina usko povezano s uravnoteženim odnosom mikroorganizama.

#### 2.6.1. Rak debelog crijeva i želuca

Konsumacija prerađenog mesa ili mesa prženog na visokim temperaturama pospješuje nastanak raka jer dolazi do stvaranja mutagenih i kancerogenih spojeva: N-nitrozo spojeva, heterocikličkih amina i policikličkih aromatskih ugljikovodika. Zabilježeno je i povećanje bakterijskih vrsta *Alistipes* i *Fusobacteria* koje su uključene u metabolizam aminokiselina. S druge strane, kod osoba koje su konzumirale bijelo meso zabilježene su korisne bakterije poput *Lactobacillus* roda u većem broju (El-Sayed i sur., 2021). Neprobavljene komponente hrane koje dopijevaju u debelo crijevo anaerobni mikrobi prerađuju i nastaje širok raspon metabolita. Neki od metabolita su korisni poput kratko lančanih masnih kiselina, glukoze, sukcinata, D-laktoze i L-laktoze, dok neki mogu biti i destruktivni. Već spomenuti dušikovi spojevi (N-nitrozo spoj) pokazuju kancerogeni učinak koji imaju potencijal pospješivanja tumorigeneze putem mutacije alkilacijom DNA (Vandana i sur., 2020). Konzumiranjem hrane koja sadrži visok udio životinjskih bjelančevina i masti te nizak udio vlakana povezana je s većim rizikom razvoja raka debelog crijeva, dok prehrana bogata voćem, povrćem i cjelovitim žitaricama smanjuje rizik. Pokazano je da ljudi koji imaju rak debelog crijeva imaju veći broj *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* i *Enterococcus*, a manju količinu *Rothia* bakterija (Gomaa, 2020). Crijevni mikroorganizmi imaju sposobnost voditi karcinogenezu putem metabolita i molekula koje utječu na odgovore domaćinovitih epitelnih i imunoloških stanica. Stoga izlučene molekule mogu služiti kao biomarkeri.

Rak želuca je među najčešćim rakovima kod čovjeka. Korpus predominantni gastritis uzrokuje *Helicobacter pylori* i dovodi do tzv. hipoklorhidrije, odnosno smanjene proizvodnje želučane kiseline što može uzrokovati atrofični gastritis, rani stadij raka želuca. Niska želučana kiselina pogodna je za bakterije koje stvaraju kancerogene N-nitrozo spojeve koji uzrokuju oštećenje DNA i potiču karcinogenezu želuca. Epidemiološka izvješća pokazala su da je visok unos soli povezan s infekcijom *Helicobacter pylori* (Vandana i sur., 2020).

### 2.7.2. Upalne bolesti crijeva

Upalna bolest crijeva (IBD) je kronična imunološki posredovana bolest koja zahvaća gastrointestinalni trakt. Crohnova bolest (engl. *Crohn disease*, CD) i ulcerozni kolitis (engl. *Ulcerative colitis*, UC) svrstavaju se u upalne bolesti crijeva te su postale globalna bolest i predstavljaju jedan od najvećih problema današnjice jer su sve učestalije i obolijevaju osobe različite životne dobi. Tijekom aktivne upale bakterijska raznolikost je smanjena, a sastav crijevnog mikrobioma varira ovisno o lokaciji duž gastrointestinalnog trakta. Uspoređujući osobe oboljele od IBD-a s zdravim osobama, pokazana je bakterijska disbioza karakterizirana: (i) smanjenom raznolikošću crijevne mikrobiote, (ii) smanjenom stabilnošću zajednice, (iii) neuravnoteženošću patogenih i komenzalnih bakterija (smanjenje koljena *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, i povećanjem patogenih *Proteobacteria* bakterija). *Firmicutes* i *Bacteroidetes* su primarni proizvođači energetskih supstrata za crijevne epitelne stanice i protuupalna sredstva, uključujući butirat i druge kratkolančane masne kiseline. Pa tako, fekalni uzorci osoba oboljelih od IBD-a pokazuju smanjenu količinu SCFA. Bakterije iz koljena *Proteobacteria* povezane su s proupalnim stanjem, a uključuju rodove *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Desulfovibrio* i *Helicobacter*. *E.coli* sposobna je pričvrstiti se na mukoznu barijeru i proći kroz nju te napasti epitelni sloj crijeva (Gubatan i sur., 2022; Aldars-García i sur., 2021).

Na razvoj bolesti utječe više parametara poput: (i) raznolikosti mikroba, (ii) neispravne imunoregulacije domaćina, (iii) genetike, (iv) hrane koja se konzumira, (v) okoliša u kojem osoba živi i (vi) ne-bakterijskih članova mikrobiote poput virusa i gljivica. Također je pokazano da hrana ne uzrokuje bolest, ali može pogoršati simptome. Neke od namirnica koje pogoršavaju simptome su kava, alkohol, začinjena i masna hrana, a trenutni lijekovi koji se primjenjuju učinkoviti su u liječenju simptoma, ali se ne bave uzrokom niti selektivno ciljaju područje upale.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

Eksperimentalni dio ovog rada uključuje: (i) izolaciju DNA iz uzorka fecesa, (ii) odabir početnica za umnažanje specifičnih varijabilnih regija od interesa, (iii) pripremu knjižnice odnosno umnažanje specifičnih varijabilnih regija pomoću PCR-a, (iv) sekvenciranje pomoću Illumina MiSeq uređaja i (v) analizu i interpretaciju dobivenih sirovih (engl. *raw data*) podataka pomoću QIIME 2 platforme, obradu podataka unutar Microsoft Excel programa te automatiziranje i popunjavanje izvještaja unutar Microsoft Word dokumenta.

#### **3.1. PROTOKOL ZA IZOLACIJU I SEKVENCIRANJE DNA**

Za izolaciju DNA iz uzorka fecesa praćene su upute „Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System“ u kojima je u 20 koraka opisan postupak izolacije DNA. Ekstrakcija DNA provedena je korištenjem QIAamp PowerFecal DNA Kit-a koji se koristi za brzo, učinkovito i lako pročišćavanje mikrobne i domaćinove DNA. Preporuča se započinjanje s 0,25 g stolice ili drugog čvrstog biološkog materijala. Svaki uzorak se homogenizira u epruveti s kuglicama (engl. *bead tube*), a liza stanica olakšana je mehaničkim sudarima i kemijskim disrupcijama staničnih membrana čime se omogućava učinkovita ekstrakcija. Ukupna genomska DNA zaostaje na silika membrani spin kolone nakon čega se DNA ispiri i eluira s membrane. Izolirana DNA spremna je za daljnje korake, odnosno PCR i sekvenciranje.

Određivanje koncentracije DNA jedan je od ključnih koraka kako bi se dobila optimalna količina DNA koja se koristi prilikom pripreme knjižnice za sekvenciranje i kako bi se postigli kvalitetni rezultati. Za mjerenje koncentracije DNA prije sekvenciranja, korišten je fluorometar Qubit 3.0 koji je prikazan na slici 3 i radi na principu spektrofotometrije, odnosno fluorescencije.



**Slika 3.** Qubit 3.0 fluorometar za mjerenje koncentracije (HTDS, 2022)

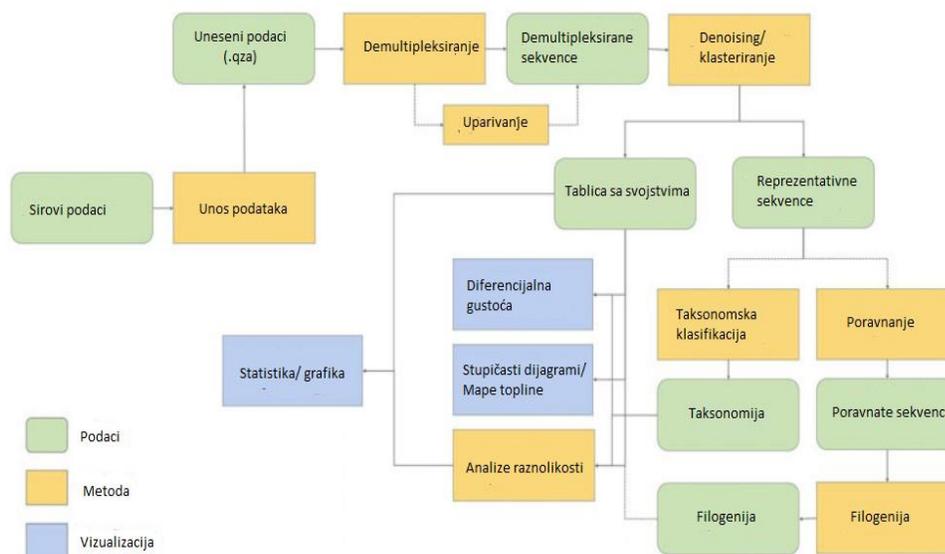
U ovom radu korištena je metoda sekvenciranja sparenih krajeva (engl. *pair-end sequencing*) pomoću Illumina MiSeq uređaja, prikazan na slici 4. Odrađeno je sekvenciranje V3 i V4 varijabilne regije 16S rRNA koje su umnožene u 30 ciklusa PCR-a koristeći mjesno-specifične početnice s adapterima. Korištene početnice su 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' i 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'. PCR je proveden pod sljedećim uvjetima: 95 °C kroz 3 minute, zatim 25 ciklusa na 95 °C po 30 sekundi, 55 °C po 30 sekundi, 72 °C po 30 sekundi i krajnji korak na 72 °C, 5 minuta. Nakon umnažanja PCR produkti provjereni su na 2 % agaroznom gelu, zatim pročišćeni te korišteni za izradu DNA knjižnice koja je sekvencionirana Illumina MiSeq uređajem.



**Slika 4.** Illumina MiSeq uređaj koji se koristi za sekvenciranje DNA (Illumina, 2022)

### 3.2. OBRADA PODATAKA SEKVENCIRANJA QIIME 2 PROGRAMOM

Nakon što su dobiveni rezultati sekvenciranja potrebno ih je obraditi kako bi dobili rezultate taksonomske zastupljenosti prisutnih bakterija. Za obradu rezultata koristio se bioinformatički alat QIIME 2 (engl. *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). To je javno dostupna, bioinformatička platforma koja se koristi za analizu mikrobioma pri čemu prevodi sirove podatke nastale sekvenciranjem u korisne grafičke prikaze i statističke rezultate te se pomoću njih razjašnjava prisutnost mikrobnih zajednica u crijevu čovjeka. Platforma QIIME 2 omogućuje korisnicima razumijevanje podataka, unaprjeđujući transparentnost i ponovljivost. Ovom platformom postiže se klasteriranje sličnih sekvenci, taksonomsko određivanje, kontrola kvalitete, filogenetička rekonstrukcija, izračun mjera raznolikosti te vizualizacija dobivenih rezultata. Koristi se u brojnim istraživanjima što potvrđuje njegovu kvalitetu i pouzdanost. Osim QIIME 2, ostale platforme koje se koriste za analizu 16S rRNA su Megan, USEARCH i mothur. Najnoviju verziju QIIME 2 programa i upute o instalaciji za različite operativne sustave moguće je pronaći na njihovoj mrežnoj stranici (<https://qiime2.org/>). Koraci koji se mogu provesti u QIIME 2 programu prikazani su na slici 5.



**Slika 5.** Prikaz scheme rada QIIME 2 platforme podijeljene u tri kategorije: i) zelenom bojom označeni podaci, ii) žutom metode rada, iii) plavom vizualizacija podataka (QIIME 2, 2022)

Sirovi rezultati dobiveni nakon sekvenciranja obrađeni su u programu QIIME 2 u kojem se koristi FASTQ format. FASTA je tekstualni format koji pohranjuje biološke sekvence kod kojeg Q označava „quality“, pa tako FASTAQ format sadrži podatke o kvaliteti očitavanja svakog nukleotida. Sirovi podaci sekvenciranja dolaze u FASTQ obliku pri čemu jedna datoteka odgovara očitanim sljedovima nukleotida u prednjem (engl. *forward*) načinu čitanja, a druga stražnjem (engl. *reverse*).

QIIME 2 koristi FASTQ rezultate za procese skraćivanja i filtriranja na temelju rezultata kvalitete pri kojemu se uklanja dio koji ne zadovoljava minimalne kriterije kvalitete. Za kvalitativno filtriranje sekvenci, spajanje očitavanja (*forward* i *reverse read*), filtriranje kimeričkih sekvenci koristi se DADA2 algoritam (Kim i sur., 2020). Rezultat DADA2 analize je tablica varijanti amplicon sekvenciranja (engl. *Amplicon Sequence Variants*, ASV) sekvence koje se međusobno razlikuju u jednom nukleotidu. Dobivene sekvence se uspoređuju sa sekvencama iz baze podataka s poznatom taksonomijom. Softverski alati koji dodjeljuju taksonomiju podržavaju različite metode klasifikacije te imaju mogućnost koristiti različite referentne baze podataka genoma poput SILVA i Greengenes. Dobivene taksonomske klasifikacije vizualiziraju se stupčastim dijagramom.

### 3.3. OBRADA PODATAKA MICROSOFT EXCELOM

Podaci obrađeni u QIIME 2 programu dobivaju se u obliku tablice značajki (engl. *feature table*) koja se može izvesti u formatu BIOM („Biological Observation Matrix“) tablice. Biom format je temeljni tip podataka za analize u mikrobnoj ekologiji. On olakšava učinkovito rukovanje i pohranjivanje velikih, rijetkih bioloških tablica. Također, omogućava multipleksiranje temeljnih podataka istraživanja u jednu datoteku te korištenje ovih tablica kod alata koji podržavaju ovaj format ([https://biom-format.readthedocs.io/en/1.1.0/documentation/biom\\_format.html](https://biom-format.readthedocs.io/en/1.1.0/documentation/biom_format.html)). U istraživanjima marker gena primarna upotreba ovog formata je predstavljanje OTU („Operational taxonomic unit“) tablica koje je potrebno analizirati ([https://nephele.niaid.nih.gov/da\\_details/](https://nephele.niaid.nih.gov/da_details/)).

Biom tablica sadržava informacije o sekvencama i taksonomskoj identifikaciji uzorka koje je moguće prenijeti u Microsoft Excel program u obliku .xlsx formata što će biti objašnjeno u narednom dijelu ovoga rada.

Analiza i obrada podataka provedena je uz pomoć Microsoft Excel programa. Kako bi se iz CSV-a (engl. *comma-separated values*) dobili podaci u Excel formatu potrebno je napraviti sljedeće korake:

1. Otvoriti novi Excel dokument, potom odabrati karticu „Podaci“ te kliknuti „Iz teksta“
2. U dijaloškom okviru „Uvoz tekstualne datoteke“ pronađe se i odabere tekstualna datoteka koja se želi uvesti, a zatim se klikne „Uvoz“
3. Potom se otvara „Čarobnjak za uvoz teksta“ u kojem se odabire „Razgraničeni“ te se odabiru graničnici: „Tabulator“ i „Zarez“. Važno je odabrati ispravan graničnik kako bi se podatkovna polja mogla pravilno raščlaniti tijekom uvoza

U Excelu su korištene različite funkcije kako bi se dobili rezultati potrebni za izvještaje. Obradom podataka dobivena je zastupljenost pojedinih bakterija za svaki uzorak na nivou koljena, porodice i roda, omjer koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* i omjer *Prevotella/Bacteroides*. Također je određena i prosječna zastupljenost pojedine bakterije uz pomoć funkcije AVERAGE koja vraća prosjek, odnosno aritmetičku sredinu argumenta. U tablicama gdje je bilo potrebno navesti 10 najzastupljenijih bakterijskih porodica ili bakterijskih rodova kod pojedinca korištena je funkcija LARGE koja koristi sljedeće argumente:

- polje (engl. *array*) - označava polje ili raspon podataka za koje želimo odrediti najveću vrijednost
- k - predstavlja cijeli broj koji navodi poziciju od najveće vrijednosti u nizu

Stoga je upisana funkcija LARGE te je odabran raspon podataka unutar kojeg će se odrediti najveća vrijednost, a k-1 označava da je potrebno odrediti najveći broj unutar raspona. Stupci koji se označavaju slovima zaključani su upisivanjem „\$“ ispred. Za određivanje drugog najvećeg broja u odabranom rasponu umjesto k-1 upisuje se k-2, itd. Ukoliko se pojavi #NUM pogreška to označava da je polje prazno ili  $k \leq 0$  ili veće od broja podatkovnih točaka. Nakon što je dobiveno 10 najvećih vrijednosti za svakog pojedinca potrebno je dodijeliti naziv bakterije koja predstavlja svaku pojedinu vrijednost. Za to je korištena formula INDEX MATCH koja je kombinacija dviju funkcija te je alternativa VLOOKUP funkciji koji ima određena ograničenja poput:

- traženja vrijednost slijeva nadesno pa je potrebno obratiti pažnju prilikom izrade tablice,

- koristi statičku referencu stupca pa tako dolazi do prekida formule svaki put kada se doda/obriše stupac.

Upravo zbog ovih ograničenja korištena je kombinacija funkcija INDEX i MATCH. INDEX (Povratna vrijednost; MATCH (Tražena vrijednost; Raspon traženja; 0)), prikazana na slici 6. MATCH funkcija koristi se u okviru INDEX funkcije te definira relativni položaj tražene vrijednosti u zadanom rasponu dok INDEX vraća rezultat iz odgovarajuće ćelije. Cilj korištenja ove kombinacije funkcija je identificirati bakteriju koja se nalazi iza traženog postotka. Za „Povratnu vrijednost“ odabire se prvi red u kojemu se nalaze nazivi bakterija (na slici označeno plavom bojom), potom se odabire MATCH funkcija. Za „Traženu vrijednost“ odabire se ćelija koja se želi pronaći, u ovom slučaju najveći postotak određene bakterije (na slici označeno crvenom bojom) koji je dobiven korištenjem funkcije LARGE. Nakon toga odabire se „Raspon traženja“, a to je red u kojemu se odabrana vrijednost pretražuje (na slici označeno ljubičastom bojom). Primjerice, u ovom slučaju pretražuje se bakterija koja odgovara dobivenom postotku. Naposljetku se upisuje 0 koja označava točno podudaranje vrijednosti. Ako nije pronađeno točno podudaranje, formula vraća #N/A.

	A	BV	BW	BX	BY	BZ	CA	CB	CC	CD	CE	CF	CG
1	indeks	Sutterella	Enterobac	Pasteurell	Pseudomo	Xanthomo	Brachyspir	Synergista	Lentispha	Verrucom		bakterija	
2	IM-1	0,03%	0,13%	0,05%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%			39,23%

**Slika 6.** Prikaz kombinacije INDEX i MATCH funkcija u Excelu koje se koriste za pronalaženje bakterije za određeni postotak

U Microsoft Excelu korištena je i funkcija STDEV koja predstavlja mjeru koliko su vrijednosti raspršene od prosječne vrijednosti. Ova funkcija bila je potrebna u tablici s 10 najzastupljenijih bakterijskih rodova u kojoj je bilo potrebno odrediti očekivani raspon zastupljenosti određenih bakterijskih rodova. Nadalje, u Microsoft Wordu izrađen je jedan izvještaj koji je služio kao šablona (engl. *template*) za popunjavanje podataka iz Excela kako bi svaki ispitanik dobio svoj izvještaj sa sastavom crijevne mikrobiote. Kako bi se Word automatizirao i dohvaćao potrebne podatke, koji se nalaze u ćelijama u Excelu, na određena mjesta u Word dokumentu potrebno je napraviti sljedeće:

1. otvoriti Microsoft Word dokument u kojemu je izrađen izvještaj te služi kao šablona za popunjavanje podataka iz Excela
2. otvoriti karticu „Skupina pisama“ zatim unutar grupe „Pokretanje cirkularnih pisama“ kliknuti „Odaberi primatelje“ potom „Koristi postojeći popis“
3. otvara se dijaloški okvir „Odabir izvora podataka“ zatim je potrebno odabrati Excel sa željenim podacima, kliknuti „Otvori“ pri čemu se otvara novi dijaloški okvir „Odabir tablice“ unutar kojeg se bira željena kartica Excela.

Nakon toga se popunjavaju različite tablice u Microsoft Word izvještaju. U narednom dijelu biti će opisano automatiziranje tablice koja daje podatke o zastupljenosti bakterijskog koljena kod svakog pojedinca. Sve ostale tablice u izvještaju popunjene su provođenjem istog postupka. Na slici 7 prikazana je tablica prije umetanja spojnih polja. Kako bi se spojna polja umetnula potrebno je napraviti sljedeće; riječ „Ispitanik“ potrebno je označiti, otvoriti karticu „Skupina pisama“ i unutar grupe „Polja za unos i umetanje“ kliknuti „Umetni spojna polja“ pri čemu se otvara padajući izbornik u kojemu je potrebno odabrati „index“. Zatim u drugom stupcu, drugom redu klikne se na prazno polje i ponovi se postupak pri čemu se odabire „d\_Bacteriap\_Bacteroidota1“ koja u Excelu predstavlja postotak bakterijskog koljena *Bacteroidetes*. Isti postupak se napravi za ostala bakterijska koljena. Na slici 8 prikazana je tablica nakon umetanja spojnih polja, a na slici 9 pretpregled rezultata koji se dobiju kada se unutar grupe „Pretpregled rezultata“ klikne na „Pretpregled rezultata“. Budući da rezultati nisu prikazani u postocima potrebno je urediti podatke.

Bakterijsko koljeno	Ispitanik	Očekivani raspon
<i>Bacteroidetes</i>		10 – 60 %
<i>Firmicutes</i>		20 -80 %
<i>Proteobacteria</i>		0 - 10 %

**Slika 7.** Prikaz tablice prije umetanja spojnih polja

Bakterijsko koljeno	«indeks»	Očekivani raspon
<i>Bacteroidetes</i>	«d_Bacteriap_Bacteroidota1»	10 – 60 %
<i>Firmicutes</i>	«d_Bacteriap_Firmicutes1»	20 -80 %
<i>Proteobacteria</i>	«d_Bacteriap_Proteobacteria1»	0 - 10 %

**Slika 8.** Prikaz tablice nakon umetanja spojnih polja

Bakterijsko koljeno	IM-1	Očekivani raspon
<i>Bacteroidetes</i>	0,29685213349020056	10 – 60 %
<i>Firmicutes</i>	0,67121007776406783	20 -80 %
<i>Proteobacteria</i>	2,5108324485638039E-3	0 - 10 %

**Slika 9.** Prikaz tablice s rezultatima nakon što je napravljeno popunjavanje s podacima

Bakterijsko koljeno	IM-1	Očekivani raspon
<i>Bacteroidetes</i>	{ MERGEFIELD d_Bacteriap__Bacteroidetes1 }	10 – 60 %
<i>Firmicutes</i>	0,67121007776406783	20 -80 %
<i>Proteobacteria</i>	2,5108324485638039E-3	0 - 10 %

**Slika 10.** Prikaz tablice nakon ubacivanja praznog polja pomoću prečice „CTRL + F9“ kako bi se umetnuto spojno polje moglo urediti te prikazivati rezultate s dvije decimale

Bakterijsko koljeno	IM-1	Očekivani raspon
<i>Bacteroidetes</i>	{ = { MERGEFIELD d_Bacteriap__Bacteroidetes1 } * 100 \# 0,00 }	10 – 60 %
<i>Firmicutes</i>	0,67121007776406783	20 -80 %
<i>Proteobacteria</i>	2,5108324485638039E-3	0 - 10 %

**Slika 11.** Prikaz tablice gdje se prikazuje sintaksa pomoću koje program Word umetne spojno polje i izračuna na postotnu vrijednost

Bakterijsko koljeno	IM-1	Očekivani raspon
<i>Bacteroidetes</i>	29,69	10 – 60 %
<i>Firmicutes</i>	67,12	20 -80 %
<i>Proteobacteria</i>	0,25	0 - 10 %

**Slika 12.** Konačni prikaz tablice s rezultatima u postotcima

Kako bi podaci bili prikazani u postotcima, kao na slici 12, potrebno je napraviti sljedeće korake:

1. označiti cijeli broj koji predstavlja postotak za bakterijsko koljeno *Bacteroidetes*, zatim kliknuti desnu tipku na mišu i odabrati „Preklopi kodove polja“
2. zatim se ubacuje prazno polje u Word dokument korištenjem prečice na tipkovnici (CTRL + F9) pri čemu se dobiva tablica kao na slici 10

3. zatim, kao što je prikazano na slici 11, potrebno je dodati „=“ ispred zagrade u kojoj se nalaze podaci i iza zagrade dodati „\*100 \# 0,00“ kako bi dobili postotke koji su zaokruženi na dvije decimale.

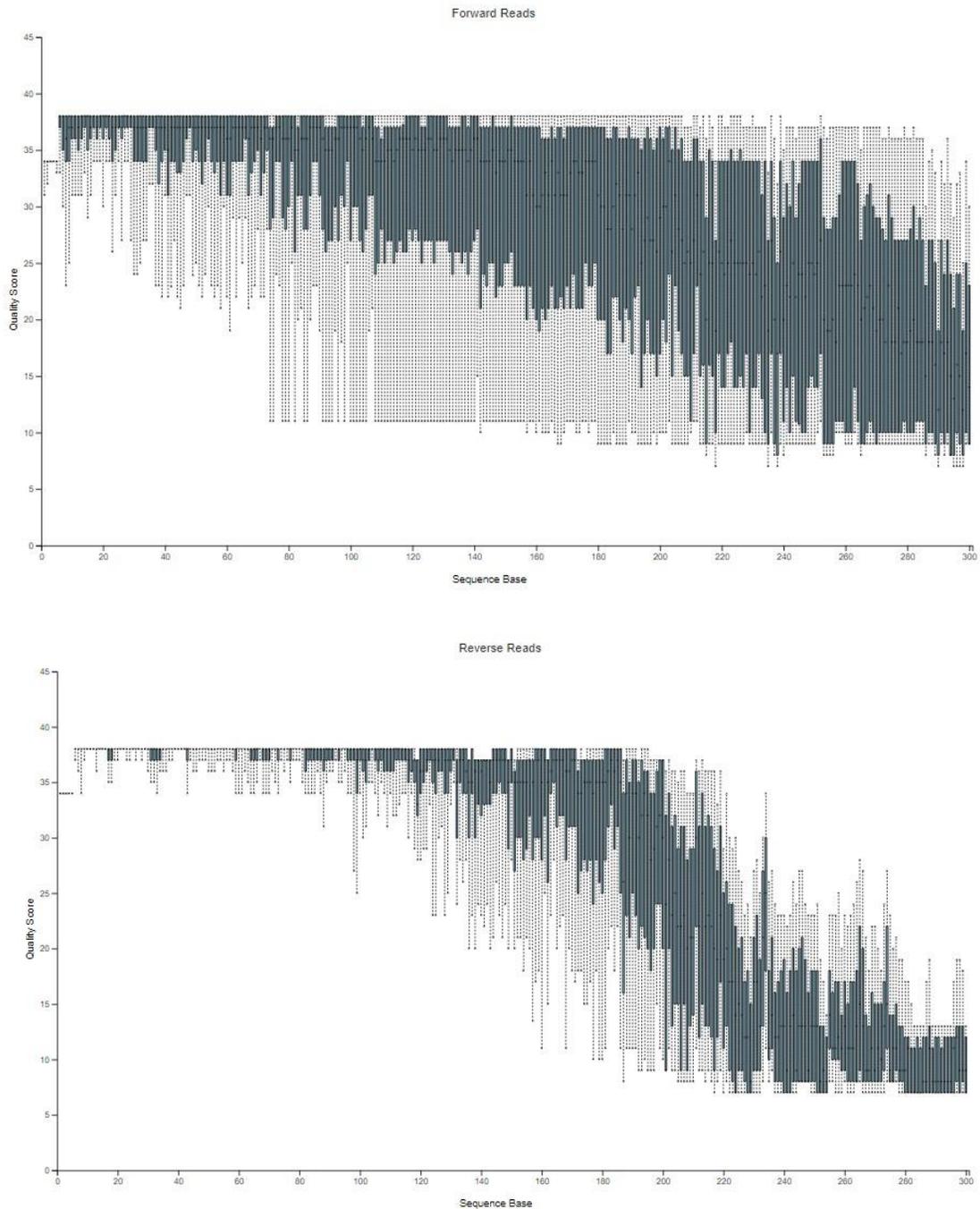
Nakon automatiziranja i popunjavanja svih tablica, Microsoft Word dokument spremljen je u PDF (.pdf) i Word (.docx) formatu za svakog ispitanika.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Svrha ovog rada bila je izrada automatiziranog računalnog sustava za izradu izvještaja o sastavu mikrobiote ispitanika uključenih u pilot projekt „Crijevna mikrobiota radno-aktivne populacije RH“. Sastav crijevne mikrobiote čovjeka vrlo je složen te sadrži dinamičnu populaciju mikroorganizama koja ovisi o brojnim čimbenicima poput prehrane, starosti, načinu življenja, a sastav mikroorganizama ima značajan utjecaj na domaćina tijekom homeostaze i bolesti. Kao što je prethodno u radu navedeno, crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u formiranju imunskog sustava, zaštiti od patogenih bakterija, proizvodnji vitamina i kratkolančanih masnih kiselina te razgradnji nutrijenata unesenih putem hrane. Nakon što su uzorci prikupljeni provedena je izolacija DNA iz uzoraka fecesa te je izolirana DNA sekvencirana. Dobiveni sirovi rezultati obrađeni su pomoću QIIME 2 platforme i Microsoft Excela kako bi se dobili podaci o zastupljenosti svih taksonomskih kategorija kod pojedinaca i očekivani raspon svake taksonomske kategorije te kako bi se, na kraju, generirao izvještaj za svakog pojedinca uključenog u projekt.

### 4.1. SIROVI PODACI

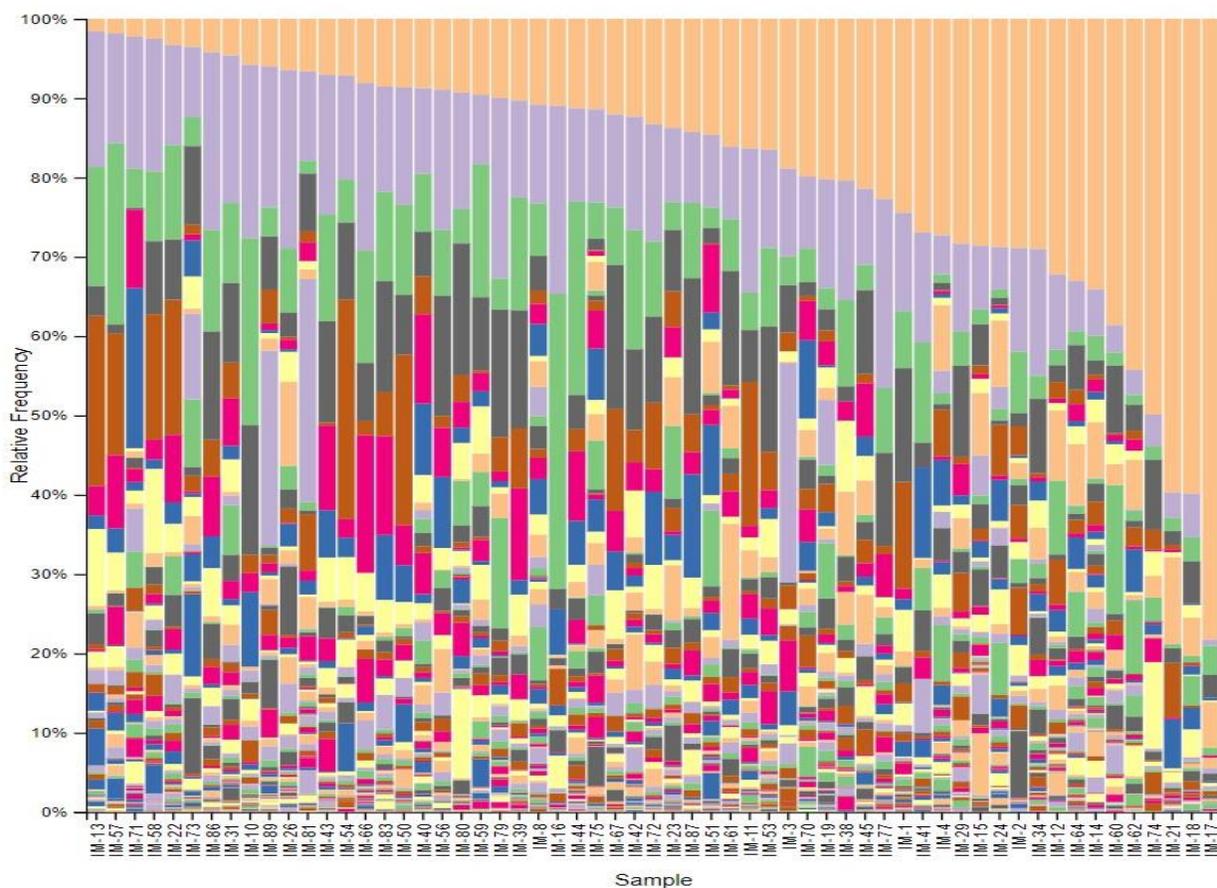
Od 59 uzoraka, prikupljenih od ispitanika iz ustanova uključenih u pilot projekt (Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Institut za antropologiju), sekvenciranjem je očitano 9.785.448 sirovih sljedova amplikona. Broj sekvenci po uzorku bio je u rasponu od 49649 do 305972 s prosječnim brojem sekvenci od 164670 po uzorku. Provjera kvalitete očitanih sekvenci izvršena je na temelju profila kvalitete očitavanja, dobivenog na osnovu izračuna kvalitete očitavanja svakog nukleotida za 10000 slučajno izabranih sekvenci iz cjelokupnog uzorka. Dijagrami kvalitete očitanih prednjih i stražnjih sljedova nukleotida, prikazan na slici 13, dobivaju se unošenjem .qzv datoteke i odabirom kartice „Interaktivni grafikon kvalitete“ na QIIME 2 Viewu. Cilj je zadržati što više baza kako bi bilo dovoljno dugo da omogući uspješno spajanje prednjeg i stražnjeg očitavanja, ali ukloniti baze koje imaju ocjene niske kvalitete kako bi rezultati bili kvalitetniji. Na slici 13 je vidljivo da je kvaliteta očitnog stražnjeg slijeda nukleotida vrlo loša stoga je on odbačen te je korišteno samo prednje očitavanje na kojem je provedeno skraćivanje na poziciji od 220 nukleotida jer iza te pozicije dolazi do pada kvalitete očitanih nukleotida.



**Slika 13.** Kvaliteta sirovih podataka očitanih u prednjem (engl. *forward*) načinu čitanja i stražnjem (engl. *reverse*) pomoću QIIME 2 platforme

Nakon kvalitetnog filtriranja sirovih sekvenci, uklanjanja grešaka sekvenciranja i kimeričkih sekvenci pomoću QIIME 2 programa određena je prisutnost bakterija u pojedinom uzorku te je vizualizirano stupčastim dijagramima na razini koljena, razreda, reda, porodice, roda

i vrste. Na slici 14 prikazan je taksonomski sastav crijevne mikrobiote ispitanika na razini roda od najmanje zastupljenosti *Bacteroides* roda prema najvećoj u obliku stupčastog dijagrama. Legenda prikazuje taksonomske kategorije označene slovima koja redom označavaju: slovo „d“ označava carstvo (engl. *domain*), slovo „p“ koljeno (engl. *phylum*), slovo „c“ razred (engl. *class*), slovo „f“ porodica (engl. *family*), slovo „g“ rod (engl. *genus*), slovo „s“ vrstu (engl. *species*). Oznaka „\_“ ispred taksonomije znači da pojedinom slijedu DNA sekvence nije bilo moguće pouzdano odrediti taksonomsku pripadnost. S obzirom da je korišten samo dio prednjeg očitavanja rezultati su bili dovoljni za dodjeljivanje taksonomije na nivou roda kao najviše postignute rezolucije.



d\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidota;c\_\_Bacteroidia;o\_\_Bacteroidales;f\_\_Bacteroidaceae;g\_\_Bacteroides  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Lachnospirales;f\_\_Lachnospiraceae;g\_\_  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Lachnospirales;f\_\_Lachnospiraceae;g\_\_Blautia  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Oscillospirales;f\_\_Ruminococcaceae;g\_\_Faecalibacterium  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Lachnospirales;f\_\_Lachnospiraceae;g\_\_Agathobacter  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Oscillospirales;f\_\_Ruminococcaceae;g\_\_Ruminococcus  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteriota;c\_\_Actinobacteria;o\_\_Bifidobacteriales;f\_\_Bifidobacteriaceae;g\_\_Bifidobacterium  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Oscillospirales;f\_\_Ruminococcaceae;g\_\_Subdoligranulum  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidota;c\_\_Bacteroidia;o\_\_Bacteroidales;f\_\_Rikenellaceae;g\_\_Alistipes  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidota;c\_\_Bacteroidia;o\_\_Bacteroidales;f\_\_Prevotellaceae;g\_\_Prevotella  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidota;c\_\_Bacteroidia;o\_\_Bacteroidales;g\_\_  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Lachnospirales;f\_\_Lachnospiraceae;g\_\_[Ruminococcus]\_torques\_group  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidota;c\_\_Bacteroidia;o\_\_Bacteroidales;f\_\_Tannerellaceae;g\_\_Tannerella  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Peptostreptococcales-Tissierellales;f\_\_Peptostreptococcaceae;g\_\_  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Oscillospirales;f\_\_Oscillospiraceae;g\_\_UCG-002  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Lachnospirales;f\_\_Lachnospiraceae;g\_\_Dorea  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Lachnospirales;f\_\_Lachnospiraceae;g\_\_Roseburia  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Actinobacteriota;c\_\_Coriobacteria;o\_\_Coriobacteriales;f\_\_Coriobacteriaceae;g\_\_Collinsella  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Verrucomicrobiota;c\_\_Verrucomicrobiae;o\_\_Verrucomicrobiales;f\_\_Verrucomicrobiaceae;g\_\_uncultured  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidota;c\_\_Bacteroidia;o\_\_Bacteroidales;f\_\_Barnesiellaceae;g\_\_Barnesiella  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Erysipelotrichales;f\_\_Erysipelatoclostridiaceae;g\_\_Erysipelatoclostridium  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Lachnospirales;f\_\_Lachnospiraceae;g\_\_Lachnospira  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;g\_\_  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Bacteroidota;c\_\_Bacteroidia;o\_\_Bacteroidales;f\_\_Tannerellaceae;g\_\_Parabacteroides  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Christensenellales;f\_\_Christensenellaceae;g\_\_Christensenellaceae\_R-7\_group  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Oscillospirales;f\_\_Oscillospiraceae;g\_\_Colidextribacter  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Oscillospirales;f\_\_Ruminococcaceae;g\_\_uncultured  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Negativicutes;o\_\_Veillonellales-Selenomonadales;f\_\_Veillonellaceae;g\_\_Dialister  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Oscillospirales;f\_\_[Eubacterium]\_coprostanoligenes\_group;g\_\_[Eubacterium]\_coprostanoligenes\_group  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;o\_\_Lactobacillales;f\_\_Streptococcaceae;g\_\_Streptococcus  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Bacilli;g\_\_  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Lachnospirales;f\_\_Lachnospiraceae;g\_\_Anaerostipes  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Clostridiales;f\_\_Clostridiaceae;g\_\_Clostridium\_sensu\_stricto\_1  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Monoglobales;f\_\_Monoglobaceae;g\_\_Monoglobus  
 d\_\_Bacteria;p\_\_Firmicutes;c\_\_Clostridia;o\_\_Oscillospirales;f\_\_Butyricicoccaceae;g\_\_Butyricoccus

**Slika 14.** Prikaz stupčastog dijagrama zastupljenosti bakterija na razini roda u probavnom sustavu ispitanika pomoću QIIME 2 platforme

#### 4.2. IZRADA IZVJEŠTAJA ZA SVAKOG ISPITANIKA

Biom tablica u CSV formatu unesena je u Excel kao što je opisano u eksperimentalnom dijelu diplomskog rada. Na slici 15 prikazan je dio Excel tablice na kojoj se vide podaci relativne zastupljenosti mikroba prikazanih u postotcima te izračunata prosječna vrijednost i standardna devijacija za sve taksonomske kategorije. Srednja vrijednost i standardna devijacija su računane kako bi se definirali normalni rasponi zastupljenosti bakterijskih taksona unutar populacije. Normalan raspon bakterijskog taksona definiran je kao srednja vrijednost detektirana u populaciji +/- dvije standardne devijacije.

indeks	d Bacteria	d Bacteria_p_Actinobacteria	d Bacteria_p_Bacteroidetes	d Bacteria_p_Campylobacterota	d Bacteria_p_Cyanobacteria	d Bacteria_p_Deferribacterota	d Bacteria_p_Desulfobacteria	d Bacteria_p_Firmicutes
IM-1	0,03%	2,74%	26,69%	0,00%	0,16%	0,00%	0,00%	67,12%
IM-10	0,01%	11,31%	8,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	79,50%
IM-11	0,20%	0,81%	22,62%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	74,96%
IM-12	0,28%	0,91%	99,17%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	37,35%
IM-13	0,07%	4,62%	3,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,28%	91,28%
IM-14	0,72%	3,10%	48,15%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	44,42%
IM-15	0,47%	1,31%	51,53%	0,00%	0,02%	0,00%	0,04%	37,63%
IM-16	0,02%	6,20%	12,71%	0,20%	0,00%	0,00%	0,00%	80,90%
IM-17	0,10%	0,42%	85,12%	0,23%	0,00%	0,00%	0,00%	13,02%
IM-18	0,17%	0,37%	69,42%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	25,01%
IM-19	0,18%	1,10%	42,23%	0,02%	0,23%	0,00%	0,35%	47,37%
IM-2	0,05%	0,54%	40,50%	0,00%	0,06%	0,00%	0,00%	55,69%
IM-21	0,14%	0,04%	79,42%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	20,21%
IM-22	0,48%	6,84%	9,97%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	82,37%
IM-23	0,22%	1,43%	35,79%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	60,80%
IM-24	0,38%	3,69%	57,49%	0,02%	0,00%	0,00%	1,50%	36,46%
IM-26	0,15%	0,95%	32,97%	0,00%	0,11%	0,00%	0,03%	65,27%
IM-29	0,56%	2,80%	40,51%	0,00%	0,00%	0,36%	0,04%	53,49%
IM-3	0,15%	0,82%	50,97%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	46,96%
IM-31	0,23%	4,49%	15,02%	0,00%	0,01%	0,00%	0,01%	80,13%
IM-34	0,29%	3,60%	43,40%	0,00%	0,23%	0,00%	0,02%	50,37%
IM-38	0,15%	1,55%	32,55%	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%	63,51%
IM-39	0,14%	2,49%	13,50%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	83,24%
IM-4	0,69%	3,38%	55,04%	0,06%	0,01%	0,00%	1,32%	37,59%
IM-40	0,50%	12,73%	14,90%	0,00%	0,00%	0,00%	0,39%	67,36%
IM-41	0,44%	19,42%	35,52%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	44,21%
IM-42	0,28%	0,86%	15,58%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	82,60%
IM-43	0,21%	0,88%	8,82%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	83,79%
IM-44	0,54%	6,32%	15,21%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	75,50%
IM-45	0,03%	4,57%	36,79%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	58,37%
IM-50	0,23%	7,39%	12,24%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	79,50%
IM-51	0,80%	9,75%	26,70%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	57,80%
IM-53	1,04%	3,52%	21,42%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	73,46%
IM-54	0,04%	4,72%	12,40%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	82,53%
IM-56	0,00%	12,81%	12,28%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	74,70%
IM-57	0,06%	5,85%	2,60%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	91,37%
IM-58	0,40%	7,00%	7,58%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	84,83%
IM-59	0,28%	4,13%	17,84%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	77,49%
IM-60	0,06%	1,06%	61,46%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	35,98%
IM-61	0,40%	1,88%	29,26%	0,00%	0,11%	0,00%	0,02%	67,28%
IM-62	0,32%	0,24%	55,08%	0,00%	0,00%	0,00%	0,06%	29,85%
IM-64	0,57%	1,09%	45,91%	0,00%	0,15%	0,00%	0,14%	43,46%
IM-66	0,16%	0,34%	9,23%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	90,16%
IM-67	0,02%	7,95%	15,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	76,62%
IM-70	1,48%	10,49%	31,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,19%	55,85%
IM-71	0,14%	29,74%	3,44%	0,00%	0,58%	0,00%	0,04%	61,19%
IM-72	0,06%	12,55%	14,98%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	72,19%
IM-73	0,01%	6,21%	26,10%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	67,18%
IM-74	0,00%	0,02%	66,60%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	33,36%
IM-75	0,42%	0,27%	24,76%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	68,13%
IM-77	0,13%	1,85%	27,24%	0,00%	0,23%	0,00%	0,00%	68,92%
IM-79	0,18%	1,92%	31,78%	0,00%	0,75%	0,00%	0,03%	65,15%
IM-8	0,07%	6,24%	23,18%	0,00%	0,00%	0,00%	0,63%	68,05%
IM-80	0,10%	2,85%	15,59%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	80,02%
IM-81	0,23%	0,69%	49,27%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	48,87%
IM-83	0,06%	13,43%	10,96%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	75,03%
IM-86	0,03%	7,07%	6,78%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	85,97%
IM-87	0,03%	15,01%	17,24%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	67,59%
IM-89	0,12%	1,01%	34,88%	0,00%	0,00%	0,00%	0,19%	65,65%
	STANDARDNA DEVIJACIJA							
	0,002785006	0,054483972	0,054483972	0,20196802	0,20196802	0,000329271	0,000329271	0,001322585
	PROSJEK							
	0,26%	4,87%	30,16%	0,01%	0,05%	0,01%	0,06%	62,58%

**Slika 15.** Dio tabličnog prikaza zastupljenosti bakterija na razini koljena s izračunatom standardnom devijacijom i prosječnom zastupljenošću bakterijskih koljena kod ispitanika u Microsoft Excelu

Slika 15 prikazuje dio Excel tablice iz koje je vidljiva zastupljenost pojedinih bakterijskih koljena. Od 59 analiziranih uzoraka, u svim uzorcima prisutno je: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Firmicutes* koljeno, a koljeno *Proteobacteria* detektirano je u svim uzorcima osim u IM-74 uzorku kod kojeg je također zabilježena i najmanja alfa raznolikost.

Dva najdominantnija bakterijska koljena, *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, kod ispitanika su zastupljena u različitim omjerima. Raspon bakterija iz *Firmicutes* koljena kod ispitanika iznosi 13,02-91,28 %, a srednja vrijednost 62,58 % što ga čini najzastupljenijim koljenom crijevne mikrobiote u promatranoj populaciji. Najniža zastupljenost (13,02 %) zabilježena je samo kod jednog ispitanika, IM-17. Svi ostali ispitanici imaju zastupljenost veću od 20 %, a očekivani raspon *Firmicutes* koljena je 20-80 %.

Drugo najzastupljenije bakterijsko koljeno je *Bacteroidetes* s rasponom 2,60-85,12 % te prosječnom vrijednosti 30,60 % i očekivanim rasponom 10-60 %. Iako je kod većine ispitanika zastupljenost *Bacteroidetes* koljena iznad 10 %, devet ih ima manje od 10 %, a to su: IM-10 (8,80 %), IM-13 (3,67 %), IM-22 (9,97 %), IM-43 (8,82 %), IM-57 (2,60 %), IM-58 (7,58 %), IM-66 (9,23 %), IM-71 (3,44 %) i IM-86 (6,75 %). Zajedno, ova dva bakterijska koljena predstavljaju 80-90 % humane crijevne mikrobiote.

Treće najzastupljenije bakterijsko koljeno, nakon *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, je *Actinobacteria* čija je prosječna vrijednost 4,87 %, a najniža zastupljenost zabilježena je kod IM-74 sa svega 0,02 %. Nakon njih slijede koljena *Verrucomicrobiota* s prosječnom vrijednošću 1,07 % i *Proteobacteria* s 0,78 %.

Dva navedena najzastupljenija koljena, *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, u skladu su s literaturom dok ostala navedena koljena variraju ovisno o pojedincima (Beam i sur., 2021; Dieterich i sur., 2018) Ostala detektirana koljena s puno manjom zastupljenošću kod ispitanika su: *Verrucomicrobiota*, *Proteobacteria*, *Campilobacterota*, *Cyanobacteria*, *Deferribacterota*, *Desulfobacterota*, *Fusobacteriota*, *Patescibacteria*, *Spirochaetota*, *Synergistota*.

Kako bi popunili izvještaj, koji je napravljen na osnovi pregleda literature u obliku Word dokumenta, izrađen je novi list u Excel dokumentu, nastalom iz BIOM matrice, u koji su izvađena sva polja iz predloška izvještaja za sve sudionike, kao što je prikazano na slici 16. Podaci obrađeni u Excelu koristili su se za popunjavanje prethodno izrađenog i automatiziranog Word dokumenta te analizu taksonomske zastupljenosti bakterija u uzorcima.

indeks		d_Bacteria_p	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter	d_Bacter
IM-1	ZASTUPLENOST BAKTERIJSKOG KOLJENA	2,74%	29,69%	0,00%	0,16%	0,00%	0,00%	67,12%	0,00%	0,01%	0,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
IM-10		11,31%	8,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	79,50%	0,00%	0,00%	0,38%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
IM-11		0,81%	22,62%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	74,96%	0,00%	0,00%	1,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,44%
IM-12		0,91%	59,37%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	37,55%	0,00%	0,00%	1,50%	0,00%	0,00%	0,00%	0,38%
IM-13		4,62%	3,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,28%	91,28%	0,00%	0,00%	0,09%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
IM-14		3,10%	48,15%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	44,42%	0,21%	0,01%	2,94%	0,00%	0,00%	0,00%	0,37%
IM-15		1,31%	51,53%	0,00%	0,02%	0,00%	0,04%	37,63%	7,73%	0,01%	0,90%	0,00%	0,00%	0,00%	0,36%
IM-16		6,20%	12,71%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	80,90%	0,00%	0,00%	0,18%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
IM-17		0,42%	85,12%	0,25%	0,00%	0,00%	0,00%	13,02%	0,27%	0,00%	0,81%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
IM-18		0,37%	69,42%	0,00%	0,01%	0,00%	0,05%	25,01%	0,00%	0,01%	1,30%	0,00%	0,00%	0,00%	3,65%
IM-19		1,10%	42,23%	0,02%	0,23%	0,00%	0,35%	47,37%	0,00%	0,00%	1,42%	0,09%	0,00%	0,00%	7,00%
IM-2		0,54%	40,50%	0,00%	0,06%	0,00%	0,00%	55,69%	0,00%	0,00%	0,12%	0,00%	0,00%	0,00%	3,01%
IM-21		0,04%	79,42%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	20,21%	0,00%	0,00%	0,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
IM-22		6,84%	9,97%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	82,37%	0,00%	0,00%	0,21%	0,00%	0,00%	0,00%	0,22%
IM-23		1,43%	35,79%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	60,80%	0,00%	0,02%	0,73%	0,00%	0,00%	0,00%	0,87%
IM-24		3,69%	57,49%	0,02%	0,00%	0,00%	1,50%	36,46%	0,01%	0,00%	0,24%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%
IM-26		0,95%	32,97%	0,00%	0,11%	0,00%	0,03%	65,27%	0,00%	0,00%	0,53%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%
IM-29		2,80%	40,51%	0,00%	0,00%	0,36%	0,04%	53,49%	0,00%	0,01%	1,73%	0,00%	0,00%	0,00%	0,76%
IM-3		0,82%	50,97%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	46,36%	0,00%	0,01%	1,74%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
IM-31	4,49%	15,02%	0,00%	0,01%	0,00%	0,01%	80,13%	0,00%	0,00%	0,23%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-34	3,60%	43,40%	0,00%	0,23%	0,00%	0,02%	50,37%	0,00%	0,01%	2,09%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	
IM-38	1,55%	32,55%	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%	63,51%	0,00%	0,01%	0,20%	0,00%	0,00%	0,00%	1,93%	
IM-39	2,49%	13,50%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	83,24%	0,00%	0,00%	0,39%	0,00%	0,00%	0,00%	0,30%	
IM-4	3,38%	55,04%	0,06%	0,01%	0,00%	1,32%	37,59%	0,01%	0,00%	2,01%	0,01%	0,00%	0,00%	0,02%	
IM-40	12,73%	14,90%	0,00%	0,00%	0,00%	0,39%	67,36%	0,00%	0,00%	1,29%	0,00%	0,00%	0,00%	2,90%	
IM-41	19,42%	35,52%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	44,21%	0,00%	0,00%	0,49%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-42	0,86%	15,95%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	82,60%	0,00%	0,00%	0,19%	0,00%	0,00%	0,20%	0,00%	
IM-43	6,88%	8,82%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	83,79%	0,00%	0,00%	0,29%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-44	6,32%	15,21%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	75,50%	0,00%	0,00%	0,40%	0,00%	0,00%	0,00%	2,16%	
IM-45	4,57%	36,79%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	58,37%	0,00%	0,01%	0,17%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	
IM-50	7,39%	12,24%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	79,50%	0,00%	0,00%	0,72%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-51	3,75%	24,70%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	57,80%	0,02%	0,00%	3,54%	0,00%	0,01%	0,01%	9,55%	
IM-53	3,52%	21,42%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	73,46%	0,02%	0,00%	0,64%	0,00%	0,00%	0,00%	0,17%	
IM-54	4,72%	12,40%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	82,53%	0,00%	0,00%	0,21%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%	
IM-56	12,81%	12,28%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	74,70%	0,00%	0,00%	0,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-57	5,83%	2,60%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	91,37%	0,00%	0,00%	0,14%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	
IM-58	7,00%	7,58%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	84,85%	0,00%	0,01%	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%	0,06%	
IM-59	4,13%	17,84%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	77,49%	0,00%	0,00%	0,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-60	1,06%	61,46%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	35,98%	0,00%	0,00%	1,28%	0,00%	0,00%	0,00%	0,04%	
IM-61	1,88%	29,26%	0,00%	0,11%	0,00%	0,02%	67,28%	0,00%	0,00%	0,80%	0,00%	0,00%	0,00%	0,14%	
IM-62	0,24%	55,08%	0,00%	0,00%	0,00%	0,06%	29,85%	0,04%	0,00%	5,23%	0,00%	0,00%	0,00%	9,21%	
IM-64	1,09%	45,91%	0,00%	0,15%	0,00%	0,14%	43,48%	0,02%	0,00%	3,36%	0,00%	0,00%	0,00%	5,60%	
IM-66	0,34%	9,23%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	90,16%	0,00%	0,00%	0,15%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-67	7,95%	15,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	76,62%	0,00%	0,00%	0,28%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-70	10,49%	31,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0,19%	55,85%	0,00%	0,01%	0,63%	0,00%	0,20%	0,00%	0,00%	
IM-71	29,74%	3,44%	0,00%	0,58%	0,00%	0,04%	61,19%	0,00%	0,01%	0,34%	0,00%	0,00%	0,00%	4,51%	
IM-72	12,55%	14,98%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	72,19%	0,00%	0,00%	0,10%	0,00%	0,00%	0,00%	0,13%	
IM-73	6,21%	26,10%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	67,18%	0,00%	0,02%	0,42%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	
IM-74	0,02%	66,60%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	33,36%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-75	0,27%	24,76%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	68,13%	0,00%	0,00%	0,18%	0,00%	0,00%	0,00%	6,09%	
IM-77	1,85%	27,24%	0,00%	0,23%	0,00%	0,00%	68,92%	0,00%	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	1,00%	
IM-79	1,92%	31,78%	0,00%	0,75%	0,00%	0,03%	65,15%	0,00%	0,00%	0,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-8	6,24%	23,18%	0,00%	0,00%	0,00%	0,65%	68,05%	0,00%	0,00%	0,77%	0,00%	0,02%	0,02%	0,95%	
IM-80	2,95%	16,39%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	80,02%	0,00%	0,00%	0,32%	0,00%	0,00%	0,00%	0,25%	
IM-81	0,69%	49,27%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	48,87%	0,00%	0,00%	0,65%	0,00%	0,00%	0,00%	0,36%	
IM-83	13,43%	10,96%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	75,03%	0,00%	0,00%	0,15%	0,00%	0,00%	0,00%	0,38%	
IM-86	7,07%	6,75%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	85,97%	0,00%	0,00%	0,15%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	
IM-87	15,01%	17,24%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	67,59%	0,00%	0,00%	0,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
IM-89	1,01%	34,86%	0,00%	0,00%	0,00%	0,19%	63,63%	0,00%	0,02%	0,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	

indeks	domen	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak	bakterija	Postotak					
IM-1	Bakterija	Lachnospiraceae	39.23%	Bacteroidia	24.46%	Ruminococcaceae	20.95%	Tannerellaceae	2.45%	Rikenellaceae	1.83%	Bifidobacteriaceae	1.39%	Streptococcaceae	1.38%	Erysipelotricaceae	1.00%	Coriobacteriaceae	0.84%	Butyrivibrionaceae	0.80%																					
IM-10		Lachnospiraceae	53.88%	Ruminococcaceae	19.46%	Bifidobacteriaceae	9.45%	Bacteroidia	5.81%	Erysipelotricaceae	2.71%	Coriobacteriaceae	1.72%	Prevotellaceae	1.39%	Tannerellaceae	1.05%	[Eubacterium]	0.74%	Butyrivibrionaceae	0.64%																					
IM-11		Lachnospiraceae	46.85%	Bacteroidia	16.34%	Ruminococcaceae	11.76%	Oscillospiraceae	4.99%	Rikenellaceae	3.39%	Peptostreptococcaceae	3.04%	Barnesiellaceae	1.51%	Christensenellaceae	1.51%	[Eubacterium]	0.88%	Tannerellaceae	0.76%																					
IM-12		Bacteroidia	32.25%	Lachnospiraceae	19.33%	Rikenellaceae	8.84%	Tannerellaceae	6.96%	Oscillospiraceae	4.48%	Ruminococcaceae	4.25%	Christensenellaceae	3.26%	Barnesiellaceae	1.42%	Barnesiellaceae	1.42%	Clostridia_UCG_	0.72%																					
IM-13		Lachnospiraceae	60.71%	Ruminococcaceae	18.51%	Coriobacteriaceae	1.76%	Bifidobacteriaceae	1.75%	Bacteroidia	1.61%	Ruminococcotriaceae	1.09%	[Eubacterium]	0.93%	Eggerthellaceae	0.86%	Tannerellaceae	0.84%	Oscillospiraceae	0.83%																					
IM-14		Bacteroidia	34.14%	Lachnospiraceae	13.53%	Ruminococcaceae	13.53%	Ruminococcaceae	7.83%	Rikenellaceae	7.00%	Peptostreptococcaceae	5.27%	Oscillospiraceae	3.32%	Peptostreptococcaceae	3.32%	Peptostreptococcaceae	2.75%	Enterobacteriaceae	2.33%																					
IM-15		Bacteroidia	28.61%	Lachnospiraceae	17.64%	Ruminococcaceae	8.44%	Rikenellaceae	7.89%	Fusobacteriaceae	7.73%	Prevotellaceae	5.05%	Selenomonadaceae	4.92%	Barnesiellaceae	4.00%	Tannerellaceae	3.57%	Oscillospiraceae	3.46%																					
IM-16		Lachnospiraceae	67.36%	Bacteroidia	10.97%	Bifidobacteriaceae	5.77%	Erysipelotricaceae	4.70%	Ruminococcaceae	3.06%	Verrucomicrobiaceae	2.78%	Tannerellaceae	2.68%	Tannerellaceae	1.50%	Mongolobacaceae	0.44%	Eggerthellaceae	0.39%																					
IM-17		Bacteroidia	78.36%	Lachnospiraceae	6.63%	Rikenellaceae	5.73%	Ruminococcaceae	3.08%	Verrucomicrobiaceae	1.11%	Enterobacteriaceae	0.76%	Oscillospiraceae	0.69%	Mongolobacaceae	0.46%	Bifidobacteriaceae	0.38%	Peptostreptococcaceae	0.36%																					
IM-18		Bacteroidia	56.88%	Lachnospiraceae	6.93%	Ruminococcaceae	7.41%	Ruminococcaceae	3.95%	Tannerellaceae	3.95%	Verrucomicrobiaceae	3.65%	Oscillospiraceae	1.97%	Clostridia_UCG_	1.28%	Rhodospirillaceae	0.66%	Clostridiaceae	0.56%																					
IM-19		Lachnospiraceae	22.67%	Bacteroidia	20.29%	Ruminococcaceae	10.89%	Prevotellaceae	8.21%	Verrucomicrobiaceae	7.00%	Tannerellaceae	4.61%	Oscillospiraceae	4.00%	Barnesiellaceae	3.78%	Christensenellaceae	2.56%	Rikenellaceae	1.54%																					
IM-2		Lachnospiraceae	32.80%	Bacteroidia	28.93%	Verrucomicrobiaceae	8.39%	Verrucomicrobiaceae	8.16%	Erysipelotricaceae	5.93%	Verrucomicrobiaceae	3.01%	Ruminococcaceae	2.94%	Rikenellaceae	2.00%	Mongolobacaceae	0.96%	Oscillospiraceae	0.87%																					
IM-21		Bacteroidia	59.76%	Rikenellaceae	11.00%	Lachnospiraceae	8.19%	Tannerellaceae	8.16%	Oscillospiraceae	7.30%	Ruminococcaceae	3.40%	Verrucomicrobiaceae	0.27%	[Eubacterium]	0.25%	Christensenellaceae	0.24%	Peptostreptococcaceae	0.23%																					
IM-22		Lachnospiraceae	50.29%	Ruminococcaceae	20.97%	Coriobacteriaceae	3.56%	Bacteroidia	3.31%	Bifidobacteriaceae	2.59%	Peptostreptococcaceae	2.59%	Oscillospiraceae	1.49%	Streptococcaceae	1.33%	[Eubacterium]	0.96%	Butyrivibrionaceae	0.72%																					
IM-23		Lachnospiraceae	27.40%	Ruminococcaceae	15.87%	Bacteroidia	13.78%	Rikenellaceae	6.20%	Oscillospiraceae	4.66%	Clostridia_UCG-014	4.50%	Tannerellaceae	3.74%	Barnesiellaceae	2.26%	Erysipelotricaceae	2.05%	Verrucomicrobiaceae	0.87%																					
IM-24		Bacteroidia	28.37%	Tannerellaceae	10.82%	Ruminococcaceae	10.15%	Rikenellaceae	8.26%	Lachnospiraceae	8.24%	Rikenellaceae	7.47%	Barnesiellaceae	4.12%	Prevotellaceae	3.69%	Coriobacteriaceae	2.20%	Desulfotribionaceae	1.50%																					
IM-26		Lachnospiraceae	38.48%	Rikenellaceae	10.59%	Ruminococcaceae	9.02%	Barnesiellaceae	8.66%	Oscillospiraceae	6.86%	Bacteroidia	6.47%	Christensenellaceae	3.48%	Tannerellaceae	2.81%	Clostridia_UCG_	1.73%	Mongolobacaceae	1.53%																					
IM-29		Bacteroidia	28.34%	Lachnospiraceae	22.27%	Ruminococcaceae	17.64%	Tannerellaceae	6.42%	Rikenellaceae	3.78%	[Eubacterium]_coprostanolignone	2.98%	Clostridiaceae	2.00%	Erysipelotricaceae	1.93%	Selenomonadaceae	1.66%	Oscillospiraceae	1.59%																					
IM-3		Lachnospiraceae	28.59%	Prevotellaceae	21.66%	Bacteroidia	18.93%	Ruminococcaceae	12.28%	Tannerellaceae	4.21%	Mongolobacaceae	2.97%	Elysipelotricaceae	1.81%	Suttrellaceae	1.66%	Verrucomicrobiaceae	0.88%	Eggerthellaceae	0.53%																					
IM-31		Lachnospiraceae	45.84%	Ruminococcaceae	20.81%	Bacteroidia	4.62%	Verrucomicrobiaceae	2.65%	Peptostreptococcaceae	2.27%	Coriobacteriaceae	2.15%	Rikenellaceae	2.01%	Streptococcaceae	1.94%	Oscillospiraceae	1.66%	Bifidobacteriaceae	1.76%																					
IM-34		Bacteroidia	29.05%	Lachnospiraceae	20.81%	Ruminococcaceae	14.29%	Barnesiellaceae	4.77%	Rikenellaceae	3.96%	Oscillospiraceae	3.41%	Verrucomicrobiaceae	3.25%	Tannerellaceae	2.46%	Bifidobacteriaceae	2.46%	Christensenellaceae	1.70%																					
IM-38		Lachnospiraceae	36.57%	Bacteroidia	20.43%	Ruminococcaceae	15.57%	Rikenellaceae	8.02%	Tannerellaceae	2.47%	Verrucomicrobiaceae	2.30%	[Eubacterium]	2.27%	Verrucomicrobiaceae	1.93%	Oscillospiraceae	1.66%	Barnesiellaceae	1.43%																					
IM-39		Lachnospiraceae	40.34%	Ruminococcaceae	32.08%	Bacteroidia	10.32%	Peptostreptococcaceae	1.67%	Bifidobacteriaceae	1.67%	Rikenellaceae	1.47%	Rikenellaceae	1.33%	Clostridiaceae	1.03%	[Eubacterium]	1.03%		1.01%																					
IM-4		Bacteroidia	27.35%	Ruminococcaceae	10.75%	Tannerellaceae	10.11%	Rikenellaceae	8.28%	Oscillospiraceae	8.12%	Lachnospiraceae	8.01%	Barnesiellaceae	4.08%	Prevotellaceae	3.64%	Coriobacteriaceae	2.10%	Oxalobacteriaceae	1.47%																					
IM-40		Lachnospiraceae	28.43%	Ruminococcaceae	21.87%	Bifidobacteriaceae	9.07%	Bacteroidia	8.28%	Peptostreptococcaceae	5.19%	Oscillospiraceae	3.82%	Verrucomicrobiaceae	2.90%	Christensenellaceae	2.44%	Coriobacteriaceae	2.35%	Rikenellaceae	1.40%																					
IM-41		Lachnospiraceae	33.15%	Bacteroidia	26.94%	Bifidobacteriaceae	11.42%	Coriobacteriaceae	6.78%	Ruminococcaceae	3.74%	Peptostreptococcaceae	2.69%	Tannerellaceae	1.77%	Rikenellaceae	1.04%	Butyrivibrionaceae	0.72%	Oscillospiraceae	0.42%																					
IM-42		Lachnospiraceae	40.05%	Ruminococcaceae	24.33%	Bacteroidia	12.39%	Christensenellaceae	7.11%	Oscillospiraceae	4.52%	Rikenellaceae	3.49%	Butyrivibrionaceae	1.13%	Tannerellaceae	0.95%	Peptostreptococcaceae	0.95%	Erysipelotricaceae	0.82%																					
IM-43		Lachnospiraceae	39.56%	Ruminococcaceae	29.82%	Bacteroidia	11.39%	Bifidobacteriaceae	6.01%	Streptococcaceae	4.20%	Peptostreptococcaceae	2.87%	Christensenellaceae	2.43%	Verrucomicrobiaceae	1.74%	Tannerellaceae	1.74%	Tannerellaceae	1.74%																					
IM-44		Lachnospiraceae	45.85%	Ruminococcaceae	16.73%	Bacteroidia	11.29%	Bifidobacteriaceae	5.54%	Peptostreptococcaceae	3.00%	Verrucomicrobiaceae	2.16%	Clostridiaceae	2.02%	Rikenellaceae	1.93%	Oscillospiraceae	1.56%	[Eubacterium]	1.56%																					
IM-45	Lachnospiraceae	25.30%	Ruminococcaceae	22.27%	Bacteroidia	21.44%	Tannerellaceae	6.17%	Rikenellaceae	4.30%	[Eubacterium]_coprostanolignone	3.14%	Barnesiellaceae	3.01%	Bifidobacteriaceae	2.46%	Verrucomicrobiaceae	2.24%	Peptostreptococcaceae	1.68%																						
IM-50	Lachnospiraceae	51.43%	Ruminococcaceae	16.23%	Bacteroidia	8.66%	Bifidobacteriaceae	4.66%	Coriobacteriaceae	2.40%	Clostridiaceae	2.27%	Peptostreptococcaceae	1.91%	Tannerellaceae	1.82%	Christensenellaceae	1.08%	Oscillospiraceae	0.62%																						
IM-51	Lachnospiraceae	16.88%	Ruminococcaceae	15.37%	Bacteroidia	14.69%	Bifidobacteriaceae	6.95%	Verrucomicrobiaceae	5.55%	Rikenellaceae	6.66%	Enterobacteriaceae	3.35%	Christensenellaceae	2.85%	Streptococcaceae	2.32%	Bifidobacteriaceae	1.14%																						
IM-53	Lachnospiraceae	38.18%	Ruminococcaceae	23.52%	Bacteroidia	16.52%	Peptostreptococcaceae	3.93%	Rikenellaceae	1.91%	Oscillospiraceae	1.53%	Tannerellaceae	1.48%	Bifidobacteriaceae	1.41%	Coriobacteriaceae	1.30%	Clostridiaceae	1.18%																						
IM-54	Lachnospiraceae	53.82%	Ruminococcaceae	17.73%	Bacteroidia	7.19%	Verrucomicrobiaceae	2.41%	Bifidobacteriaceae	2.41%	Tannerellaceae	2.41%	Coriobacteriaceae	1.09%	Rikenellaceae	0.63%	Barnesiellaceae	0.82%	Eggerthellaceae	0.80%																						
IM-56	Lachnospiraceae	40.08%	Ruminococcaceae	24.08%	Bifidobacteriaceae	8.98%	Bacteroidia	8.96%	Coriobacteriaceae	2.88%	Peptostreptococcaceae	2.72%	Erysipelotricaceae	1.64%	Clostridiaceae	1.44%	Mongolobacaceae	1.10%	Christensenellaceae	0.97%																						
IM-57	Lachnospiraceae	56.40%	Ruminococcaceae	15.70%	Peptostreptococcaceae	4.84%	Bifidobacteriaceae	3.07%	Bacteroidia	1.81%	Coriobacteriaceae	1.81%	Coriobacteriaceae	1.61%	Clostridiaceae	1.24%	Mongolobacaceae	1.00%																								



*Ruminococcus*, *Blautia* i *Agathobacter* spadaju u koljeno *Firmicutes*. *Alistipes* i *Prevotella* spadaju u *Bacteroidetes* koljeno te *Bifidobacterium* u *Actinobacteria* koljeno.

*Bifidobacterium* prisutna je gotovo u svim fekalnim uzorcima zdravih ljudi. Članovi *Bifidobacterium* su među prvim mikrobima koji koloniziraju humani gastrointestinalni trakt te pozitivno djeluju na domaćina i često se koriste kao probiotici. Povezuje ih se s proizvodnjom metabolita kao što su masne kiseline, vitamini, razvoj imunološkog sustava i prevencijom crijevnih poremećaja, a zastupljenost *Bifidobacterium* roda smanjuje se starenjem (Wong i sur., 2020; King i sur., 2019). *Bifidobacterium* se također povezuje s unosom biljnih proteina prisutnih u brokuli, prokulicama, grahu i šparogama. U 51 uzorku od 59, detektiran je *Bifidobacterium* rod, a 26 uzoraka *Bifidobacterium* ima među deset najzastupljenijih rodova pri čemu je najveću zastupljenost imao uzorak IM-71 (20,28 %).

Kable i sur. (2021) otkrili su da je relativna brojnost pektolitičkih bakterija roda *Lachnospira* značajno povezan s prehranom koja sadrži visoku količinu vlakana iz cijelog voća, isključujući bobičasto voće. Prethodno su je Jiang i sur. (2020) povezali s povećanim unosom voća i povrća kod 1879 odraslih Kineza te je nedavno nasumično kontrolirano ispitivanje koje je provedeno na 163 odrasle osobe u dobi od 25 do 45 godina pokazalo da konzumacijom avokada dolazi do porasta u rodu *Lachnospira* (Thompson i sur., 2021). Poznato je da prehrambena vlakna imaju veliki utjecaj na sastav, raznolikost i bogatstvo mikrobioma jer pružaju mnoštvo supstrata za reakcije fermentacije koje provode specifične vrste mikroba. De Filippo i sur. (2010) u svom istraživanju su pokazali da je *Prevotella* prisutna kod djece u Burkini Faso koja su jela hranu s malo masti i životinjskih bjelančevina, a bogatu škrobom, vlaknima i biljnim bjelančevinama u usporedbi s djecom iz Italije koja se hrane „zapadnjačkom“ hranom bogatom životinjskim bjelančevinama, šećerom, škrobom i mastima s malo vlakana.

*Lachnospira* je detektirana kod 55 ispitanika s relativno malom zastupljenošću. Kod 9 uzoraka nalazi se u deset najzastupljenijih mikroorganizama pri čemu je najveća zastupljenost opažena kod IM-3 (6,42 %) uzorka. *Prevotella* rod pronađen je kod 24 ispitanika, a 9 uzoraka sadrži *Prevotella* rod među deset najzastupljenijih bakterija na razini roda. Od toga četiri ispitanika imaju rod *Prevotella* kao prvi najzastupljeniji, a to su: IM-3 (27,66 %), IM-73 (10,82 %), IM-81 (28,12 %), IM-89 (24,62 %). Rezultati dobiveni za ispitanike IM-73 i IM-81 u skladu su s ostalim provedenim istraživanjima budući da je ispitanik IM-73 vegan, a ispitanik IM-81 vegetarijanac što

znači da konzumiraju hranu bogatu vlaknima na dnevnoj bazi. Ispitanici IM-3 i IM-89 su svejedi koji koriste nedefinirane dodatke prehrani te je u oba uzorka detektirana *Lachnospira* koja ukazuje na povećani unos vlakana. Dodaci prehrani mogu doprinijeti drukčijem sastavu crijevne mikrobiote, a definiraju se kao „pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari (vitamini i minerali) ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja (aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, biljne vrste, ekstrakti biljnih vrsta, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom)“ (<https://zdravlje.gov.hr/ministarstvo-zdravlja/djelokrug/uprava-za-unaprjedjenje-zdravlja-710/hrana/dodaci-prehrani/731>). Dodatno, kod IM-3 ispitanika detektirana je visoka zastupljenost *Prevotella* roda (27,66 %) te *Monoglobus* rod (2,57 %), a pokazano je da enzimi *M. pectinilyticus* vrste sudjeluju u razgradnji pektina (Kim i sur., 2019). Stoga, može se zaključiti da ovi ispitanici konzumiraju hranu bogatu vlaknima.

*Ruminococcus* je rod koji se povezuje s dugotrajnom konzumacijom voća i povrća. Vrste ovog roda razgrađuju složene ugljikohidrate kao što su celuloza i rezistentni škrob te proizvode butirat koji djeluje kao protuupalni spoj (Tomova i sur., 2019). Pokazano je da probavljivi ugljikohidrati iz voća smanjuju *Bacteroides* i *Clostridia*, a neprobavljivi povećavaju broj bakterija mliječne kiseline, *Ruminococcus*, *Eubacterium rectale* i *Roseburii* te smanjuju *Clostridium* i *Enterococcus* vrste. U 53 uzoraka detektiran je *Ruminococcus* rod, a 35 uzoraka sadrži ovaj rod među deset najzastupljenijih rodova te je kod uzoraka IM-40 (11,28 %) i IM-66 (17,36 %) on detektiran kao prvi najzastupljeniji rod. Kod ovih uzoraka također je detektirana visoka zastupljenost *Bacteroides*, *Blautia* i *Faecalibacterium* roda.

Različita istraživanja pokazala su da je prehrana jedan od glavnih čimbenika promjene u raznolikosti crijevnog mikrobioma, kako kratkoročno tako i dugoročno. Visoka zastupljenost *Firmicutes* koljena povezuje se s visokom potrošnjom jednostavnih ugljikohidrata i zasićenih masti te malim unosom mikronutrijenata i vlakana (Orbe-Orihuela i sur., 2018). Nedavna istraživanja provedena na miševima koji su bili hranjeni s visokim udjelom masti i šećera ili s niskim udjelom masti i visokim udjelom šećera, otkrila su da miševi hranjeni s visokim udjelom masti i šećera imaju smanjenje *Bacteroidetes*, a povećanje *Firmicutes* koljena. Kod ispitanika najveću zastupljenost *Firmicutes* koljena ima IM-57 (91,37 %), a najzastupljeniji rodovi od najvećeg prema najmanjem su: *Blautia* (22,87 %), *Agathobacter* (15,38 %), *Ruminococcus* (9,22

%) dok je zastupljenost *Bacteroides* roda svega 1,87 %. Također kod ispitanika IM-13 zabilježena je visoka zastupljenost *Agathobacter* (21,46 %), *Blautia* (15,03 %), *Subdoligranulum* (9,68 %), *Faecalibacterium* (3,73 %) te *Ruminococcus* (3,68 %), a *Bacteroides* rod svega 1,61 %. Stoga, može se pretpostaviti da ovi ispitanici konzumiraju hranu s visokim udjelom masti i šećera.

Bakterijski rodovi pronađeni samo kod pojedinih ispitanika su: *Massilia* (IM-4), *Citrobacter* (IM-17), *Peptoniphilus* (IM-14), *Butyrivibrio* (IM-12) i *Desulfovibrio* (IM-24). *Massilia*, *Citrobacter* i *Desulfovibrio* spadaju u *Proteobacteria* koljeno, a *Peptoniphilus* i *Butyrivibrio* u *Firmicutes*.

#### 4.3. FINALNI IZVJEŠTAJ ZA ISPITANIKE

Na kraju je svaki ispitanik dobio popunjeni izvještaj koji je sadržavao rezultate analize crijevne mikrobiote, odnosno bakterijsku zastupljenost na različitim taksonomskim kategorijama koje su prikazane tablicama 1-7, te informacije o pojedinim bakterijama. U prilogu je prikazan izvještaj koji je služio kao predložak.

U tablici 1 izražena je postotna zastupljenost pojedinih bakterijskih koljena za ispitanika IM-1 iz koje je vidljivo da kod ispitanika IM-1 prevladavaju 3 bakterijska koljena, a to su: *Firmicutes* s 67,12 %, zatim *Bacteroidota* (*Bacteroidetes*) s 29,69 % i *Actinobacteriota* s 2,74 % što je u skladu s istraživanjima o sastavu humane crijevne mikrobiote drugih autora.

**Tablica 1.** Zastupljenost bakterijskih koljena kod ispitanika IM-1

IM-1	
Bakterijsko koljeno	%
<i>Actinobacteriota</i>	2,74
<i>Bacteroidota</i>	29,69
<i>Campilobacterota</i>	0,00
<i>Cyanobacteria</i>	0,16
<i>Deferribacterota</i>	0,00
<i>Desulfobacterota</i>	0,00
<i>Firmicutes</i>	67,12
<i>Fusobacteriota</i>	0,00
<i>Patescibacteria</i>	0,01
<i>Proteobacteria</i>	0,25
<i>Spirochaetota</i>	0,00
<i>Synergistota</i>	0,00
<i>Verrucomicrobiota</i>	0,00

Tablica 2 prikazuje deset najzastupljenijih bakterijskih porodica u postotcima kod ispitanika IM-1. Iz tablice je vidljivo da najveću zastupljenost ima *Lachnospiraceae* porodica s 39,23 % koja spada u *Firmicutes* koljeno, zatim *Bacteroidaceae* s 24,46 % i *Ruminococcaceae* porodica s 20,95 %.

**Tablica 2.** Deset najzastupljenijih bakterijskih porodica kod ispitanika IM-1

IM-1	
Bakterijska porodica	%
<i>Lachnospiraceae</i>	39,23
<i>Bacteroidaceae</i>	24,46
<i>Ruminococcaceae</i>	20,95
<i>Tannerellaceae</i>	2,45
<i>Rikenellaceae</i>	1,83
<i>Bifidobacteriaceae</i>	1,39
<i>Streptococcaceae</i>	1,38
<i>Erysipelatoclostridiaceae</i>	1,00
<i>Coriobacteriaceae</i>	0,84
<i>Butyricicoccaceae</i>	0,80

Tablica 3 u izvještaju prikazuje deset najzastupljenijih bakterijskih rodova koji su zastupljeni kod ispitanika, od najveće prema najmanjoj zastupljenosti.

**Tablica 3.** Deset najzastupljenijih bakterijskih rodova kod ispitanika IM-1

IM-1	
Bakterijski rod	%
<i>Bacteroides</i>	24,46
<i>Faecalibacterium</i>	14,34
<i>Agathobacter</i>	13,46
<i>Blautia</i>	7,20
<i>Subdoligranulum</i>	5,19
<i>Dorea</i>	2,72
<i>Tannerella</i>	2,34
<i>[Ruminococcus]_torques_group</i>	2,03
<i>Alistipes</i>	1,83
<i>Bifidobacterium</i>	1,39

**Tablica 4.** Zastupljenost odabranih bakterijskih rodova i njihov očekivani raspon za ispitanika IM-1

Bakterijski rod	IM-1	Očekivani raspon
<i>Alistipes</i>	1,83	< 8,94%
<i>Bacteroides</i>	24,46	< 50,12%
<i>Bifidobacterium</i>	1,39	< 11,11 %
<i>Blautia</i>	7,20	< 21,71 %
<i>Pseudomonas</i>	0,00	< 0,16 %
<i>Lachnospira</i>	0,06	< 3,43 %
<i>Lactobacillus</i>	0,05	< 3,18 %
<i>Faecalibacterium</i>	14,34	< 18,00 %
<i>Prevotella</i>	0,00	< 14,25 %
<i>Roseburia</i>	0,00	< 6,23 %
<i>Ruminococcus</i>	1,30	< 11,43 %
<i>Dorea</i>	2,72	< 3,47 %
Porodica <i>Verrucomicrobiaceae</i>	0,00	< 5,54 %

Tablica 4 prikazuje trinaest odabranih bakterijskih rodova, njihovu zastupljenost u postotcima i očekivani raspon koji je dobiven tako što je izračunata srednja vrijednost bakterijskog roda u populaciji +/- dvije standardne devijacije.

**Tablica 5.** Omjer koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* kod ispitanika IM-1 i referentna vrijednost

Ispitanik	Vrijednost ispitanika	Referentna vrijednost
IM-1	2,26	1,4 – 2,1

Ravnoteža *Firmicutes* i *Bacteroidetes* bakterija često se opisuje kao omjer *Firmicutes/Bacteroidetes*. Kod *Firmicutes/Bacteroidetes* omjera uočeno je da pretili osobe imaju veći omjer F/B, a mršave manji (Koliada i sur., 2017). Kasai i sur. (2015) te Riva i sur. (2017) potvrdili su da je pretilost povezana s povišenim razinama *Firmicutes* poput *Ruminococcaceae* i smanjenim razinama *Bacteroidetes* kao što su *Bacteroidaceae* i *Bacteroides*. Kao jedno od objašnjenja navode da je *Firmicutes* učinkovitiji u korištenju izvora energije od *Bacteroidetes* čime se omogućava veća dostupnost energije domaćinu koje rezultira povećanjem tjelesne mase. Međutim, rezultati nekih istraživanja nisu u skladu s prethodno navedenim istraživanjima, ali je iz brojnih studija provedenih na životinjama i ljudima poznato da je pretilost povezana sa sastavom crijevne mikrobiote (Koliada i sur., 2017). Visok udio *Bacteroidetes* koljena povezuje se s

prehranom baziranoj na proteinima, raznim aminokiselinama, zasićenim mastima i niskim razinama ugljikohidrata (Reyes i sur., 2016). Tablica 5 prikazuje *Firmicutes/Bacteroidetes* omjer ispitanika te referentnu vrijednost. Iz tablice je vidljivo da je omjer *F/B* blago veći od referentne vrijednosti što može ukazivati na pretilost. Od 59 analiziranih uzoraka samo 13 ih je unutar referentne vrijednosti koja iznosi 1,4-2,1.

**Tablica 6.** Omjer rodova *Prevotella/Bacteroides* i referentna vrijednost kod ispitanika IM-1

Ispitanik	Vrijednost ispitanika	Referentna vrijednost
IM-1	0,00	< 1,8

Nakon uvođenja enterotipova (*Bacteroides*, *Prevotella* i *Ruminococcus*), Roager i suradnici su uveli novi *Prevotella/Bacteroides* omjer, prikazan tablicom 6. Crijevni mikrobiom u kojem dominira *Prevotella*, kao što je već navedeno prethodno, povezuje se s vegetarijanstvom ili s neindustrijaliziranom prehranom bogatom vlaknima. Ovaj omjer je važan jer se pokazalo da su osobe s višim omjerom *Prevotella/Bacteroides* skloniji gubitku težine kada im je dana prehrana bogata vlaknima/cjelovitim žitaricama dok su osobe s većom količinom *Bacteroides* više gubile na težini kada su konzumirale kapsaicin, što naglašava potrebu za personaliziranom prehranom (van der Vossen i sur., 2022).

Primjeri mikrobioma bogatih *Prevotella* rodovima mogu se također pronaći u istraživanjima provedenim u ruralnim populacijama u Africi, Južnoj Americi, Sjeveroistočnoj Aziji gdje se konzumira više vlakana. S druge strane *Bacteroides* enterotip povezuje se s zapadnjačkom industrijaliziranom populacijom, odnosno hranom bogatom proteinima i animalnim mastima. Vangay i sur. (2018) pokazali su odmak od *Prevotella* prema dominantnijem mikrobiomu *Bacteroides* kao rezultat prehrane i okoliša u istraživanju u kojem su ljudi migrirali iz ruralnog Tajlanda u Sjedinjene Američke Države. Još jedno istraživanje koje su proveli Wu i sur. (2011) na devedeset osam odraslih osoba pokazalo je da osobe čija je mikrobiota bogata *Prevotellom* imaju tendenciju da konzumiraju više vlakana, dok oni s visokim udjelom *Bacteroides* konzumiraju više proteina i masti, što znači da postoji utjecaj dugotrajnog unosa hrane na relativnu brojnost ova dva roda unutar crijevne mikrobiote.

Na slici 16 vidljivo je da samo par ispitanika imaju omjer *Prevotella/Bacteroides* veći od 1, a to su: IM-3 (1,46), IM-73 (3,04), IM-81 (4,23), IM-89 (4,09). Povećani omjer

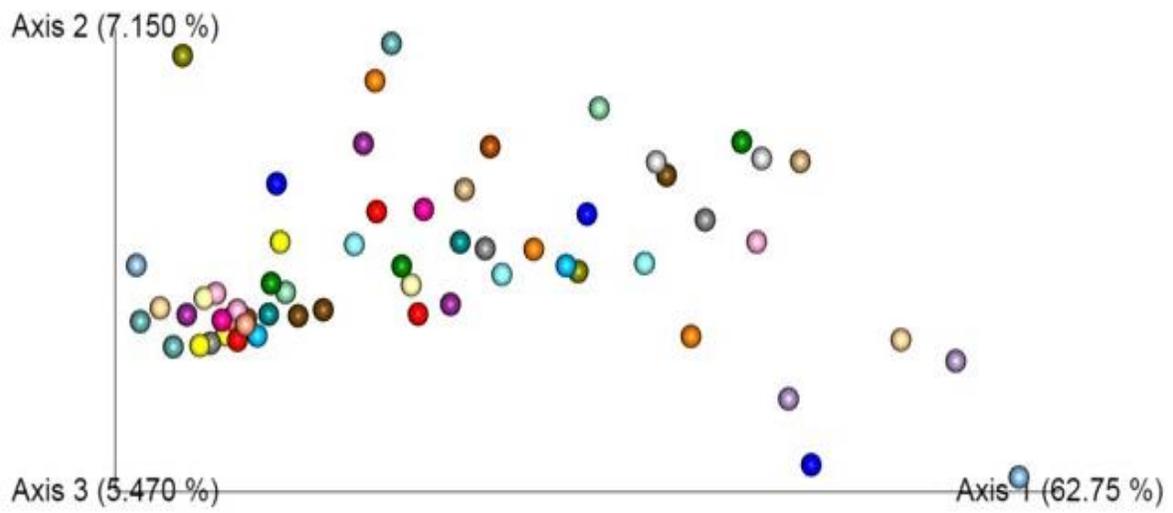
*Prevotella/Bacteroides* može biti posljedica povećanog unosa vlakana, budući da je dugoročni unos hrane bogate vlaknima povezan s povećanim obiljem *Prevotella* roda. Zastupljenost *Prevotella* roda kod ovih ispitanika prokomentirana je prethodno u radu.

**Tablica 7.** Vrijednost alfa raznolikosti i njezina referenta vrijednost kod ispitanika IM-1

Ispitanik	Vrijednost ispitanika	Referentna vrijednost
IM-1	134,80	68 - 283

Alfa raznolikost, prikazana tablicom 7, opisuje bogatstvo vrsta unutar svakog pojedinog uzorka, odnosno daje informaciju o broju i raznolikosti vrsta prisutnih u pojedinom uzorku. Smatra se da veća bakterijska raznolikost pozitivno djeluje na ljudsko zdravlje. Alfa raznolikost izražena je metrikom- *observed features* koja procjenjuje broj bakterijskih vrsta unutar pojedinog uzorka brojanjem različitih. Neki od uobičajenih indeksa alfa raznolikosti su: Chao indeks, Simpson indeks, Shannon indeks, ACE indeks i Good's Coverage indeks.

U ovom radu, prosječan broj vrsta koje sačinjavaju crijevnu mikrobiotu iznosio je 165. Najveću alfa raznolikost koja iznosi 283,1 određena je kod ispitanika IM-64, a najmanju IM-17 s 67,4. S druge strane, beta raznolikost daje informaciju koliko je promatrani uzorak sličan ili različit u usporedbi s ostalim uzorcima koji su analizirani. Što su točke na grafu bliže to su uzorci sličniji. Beta raznolikost svih promatranih pojedinaca prikazana je na slici 17.



**Slika 17.** Beta raznolikost promatranih uzoraka  
Svaka boja prikazuje jedan promatrani uzorak.

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Kvaliteta sekvenciranja nije bila dovoljna za spajanje očitanih sekvencija DNA te su za analizu korištena samo prednja očitavanja do 220-og nukleotida.
2. U promatranoj populaciji, sukladno postojećim istraživanjima, kao dominantna koljena su identificirana *Firmicutes* i *Bacteroidetes*.
3. Najzastupljeniji rod detektiran u promatranoj populaciji je *Bacteroides*, koji je najzastupljeniji u crijevnoj mikrobioti 29 od 59 ispitanika.
4. Rod *Prevotella* nije detektiran kod većine ispitanika, a zastupljenost veću od 10 % imaju samo četiri ispitanika.
5. Programi Excel i Word, paketa MS Office, uspješno su korišteni za obradu podataka o taksonomskoj zastupljenosti bakterija u uzorcima te izradu izvještaja za svakog ispitanika.

## 6. LITERATURA

Aldars-García L, Marin AC, Chaparro M, Gisbert JP (2021) The interplay between immune system and microbiota in inflammatory bowel disease: A Narrative Review. *Int J Mol Sci* **22**, 3076. <https://doi.org/10.3390/ijms22063076>

Bashiardes S, Zilberman-Schapira G, Elinav E (2016) Use of metatranscriptomics in microbiome research. *Bioinform Biol Insights* **10**, 19–25. <https://doi.org/10.4137/BBI.S34610>

Beam A, Clinger E, Hao L (2021) Effect of diet and dietary components on the composition of the gut microbiota. *Nutrients* **13**, 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu13082795>

The Biological Observation Matrix (BIOM) format (2022) < <https://biom-format.org/>> Pristupljeno: 10.12.2022.

Cresci GAM, Izzo K (2018) Gut microbiome. *Adult Short Bowel Syndr Nutr Medical, Surg Management* (Corrigan ML, Roberts K, Steiger E, ured.), Academic Press, str. 45–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814330-8.00004-4>

De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, i sur. (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. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1005963107>

Dieterich W, Schink M, Zopf Y (2018) Microbiota in the gastrointestinal tract. *Med Sci* **6**, 116. <https://doi.org/10.3390/MEDSCI6040116>

El-Sayed A, Aleya L, Kamel M (2021) Microbiota's role in health and diseases. *Environ Sci Pollut Res* **28**, 36967–36983. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-14593-Z>

Fasesan D, Dawkins K, Ramirez R, Rasheed-Jada H, Onilude A, Nash O, i sur. (2020) Analysis of a tropical warm spring microbiota using 16S rRNA metabarcoding. *Adv Microbiol* **10**, 145–165. <https://doi.org/10.4236/AIM.2020.104012>

Gomaa EZ (2020) Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* **113**, 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/S10482-020-01474-7>

Gubatan J, Boye TL, Temby M, Sojwal RS, Holman DR, Sinha SR, i sur. (2022) Gut microbiome in inflammatory bowel disease: role in pathogenesis, dietary modulation, and colitis-associated colon cancer. *Microorganisms* **10**, 1371. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071371>

Hasan N, Yang H (2019) Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ* **7**:e7502. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.7502>

HTDS (2022) Qubit 3.0 fluorometer. HTDS-Hi-Tech Detection Systems <<https://www.htds.fr/en/analytical-sciences/life-sciences/qubit-3-0-fluorometer/>> Pristupljeno: 13.12.2022.

Illumina (2022) Illumina sequencing platforms <<https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>> Pristupljeno: 13.12.2022.

Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjölund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L (2010) Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One* **5**. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009836>

Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **21**, 8836–8847. <https://doi.org/10.3748/WJG.V21.I29.8787>

Jiang Z, Sun T, He Y, Gou W, Zuo L, Fu Y, i sur. (2020) Dietary fruit and vegetable intake, gut microbiota, and type 2 diabetes: results from two large human cohort studies. *BMC Med* **18**, 371. <https://doi.org/10.1186/S12916-020-01842-0>

Johnson EL, Heaver SL, Walters WA, Ley RE (2017) Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *J Mol Med*. **95**, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1492-2>

Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, i sur. (2015) Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol* **15**, 100. <https://doi.org/10.1186/S12876-015-0330-2>

- Kable ME, Chin EL, Storms D, Lemay DG, Stephensen CB (2022) Tree-based analysis of dietary diversity captures associations between fiber intake and gut microbiota composition in a health US adult cohort. *The Journal of Nutrition* **152**, 779-788. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab430>
- Kim CC, Haley GR, Kelly WJ, Patchett ML, Jordens Z, Tannock GW i sur. (2019) Genomic insights from *Monoglobus pectinilyticus*: a pectin-degrading specialist bacterium in the human colon. *ISME J* **13**, 1437-1456. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0363-6>
- Kim H, Kim S, Jung S (2020) Instruction of microbiome taxonomic profiling based on 16S rRNA sequencing. *J Microbiol* **58**, 193–205. <https://doi.org/10.1007/S12275-020-9556-Y>
- King CH, Desai H, Sylvetsky AC, LoTempio J, Ayanyan S, Carrie J, i sur. (2019) Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PLoS One* **14**, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206484>
- Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, i sur. (2017) Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol* **17**, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1027-1>
- Kolodziejczyk AA, Zheng D, Elinav E (2019) Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol* **17**, 742–753. <https://doi.org/10.1038/S41579-019-0256-8>
- Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Poeso S, Navarrete P, i sur. (2020) The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients* **12**, 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>
- Mailing LJ, Allen JM, Buford TW, Fields CJ, Woods JA (2019) Exercise and the gut microbiome: a review of the evidence, potential mechanisms, and implications for human health. *Exerc Sport Sci Rev* **47**, 75–85. <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000183>
- Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske (2022) Dodaci prehrani. <<https://zdravstvo.gov.hr/o-ministarstvu/djelokrug-1297/sanitarna-inspekcija/hrana-1359/dodaci-prehrani-1841/1841>> Pristupljeno: 13.12.2022.
- Nephele: Microbiome Analysis (2022) Downstream Analysis Pipeline: Diversity. <[https://nephele.niaid.nih.gov/da\\_details/.](https://nephele.niaid.nih.gov/da_details/)> Pristupljeno: 10.12.2022.

Orbe-Orihuela YC, Lagunas-Martínez A, Bahena-Román M, Madrid-Marina V, Torres-Poveda K, Flores-Alfaro E, i sur. (2018) High relative abundance of firmicutes and increased TNF- $\alpha$  levels correlate with obesity in children. *Salud Publica Mex* **60**, 5–11. <https://doi.org/10.21149/8133>

Qian XB, Chen T, Xu YP, Chen L, Sun FX, Lu MP, i sur. (2020) A guide to human microbiome research: study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chin Med J (Engl)* **133**, 1844–1855. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000871>

QIIME 2 (2022) Overview of QIIME 2 Plugin Workflows. QIIME- Quantitative Insights Into Microbial Ecology, <<https://docs.qiime2.org/2020.8/tutorials/overview/>> Pristupljeno: 10.12.2022.

Ramirez J, Guarner F, Bustos Fernandez L, Maruy A, Sdepanian VL, Cohen H (2020) Antibiotics as major disruptors of gut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* **10**. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.572912>

Reyes LM, Vázquez RG, Arroyo SMC, Avalos AM, Castillo PAR, Pérez DAC, i sur. (2016) Correlation between diet and gut bacteria in a population of young adults. *Int J Food Sci Nutr* **67**, 470–478. <https://doi.org/10.3109/09637486.2016.1162770>

Riaz Rajoka MS, Shi J, Mehwish HM, Zhu J, Li Q, Shao D, i sur. (2017) Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. *Food Sci Hum Wellness* **6**, 121–130. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2017.07.003>

Riva A, Borgo F, Lassandro C, Verduci E, Morace G, Borghi E, i sur. (2017) Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ Microbiol* **19**, 95-105. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13463>

Rolhion N, Chassaing B (2016) When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **371**. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2015.0504>

Rossen JWA, Lerner A, Gorski A, Lal SK, Kho ZY (2018) The human gut microbiome – a potential controller of wellness and disease. *Front. Microbiol.* **9**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01835>

Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, i sur. (2018) Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr* **57**, 1-24. <https://doi.org/10.1007/S00394-017-1445-8>

Sassone-Corsi M, Raffatellu M (2015) No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J Immunol* **194**, 4081–4087. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403169>

Shreiner AB, Kao JY, Young VB (2015) The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroen* **31**, 69-75. <https://doi.org/10.1097/MOG.000000000000139>

Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, i sur. (2017) Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med* **15**. <https://doi.org/10.1186/S12967-017-1175-Y>

Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B (2020) The Influence of probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms* **8**, 1715. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>

Su Q, Liu Q (2021) Factors affecting gut microbiome in daily diet. *Front Nutr* **8**, 218. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.644138>

Thomas V, Clark J, Doré J (2015) Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiol* **10**, 1485-504. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.87>

Thompson S V., Bailey MA, Taylor AM, Kaczmarek JL, Mysonhimer AR, Edwards CG, i sur. (2021) Avocado consumption alters gastrointestinal bacteria abundance and microbial metabolite concentrations among adults with overweight or obesity: a randomized controlled trial. *J Nutr* **151**, 753–762. <https://doi.org/10.1093/JN/NXAA219>

Thursby E, Juge N (2017) Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* **474**, 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>

Tibbs TN, Lopez LR, Arthur JC (2019) The influence of the microbiota on immune development, chronic inflammation, and cancer in the context of aging. *Microb Cell* **6**, 324. <https://doi.org/10.15698/mic2019.08.685>

- Tomova A, Bukovsky I, Rembert E, Willy Y, Jihad A (2019) The effects of vegetarian and vegan diets on gut microbiota. *Front Nutr* **1**, 47. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00047>
- Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD (2018) Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* **361**, 36–44. <https://doi.org/10.1136/BMJ.K2179>
- van der Vossen EWJ, de Goffau MC, Levin E, Nieuwdorp M (2022) Recent insights into the role of microbiome in the pathogenesis of obesity. *Therap Adv Gastroenterol* **15**, 1–20. <https://doi.org/10.1177/17562848221115320>
- Vandana UK, Barlaskar NH, Gulzar ABM, Laskar IH, Kumar D, Paul P, i sur. (2020) Linking gut microbiota with the human diseases. *Bioinformation* **16**, 196. <https://doi.org/10.6026/97320630016196>
- Vangay P, Johnson AJ, Ward TL, Al-Ghalith GA, Shields-Cutler RR, Hillmann BM i sur. (2018) US immigration westernizes the human gut microbiome. *Cell* **175**, 962-972. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.10.029>
- Wegierska AE, Charitos IA, Topi S, Potenza MA, Montagnani M, Santacroce L (2022) The connection between physical exercise and gut microbiota: implications for competitive sports athletes. *Sport Med* **52**, 1–15. <https://doi.org/10.1007/S40279-022-01696-X>
- Wong CB, Odamaki T, Xiao JZ (2020) Insights into the reason of Human-Residential Bifidobacteria (HRB) being the natural inhabitants of the human gut and their potential health-promoting benefits. *FEMS Microbiol Rev* **44**, 369–385. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa010>
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA i sur. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**, 105-108. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1208344>
- Yang L, Bajinka O, Jarju PO, Tan Y, Taal AM, Ozdemir G (2021) The varying effects of antibiotics on gut microbiota. *AMB Express* **11**, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01274-w>
- Yang X, Xie L, Li Y, Wei C (2009) More than 9,000,000 unique genes in human gut bacterial community: estimating gene numbers inside a human body. *PLOS ONE* **4**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006074>

Zhang S, Chen DC, Chen LM (2019) Facing a new challenge: the adverse effects of antibiotics on gut microbiota and host immunity. *Chin Med J (Engl)* **132**, 1135. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000245>

## 7. PRILOZI



Pilot projekt:  
Crijevna mikrobiota radno-  
aktivne populacije RH

**Izveštaj: IM-1**

## Uvod

Mikroorganizme nalazimo posvuda - žive u i na nama, svim životinjama i biljkama i svom okolišu – od morskih dubina do planinskih vrhova. Trenutno ih možete naći svuda oko Vas - na Vašem telefonu, rukama (čak i nakon pranja), u vodi za piće (oko milijun po jednom mililitru!). Zapravo, naš planet Zemlja ne bi ovako izgledao da nema mikroorganizama jer su različite skupove mikroba neophodne za pravilno funkcioniranje ekosustava. Kako ekosustavi planete Zemlje imaju brojna staništa sa specifičnim organizmima koji su neophodni za pravilno funkcioniranje, slično je primjenjivo i na ljudsko tijelo. U manjoj mjeri ljudsko tijelo je također ekosustav s različitim mjestima na tijelu koja pružaju različita staništa za mikrobne zajednice. Zajednice mikroba koje žive u i na našem tijelu zajednički nazivamo mikrobiotom te u tijelu imamo različite mikrobite ovisno o dijelu tijela gdje mikrobi žive.

## Što je mikrobiota?

Mikrobiotom nazivamo sve mikroorganizme koji žive u i na nama, a sačinjavaju ju jednostavni mikroorganizmi koji obuhvaćaju bakterije, arheje i jednostanične eukariote. Od navedenih bakterije su najbrojnije i njihov broj se kod svakog od nas procjenjuje na 30 trilijuna ( $30 \cdot 10^{12}$ ) bakterijskih stanica što je jednako i procijenjenom broju ljudskih stanica u našem organizmu (<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>). Stoga se u posljednje vrijeme formira ideja čovjeka kao humanog *supraorganizma* koji nije više definiran samo našim ljudskim genima nego je uvelike zavisn i o mikrobim genima naše mikrobiote – koje skupno nazivamo mikrobiomom (<https://dx.doi.org/10.1038/nature06244>).

Prvi znanstveni dokazi o povezanosti ljudi i mikroorganizama dolaze s kraja 19. stoljeća kada je austrijski pedijatar Theodor Escher identificirao bakteriju crijevne flore djece, kasnije prozvanu *Escherichia coli*. Kasnijim istraživanjima otkrivene su i opisane brojne bakterije oralne, crijevne, urinarne i kožne flore koje su povezane s raznim zdravstvenim ishodima/stanjima. Međutim tek početkom 21.-og stoljeća se razvija koncept humane mikrobiote i započinje njeno intenzivno istraživanje, prvenstveno Projektom humanog mikrobioma započetog 2007. godine (<https://hmpdacc.org/>). Od svih mikrobnih zajednica u ljudskom tijelu, crijevni mikrobiom je daleko najgušći, najraznolikiji i fiziološki najvažniji ekosustav za naše cjelokupno zdravlje.

## Mikrobna raznolikost

Točan broj mikrobnih vrsta koji sačinjavaju humanu mikrobiotu još je uvijek nepoznat, a trenutne su procjene da je riječ o 900 do 1000 različitih mikrobnih vrsta koje žive sa svakim od nas. Znamo da se sastav mikrobnih vrsta razlikuje ne samo između pojedinaca nego i između pojedinih dijelova tijela istog pojedinca. Tako je na dlanu i lijeve i desne ruke istraživanih pojedinaca prisutno oko 150 raznih bakterijskih vrsta, a samo njih 17% je zajedničko i za lijevi i za desni dlan istog pojedinca, dok je samo 13% zajedničko između različitih pojedinaca. Mikrobiota svakog pojedinog dijela tijela također ima svoj „potpis“. Tako je mikrobiota dlana različitih pojedinaca sličnija po sastavu između različitih pojedinaca nego je njena sličnost npr. crijevnoj mikrobioti istog pojedinca (<https://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>).



### Koja su funkcije mikrobiote?

Većina članova humane mikrobiote djeluje pozitivno ili neutralno na naše zdravlje. Neki mikroorganizmi nam omogućuju probavljanje određenih namirnica, dok drugi sprečavaju naseljavanje štetnih bakterija. Međutim, ima i mikroorganizama koji mogu uzrokovati bolesti – obično pripadnici bakterijskih rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Neisseria*. U istraživanjima koje proučavaju utjecaj mikrobiote na pretilost pronađena je povećana zastupljenost bakterijskog roda *Prevotella* i koljena *Firmicutes* u pretilih osoba u odnosu na osobe s normalnom tjelesnom masom. Još nije razjašnjena uloga tih mikroorganizama u nastanku pretilosti, međutim trenutno se smatra da su ti mikroorganizmi uspješniji u izvlačenju ugljikohidrata iz hrane. Bitno je naglasiti da, iako je trenutno mikrobiota povezana s brojnim bolestima, znanstvene studije koje istražuju da li je specifičan sastav mikrobiote uzrok ili posljedica bolesti su još u počecima i rezultati najčešće nisu promjenjivi na širu populaciju.

### Kako znamo tko je tamo?

Napredak u istraživanju mikrobiote prvenstveno je nastao zahvaljujući razvoju tehnologije sekvenciranja DNA. Kako bi otkrili koji mikroorganizmi su prisutni u našoj mikrobioti koristimo varijabilne dijelove 16S rRNA gena kojeg iščitamo iz mikroorganizama naše mikrobiote te očitane sekvencu DNA usporedimo s poznatim mikroorganizmima kako bi identificirali sve prisutne pripadnike naše mikrobiote. Iako taj pristup nije idealan predstavlja trenutni „zlatni standard“ jer daje najbolji omjer pouzdanosti identifikacije mikroorganizama i cijene korištenjem trenutno dostupne tehnologije. Cilj pristupa je odrediti sve vrste mikroorganizama prisutnih u mikrobioti, no često iz raznih razloga nije moguće odrediti vrstu nego samo više taksonomske kategorije.



**CONSERVED REGIONS:** unspecific applications

**VARIABLE REGIONS:** group or species-specific applications

*Shematski prikaz 16S rRNA gena*

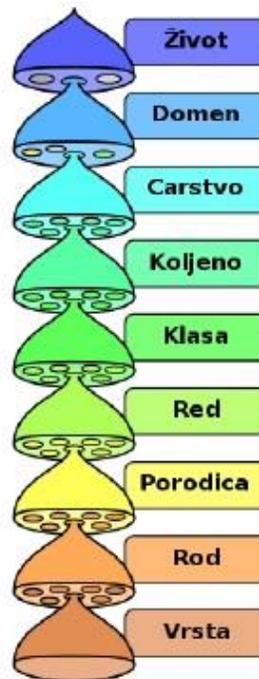
### Taksonomska klasifikacija

Taksonomija je znanost o svrstavanju organizama u skupine temeljene na zajedničkim karakteristikama ili evolucijskoj povezanosti. Svi živi organizmi klasificirani su upotrebom taksonomske klasifikacije

#### Razine mikrobne taksonomije

Taksonomska klasifikacija je hijerarhijsko grupiranje organizama u skupine sve manje sličnosti. Skupine organizama se mogu združiti s drugim relativno sličnim skupinama iste razine, kako bi se stvorila super-skupina viši razine. U taksonomiji bakterija najčešće korištene razine ili kategorije u njihovom uzlaznom redosljedju su: soj, vrsta, rod, porodica, red, klasa/razred, koljeno i domena.

Vrsta je osnovna razina bakterijske taksonomije. Više vrsta zajedno čini višu taksonomsku kategoriju – rod. Više rodova zajedno čini višu taksonomsku kategoriju – porodicu. Grupe bakterija na svakoj kategoriji ili razini imaju imena s karakterističnim završecima za tu kategoriju ili razinu.

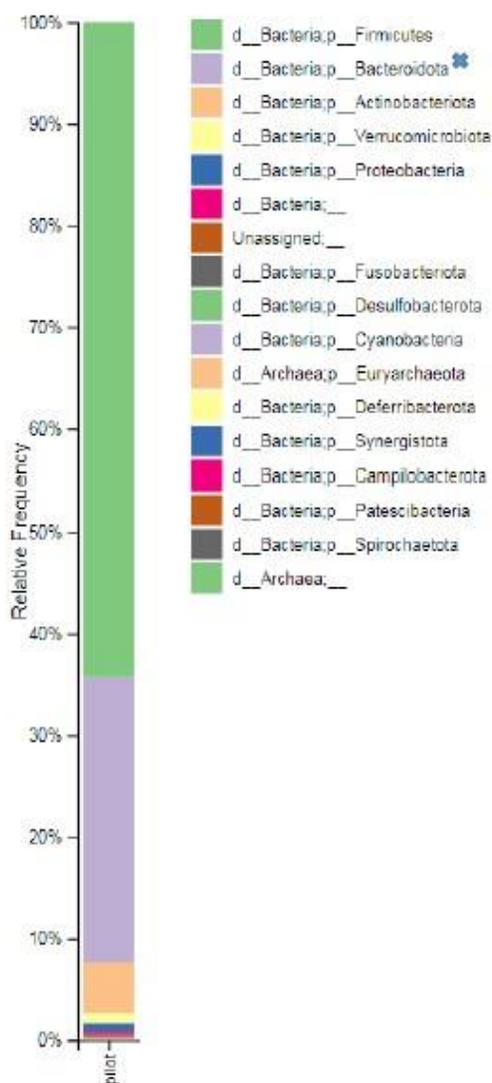


## Rezultati

### Taksonomska zastupljenost bakterija u uzorku

Analiza daje pregled mikroorganizama koji su identificirani u mikrobioti pojedinca. Prikazani su rezultati analize na taksonomskim nivoima koljena i porodice.

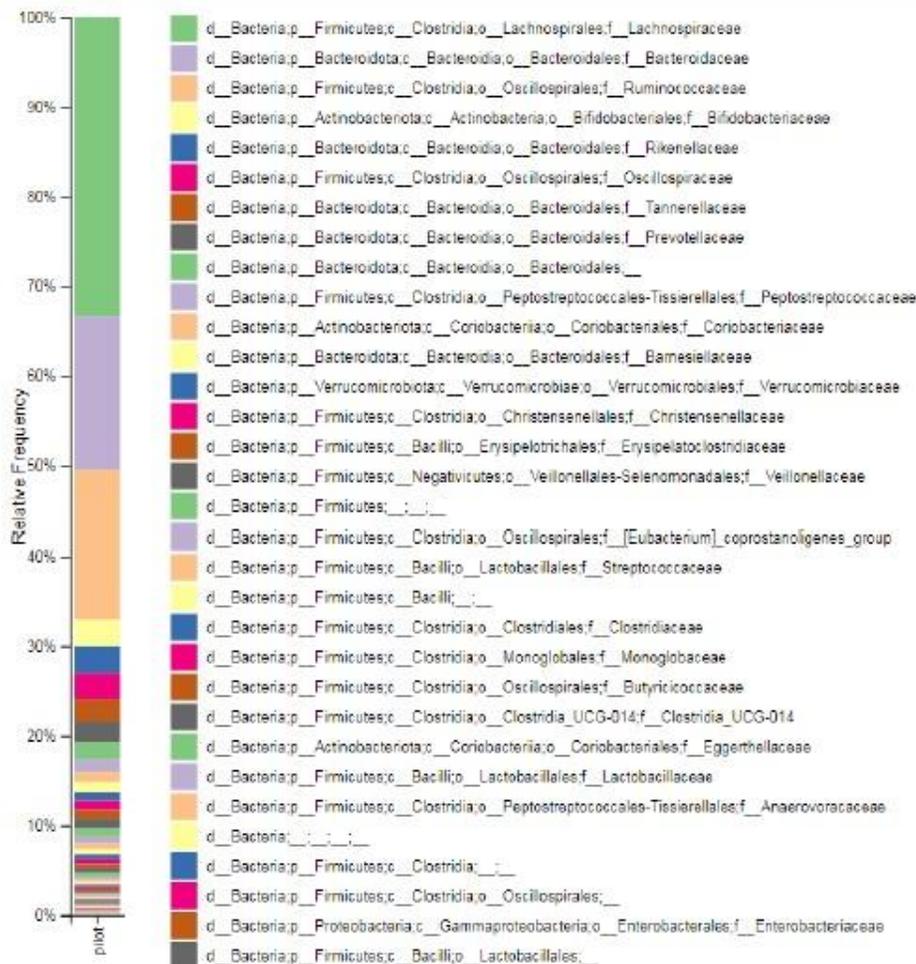
Stupčasti dijagram zastupljenosti bakterijskih koljena unutar populacije



✳ Bacteroidetes i Bacteroidota su sinonimi za isto bakterijsko koljeno



Stupčasti dijagram zastupljenosti bakterijskih porodica unutar populacije



Kada je taksonomija dodijeljena s oznakom \_\_ značava da se pojedinom slijedu DNA sekvence nije moglo pouzdano odrediti taksonomsku pripadnost. Slova ispred \_\_ označavaju taksonomsku kategoriju: d domenu, p koljeno, c klasu/razred, o red, f porodicu, g rod i s vrstu.

10 najzastupljenijih bakterijskih porodica određenih u Vašem uzorku

IM-X	
Bakterijska porodica	%

10 najzastupljenijih bakterijskih rodova određenih u Vašem uzorku

IM-X	
Bakterijski rod	%

Tablični prikaz rezultata (taksonomska kategorija: koljeno)

Bakterijsko koljeno	Ispitanik	Očekivani raspon
<i>Bacteroidetes</i>		10 – 60 %
<i>Firmicutes</i>		20 -80 %
<i>Proteobacteria</i>		0 - 10 %

Bakterijsko koljeno	Opis
<i>Bacteroidetes</i>	Bakterijsko koljeno <i>Bacteroidetes</i> čini većinu crijevne mikrobiote u velikom dijelu svjetske populacije. Najpoznatiji predstavnici ovog koljena su rodovi <i>Bacteroides</i> i <i>Prevotella</i> . Smatra se da imaju zaštitnu ulogu jer je manja zastupljenost korelirana sa pretilošću i upalnom bolesti crijeva (irritable bowel disease IBD). Smatra se da su podzastupljeni u "zapadnim" populacijama, a njihova zastupljenost se najbolje regulira prehranom i životnim stilom.
<i>Firmicutes</i>	Bakterijsko koljeno <i>Firmicutes</i> spada, zajedno s koljenom <i>Bacteroidetes</i> , u najčešće bakterije koje nalazimo u našoj crijevnoj mikrobioti. <i>Firmicutes</i> nam pomažu razgraditi masti koje naše tijelo potom može koristiti kao izvor energije. Smatra se da su našim precima pomogli preživjeti oštre zime zbog mogućnosti izvlačenja veće količine energije iz hrane koje unesemo što je rezultiralo stvaranjem zaliha masti u tijelu. Danas se povećana zastupljenost bakterijskog koljena <i>Firmicutes</i> povezuje s većim rizikom razvoja pretilosti. Upravo se omjer zastupljenosti koljena <i>Firmicutes</i> i <i>Bacteroidetes</i> uzima kao jedan od pokazatelja rizika razvoja pretilosti, pri čemu se smatra da pojedinci s omjerom većim od 3 imaju povećan rizik za razvoj pretilosti. Najpoznatiji predstavnici ovog koljena su rodovi <i>Lactobacillus</i> , <i>Clostridium</i> i <i>Roseburia</i> .
<i>Proteobacteria</i>	Bakterije koljena <i>Proteobacteria</i> globalno čine treće po zastupljenosti bakterijsko koljeno humane crijevne mikrobiote. Iako su prisutne u cjelokupnoj populaciji primijećeno je da u pojedinaca s upalnim bolestima crijeva njihova zastupljenost veća, zajedno sa smanjenom ukupnom raznolikosti prisutnih bakterijskih vrsta. Najpoznatiji rodovi ovog koljena su <i>Escherichia/Shigella</i> i <i>Pseudomonas</i> .

Tablični prikaz rezultata (taksonomska kategorija: rod)

Bakterijski rod	Ispitanik	Očekivani raspon
<i>Alistipes</i>		< 8,94%
<i>Bacteroides</i>		< 50,12%
<i>Bifidobacterium</i>		< 11,11 %
<i>Blautia</i>		< 21,71 %
<i>Pseudomonas</i>		< 0,16 %
<i>Lachnospira</i>		< 3,43 %
<i>Lactobacillus</i>		< 3,18 %
<i>Faecalibacterium</i>		< 18,00 %
<i>Prevotella</i>		< 14,25 %
<i>Roseburia</i>		< 6,23 %
<i>Ruminococcus</i>		< 11,43 %
<i>Dorea</i>		< 3,47 %
Porodica <i>Verrucomicrobiaceae</i>		< 5,54 %

Bakterijski rodovi	Opis
<i>Alistipes</i>	<i>Alistipes</i> je bakterijski rod komenzalnih bakterija (bakterije koje imaju korist od domaćina, a njemu ne štete) koje su prisutne u manjem broju u ljudskom probavilu i znak su dobrog gastrointestinalnog zdravlja. Odgovara im prehrana bazirana na biljkama, dok

	prehrana bogata mesom i životinjskim mastima inhibira njihov rast. Neke studije su pokazale obrnutu povezanost između visokog indeksa tjelesne mase (ITM - eng. Body mass index - BMI) i zastupljenosti roda <i>Alistipes</i> u crijevnoj mikrobioti. Također ima naznaka da je zastupljenost roda <i>Alistipes</i> smanjena kod ljudi s upalnim bolestima crijeva, kod ulcerativnog kolitisa i Chronove bolesti.
<b><i>Bacteroides</i></b>	Rod <i>Bacteroides</i> spada u najzastupljenije rodove u našoj crijevnoj mikrobioti. Zbog raznovrsnog metabolizma se smatra pozitivnim članom naše crijevne mikrobiote, međutim izvan probavnog trakta može izazvati ozbiljne patološke pojave poput bakterijemija i apscesa. Kako bakterije ovog roda nemaju dobru sposobnost razgradnje masti nalazimo ih kod ljudi koji prehranom unose malo masti. Zbog učinkovite razgradnje kompleksnih šećera smatra se da su zastupljeniji u dijabetičara nego u zdravoj populaciji. Pronađena je i vrsta <i>Bacteroides</i> (sp D8) koja ima mogućnost razgradnje kolesterola u teže probavljive spojeve i za koju se smatra da pomaže u održavanju dobrog kardiovaskularnog zdravlja usprkos prehrani bogatom kolesterolom.
<b><i>Bifidobacterium</i></b>	Bakterije iz roda <i>Bifidobacterium</i> generalno smatramo važnim saveznicima u održavanju zdravlja dojenčadi. U mikrobioti odraslih osoba zastupljenost bifidobakterija se smanjuje s godinama, tako da u odrasloj populaciji čine do 3% ukupne crijevne mikrobiote. Bifidobakterije su nepatogene te se često dodaju hrani zbog pozitivnog djelovanja na zdravlje. Njihovo djelovanje uključuje bolju podnošljivost laktoze, sprečavanje proljeva i ublažavanje alergija na hranu.
<b><i>Blautia</i></b>	Rod <i>Blautia</i> sudjeluje u razgradnji kompleksnih ugljikohidrata. Veća zastupljenost ovih bakterija u crijevnoj mikrobioti snažan je indikator zdravlja probavnog sustava. Pokazano je da zastupljenost u zdravoj populaciji roda <i>Blautia</i> je veća nego u pacijenata koji boluju od raka debelog crijeva i dijabetesa.
<b><i>Pseudomonas</i></b>	Rod <i>Pseudomonas</i> je gram negativna bakterija iz koljena Proteobacteria. Povećana zastupljenost roda povezana je s upalnom aktivnosti u crijevima te može biti uzrok abdominalnih grčeva i rijetke stolice.
<b><i>Lachnospira</i></b>	Rod <i>Lachnospira</i> je jedan od osnovnih bakterijskih rodova humane crijevne mikrobiote čija se zastupljenost povećava sa starenjem. Članovi ovog roda su jedni od glavnih proizvođača kratkolančanih masnih kiselina. Pojedine vrste su povezane s razvojem bolesti poput pretilosti, zatajenjem bubrega, bolesti jetre i upalnih bolesti crijeva, iako njihova uloga u razvoju tih bolesti nije konzistentna između istraživanja.
<b><i>Lactobacillus</i></b>	<i>Lactobacillus</i> bakterije su često prisutne u probavilu, usnoj šupljini i vagini. Smatramo ih tzv. "dобрим bakterijama" koje doprinose zdravlju pojedinca i obično su sastavni dio probiotičkih pripravaka. Karakterizira ih sposobnost proizvodnje mliječne kiseline kao nusprodukta metabolizma glukoze. Obično su prisutne u fermentiranim mliječnim proizvodima. Dodaci prehrani s laktobacilima se koriste za liječenje i sprečavanje diareje.
<b><i>Faecalibacterium</i></b>	Predstavnik roda je <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , jedna od tri najzastupljenija anaeroba crijevne mikrobiote čija zastupljenost je oko 5% u globalnoj populaciji. Smatra se da pozitivno djeluje na naše zdravlje jer je povezan s jačanjem imuno odgovora i smanjivanjem upale. Manja zastupljenost je povezana s upalnim bolestima crijeva, pretilošću i astmom.
<b><i>Prevotella</i></b>	<i>Prevotella</i> su najzastupljenije u mikrobioti vegetarijanaca i „nezapadnjačkih“ populacija. Generalno ih nalazimo visoko zastupljene u osoba koje imaju prehranu bogatu kompleksnim ugljikohidratima, a siromašnu proteinima i mastima životinjskog porijekla.
<b><i>Roseburia</i></b>	<i>Roseburia</i> u probavnom sustavu pomaže u razgradnji kompleksnih ugljikohidrata iz cjelovitih žitarica. Kao nusprodukt razgradnje te bakterije proizvode butirat, kemijski spoj koji je hrana za kolonocite, stanice koje oblažu stijenku debelog crijeva. Smanjena zastupljenost roda <i>Roseburia</i> primijećena je kod pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva, dok je povišena zastupljenost povezana s gubitkom tjelesne mase i smanjenom glukoznom intolerancijom.
<b><i>Ruminococcus</i></b>	Rod <i>Ruminococcus</i> ima važnu ulogu u probavnom sustavu pomažući nam u razgradnji rezistentnih škrobova - kompleksnih ugljikohidrata koje nalazimo u hrani bogatoj vlaknima - npr. grah, leća, cjelovite žitarice. Spora razgradnja tog tipa ugljikohidrata je povezana s brojem pozitivnim zdravstvenim učincima, poput oporavka od infektivnog proljeva, smanjenog rizika od razvoja dijabetesa i karcinoma debelog crijeva.

<b>Dorea</b>	Rod <i>Dorea</i> je primjer bakterija čije djelovanje može biti pro- i anti-upalno, ovisno o dostupnim hranjivim tvarima ili prisustvu drugih bakterija. Smatra se da je jedan od članova „zdrave“ crijevne flore, iako neke studije povezuju njenu veća zastupljenost s upalnim bolestima poput Chronove bolesti. Opažena je povećana zastupljenost u osoba koje unose više polinezasićenih masnih kiselina od zasićenih masnih kiselina.
<b>Porodica Verrucomicrobiaceae</b>	Porodica <i>Verrucomicrobiaceae</i> je relativno novootkrivena bakterijska porodica izolirana iz vodenih okoliša i humanog fecesa. Jedan od najznačajnijih pripadnika je <i>Akkermansia muciniphila</i> , jedna od ključnih bakterija za održavanje crijevne barijere

Tablični prikaz rezultata (taksonomska kategorija: vrsta)

Bakterijska vrsta	Ispitanik	Očekivani raspon
<i>Akkermansia muciniphila</i>	ND	/
<i>Bacteroides fragilis</i>	ND	/
<i>Desulfovibrio piger</i>	ND	/
<i>Escherichia coli</i>	ND	/
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ND	/
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	ND	/

Bakterijska vrsta	Opis
<i>Akkermansia muciniphila</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i> je čest mikroorganizam humane crijevne mikrobiote sa zastupljenošću 1-7%. Ovaj mikroorganizam je povezan s tjelesnom masom, tako da osobe koje imaju više <i>Akkermansie</i> imaju nižu tjelesnu masu. Bakterija se hrani sa sluzi koja oblaže unutarnju površinu crijeva. Koristi se kao probiotik jer se smatra da ima protuupalno djelovanje.
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> pripada koljenu <i>Bacteroidetes</i> i sastavni je dio normalne humane crijevne mikrobiote. Kod animalnih modela pokazuje zaštitno djelovanje protiv kolitisa. Smatra se bezopasnim mikroorganizmom te korisnim kada se nalazi u crijevima, a patogenom ukoliko slučajno uđe u krvotok.
<i>Desulfovibrio piger</i>	Bakterija <i>Desulfovibrio piger</i> ima mogućnost reduciranja sulfata, tj. "disanja" korištenjem sulfata umjesto kisika. Dio su normalne humane mikroflore, iako povećana zastupljenost može biti povezana s određenim gastrointestinalnim poremećajima, poput upalnih bolesti crijeva.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> je jedan od uobičajenih mikroorganizama crijevne mikrobiote. Pomaže u procesu probave, kod razgradnje i apsorpcije hrane te proizvodnje vitamina K. Iako većina sojeva nije štetna za domaćina postoje i oni koji mogu izazvati ozbiljne bolesti. U humanoj mikrobioti zastupljena je sa 1,5-2%.
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Faecalibacteria</i> su česti mikroorganizmi koji sudjeluju u razgradnji kompleksnih ugljikohidrata, poglavito rezistentnih škrobova iz grahorica i cjelovitih žitarica. Neke studije sugeriraju da povećana zastupljenost <i>Faecalibacterium</i> vrste ima protektivnu ulogu kod upalnih bolesti crijeva (posebno Chronove bolesti), međutim još nema pouzdanih rezultata.
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	<i>Methanobrevibacter smithii</i> je vrsta koju nalazimo u crijevima zdrave populacije. Ima ulogu u razgradnji kompleksnih šećera pri čemu proizvodi metan. Visoka zastupljenost bakterije u mikrobioti je povezana sa zatvorom.

Sastav crijevne mikrobiote pojedinca određen je brojnim faktorima poput prehrane, životnog stila, uzimanje pojedinih lijekova i genetike domaćina. Kratkotrajne promjene prehrambenih navika mogu brzo promijeniti sastav mikrobiote.

- Prehrana većinom zasnovana na životinjskim namirnicama povećava zastupljenost organizama koje dobro toleriraju žučne soli, poput roda *Bacteroides*, te rezultira smanjivanjem zastupljenosti saharolitičkih bakterija

- Prehrana većinom zasnovana na biljnim namirnicama rezultira povećanom zastupljenošću saharolitičkih bakterija, poput roda *Roseburia* i *Faecalibacterium prausnitzii*, koje metaboliziraju biljne polisaharide

### Omjer koljena Firmicutes/Bacteroidetes

Dva najveća bakterijska koljena koja sačinjavaju humanu crijevnu mikrobiotu su *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Bakterije koljena *Firmicutes* razgrađuju neprobavljene dijelove hrane i proizvode kratko lančane ugljikohidrate i masne kiseline koje našem tijelu služe kao dodatan izvor energije. Odnos između ove dvije grupe, izražen kao omjer *Firmicutes/Bacteroidetes* je povezan s nekim bolesnim stanjima organizma:

- Pretilost – povećana zastupljenost *Firmicutes* i/ili smanjena zastupljenost *Bacteroidetes*
- Poremećaj metaboličke homeostaze – npr. dijabetes tip 2 i nealkoholna masna bolest jetre
- Povišeni upalni markeri – npr. IL-6

Ispitanik	Vrijednost ispitanika	Referentna vrijednost
IMxx		1,4 – 2,1

### Omjer rodova Bacteroides/Prevotella

*Bacteroidetes* i *Prevotella* su u generalnoj populaciji jedni od najzastupljenijih bakterijskih rodova. Ova dva roda se koriste kao indikatori tipa prehrane pojedinca. Visoki udio roda *Bacteroidetes* pozitivno je povezan s prehranom bogatom mastima i proteinima, dok je visoki udio roda *Prevotella* povezan s prehranom bogatom biljnim vlaknima i siromašnijom proteinima i mastima.

Ispitanik	Vrijednost ispitanika	Referentna vrijednost
IMxx		< 1,8

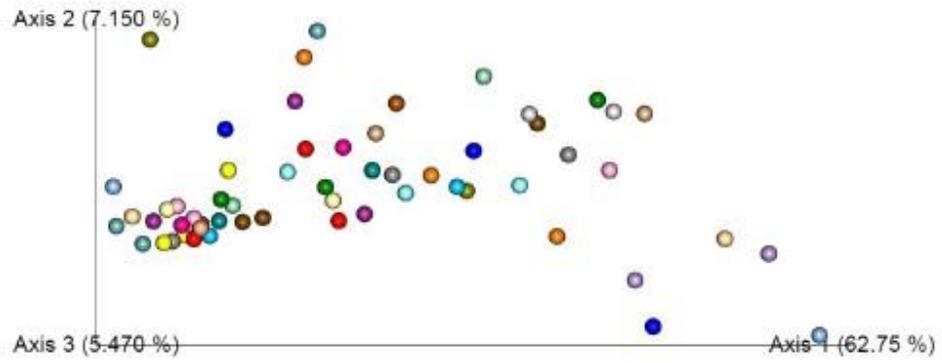
### Alfa raznolikost

Alfa raznolikost je mjera koja daju procjenu broja bakterijskih vrsta i njihove raznolikosti i zastupljenosti u pojedinom uzorku. Generalno se smatra da povećan broj vrsta, dakle veća bakterijska raznolikost, pozitivno djeluje na naše zdravlje. Još uvijek nema brojčanih parametara koji bi odredili normalan raspon vrijednosti nego se kao referentna uzima promatrana populacija. U ovom slučaju alfa raznolikost je izražena metrikom *observed\_otus* koja procjenjuje broje bakterijskih vrsta unutar pojedinog uzorka. Unutar promatrane populacije prosječan broj vrsta koje sačinjavaju crijevnu mikrobiotu pojedinca je 165.

Ispitanik	Vrijednost ispitanika	Referentna vrijednost
IMxx		68 - 283

### Beta raznolikost

Beta raznolikost daje informaciju koliko je promatrani uzorak sličan ostaloj populaciji. Uzorci su prikazani kao točke u trodimenzionalnom prostoru i udaljenost između točaka odgovara njihovoj sličnosti – što su točke bliže to su uzorci sličniji.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Šerbečić Selma, 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.

---

Vlastoručni potpis