

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Tena Čadež i Marina Zubčić

In vitro sustav za testiranje utjecaja probiotika i
prebiotika na ravnotežu crijevne mikrobiote

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Kabinetu za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Jurice Žučka i dr.sc. Damira Orosa te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

Popis i objašnjenje kartica

- AFLP - polimorfizam duljine umnoženih fragmenata
- BMI – indeks tjelesne težine
- BP – bazna prihrana
- DGGE - elektroforeza u gradijentu denaturirajućeg agensa
- FCM - protočna citometrija
- FISH - fluorescentna *in situ* hibridizacija
- LAB – bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu
- OTU – operacijske taksonomske jedinice
- PCoA – osnovna koordinatna analiza
- PCR – polimerazna lančana reakcija
- QIIME – „Quantative Insights Into Microbial Ecology“
- qPCR - kvantitativni PCR
- SCFA - kratkolančane masne kiseline
- RFLP - polimorfizam veličine restrikcijskih fragmenata
- SHIME – „Simulator for Human Intestinal Microbiological Ecosystem“
- SIEM - mediji koji simulira "Ileal eflux"
- TIM-2 - "TNO's Intestinal Model".

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	2
3. TEORIJSKI DIO	3
3.1. MIKROBIOTA	3
3.2. RAZVOJ NORMALNE HUMANE CRIJEVNE MIKROBIOTE	3
3.3. BIORAZNOLIKOST MIKROBIOTE I METODE ODREĐIVANJA BIORAZNOLIKOSTI.....	5
3.4. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SASTAV MIKROBIOTE	7
3.5. UTJECAJ PROBIOTIKA I PREBIOTIKA NA SASTAV MIKROBIOTE.....	9
3.5.1. Probiotici	9
3.5.2. Prebiotici	10
3.6. SASTAV MIKROBIOTE I PRETILOST	13
3.7. <i>IN VITRO</i> SUSTAVI ZA SIMULACIJU UVJETA DEBELOG CRIJEVA	14
4. MATERIJALI I METODE	19
4.1. MATERIJALI	19
4.1.1. Hranjiva podloga za anaerobni uzgoj u bioreaktoru	19
4.1.2. Bakterijska probiotička kultura	20
4.1.3. Prebiotik	21
4.1.5. Mikrobna kultura za inokulaciju	21
4.1.4. Laboratorijska oprema za pripremu, praćenje procesa i obradu uzoraka.....	21
4.2. METODE	24
4.2.1. Priprema hranjivih podloga	24
4.2.2. Sterilizacija podloge, pribora i aparature	24
4.2.3. Faza prilagodbe mikrobiote u laboratorijskom bioreaktoru	24
4.2.4. Vođenje anaerobnog mikrobnog procesa u bioreaktoru.....	25
4.2.5. Automatizirana izolacija DNA	26
4.2.6. Mjerenje koncentracije DNA	27
4.2.7. Sekvencioniranje 16S rRNA marker gena	27
4.2.8. Obrada podataka sekvencioniranja i analiza bakterijske bioraznolikosti.....	27
5. REZULTATI	29
5.1. REZULTATI TAKSONOMSKE RAZNOLIKOSTI	29
5.2. ALFA RAZNOLIKOST	32
5.3. BETA RAZNOLIKOST	33
6. RASPRAVA	35
7. ZAKLJUČCI	38
8. ZAHVALE	39
9. POPIS LITERATURE	40
10. SAŽETAK	47
11. SUMMARY	48

1.UVOD

Pojmovi mikrobiote i mikrobioma se prvenstveno povezuje s mikroorganizmima koji obitavaju u ljudskom debelom crijevu. Procjenjuje se da se u debelom crijevu čovjeka nalazi 10 puta više bakterijskih stanica nego ljudskih koje ukupno mogu težiti i 1-2 kg. Također se procjenjuje da se crijevna mikrobiota sastoji od 500-1000 zasebnih vrsta bakterija koje sve pripadaju u sedam bakterijskih koljena od čega 64% ukupne mikrobiote čine bakterije koljena *Firmicutes*, 23% *Bacteroidetes*, 8% *Proteobacteria*, 3% *Actinobacteria* te manje od 1% pripada koljenima *Verrucomicrobia*, *Cianobacteria* i *Fusobacteria* ((D'Argenio & Salvatore, 2015; Šušković, 2016). Razvojem naprednih tehnika sekvencioniranja i poboljšavanjem bioinformatičkih metoda omogućeno je ne samo određivanje bakterijskih vrsta prisutnih u debelom crijevu, nego i njihovog ukupnog genoma zvanog mikrobiom. Najnovije sekvencijske analize metagenoma (MetaHIT i Human Microbiome Project) su iznjedrile katalog gena mikroorganizama u kojem je identificirano 3.3 milijuna ne redundantnih mikrobnih gena što je otprilike 150 puta više od ljudskog genoma i na taj način pomogli u lakšem shvaćanju uzajamnih djelovanja mikrobiote i domaćina. Crijevna mikrobiota je kompleksan i dinamičan ekosistem koji koegzistira s organizmom domaćina i u njemu ima različit utjecaj i djelovanje na metabolizam, imunološki i endokrini sustav. Kvantitativne i kvalitativne promjene u sastavu crijevne mikrobiote rezultiraju tzv. disbiozom koja se pak povezuje s povećanom incidencijom crijevnih bolesti (Ursell i sur., 2012; Borody i sur., 2013). Povećanjem znanja i shvaćanja funkcija mikrobioma omogućio bi se razvoj novih dijagnostičkih, prognostičkih i terapijskih strategija koje se baziraju na manipulacijama mikrobiote kako bi se na taj način utjecalo na ljudsko zdravlje. Iz tog razloga se veliki napori ulažu u razvoj novih sustava i modela kojima bi se učinkovito simulirali uvjeti debelog crijeva i potom utjecaji različitih intervencija na sastav mikrobiote u samom sustavu.

Svrha ovog rada je bila ispitati koliko je odabrani i prilagođeni *in vitro* sustav dobar za održavanje postojanog sastava inokulirane mikrobiote te reproducibilnost samog sustava. Nadalje, ispitivao se utjecaj probiotika *Lactobacillus plantarum* D13 i prebiotika Nutrise[®] FB06 na sastav prethodno stabilizirane mikrobiote inokulirane u *in vitro* sustav nakon čega su se određivali čimbenici koji potencijalno mogu promijeniti inokuliranu crijevu mikrobiotu.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovog rada je :

1.) Odrediti čimbenike koji utječu na sastav mikrobiote probavnog sustava pretile osobe kako bi se njen sastav približio sastavu mikrobiote dijela populacije normalne tjelesne težine.

Specifični ciljevi ovog rada su:

1.) Održavati sastav gastrointestinalne mikrobiote unutar 24 sata stabilnim korištenjem *in vitro* sustava koji simulira uvjete u silaznom dijelu ljudskog debelog crijeva.

2.) Pratiti promjene sastava stabilizirane mikrobiote probavnog sustava u *in vitro* sustavu nakon dodatka probiotika *Lactobacillus plantarum D13*.

3.) Pratiti promjene sastava stabilizirane mikrobiote s dodanim probiotikom u *in vitro* sustavu nakon dodatka prebiotika NUTRIOSE® FB06.

3. TEORIJSKI DIO

3.1. MIKROBIOTA

Izraz mikrobiota je prvi put upotrijebio Joshua Lederberg kako bi označio ekološku zajednicu komenzalnih, simbiotskih i patogenih mikroorganizama koji obitavaju u tijelu i koje se dosad zapostavljalo pri determinaciji zdravlja i bolesti (Lederberg i McCray, 2001).

Mikrobiota se definira kao zajednica mikroorganizama koja uključuje bakterije, arheje, viruse i pojedine jednostanične eukariote, koji obitavaju u specifičnoj okolini. Drugi izraz koji se jednoznačno koristi je mikrobiom, međutim on po definiciji označava sveukupan genetički materijal određene mikrobiote. Područje molekularnih istraživanja koja proučavaju složenost mikrobioma se naziva metagenomika (D'Argenio & Salvatore 2015).

Znajući da mikroorganizmi obitavaju na i u ljudskom tijelu te da mikroorganizmi u crijevu sintetiziraju određene vitamine i proizvode proteine koji su uključeni u funkcije važne za zdravlje domaćina, kao što su enzimi potrebni za razgradnju inače neprobavljivih prehrambenih sastojaka, možemo reći da zapravo imamo dva genoma, jedan naslijeđen od roditelja, a drugi dobiven od mikrobiote probavnog trakta. Najvažnija razlika između ova dva genoma je u tome da naslijeđeni genom ostaje stabilan tokom cijelog života dok je dobiveni mikrobiom izrazito dinamičan i podliježe različitim utjecajima (D'Argenio & Salvatore 2015).

Kapacitet kodiranja kolektivnog mikrobnog genoma daleko premašuje genetički kapacitet kodiranja koji ima ljudski genom. Crijevni mikrobiom kodira biokemijske puteve koje ljudski mikrobiom još nije razvio i zbog toga se crijevnu mikrobiotu kod ljudi može smatrati individualnim organom smještenim u probavnom sustavu koji ima metabolički kapacitet veći od jetre za koju se smatra da je najsvestraniji ljudski organ (Egert et al. 2006).

Crijevna mikrobiota obavlja razne funkcije koje ljudsko tijelo nije u mogućnosti samo provesti, zbog čega možemo reći da mikrobiota obitava u simbiozi s ljudima. Neke od funkcija koje mikrobiota obavlja su održavanje normalnih probavnih i imunoloških funkcija, a to uključuje: učinkovitu probavu hrane, odnosno fermentaciju ljudima inače neprobavljivih sastojaka hrane, sintezu vitamina, osobito vitamina B9, B12 i vitamina K (Hill, 1997) i drugih esencijalnih mikronutrijenata, metabolizam toksina i karcinogena iz hrane, konverziju kolesterola i žučnih soli, doprinos u sazrijevanju imunološkog sustava, utjecaj na rast i diferencijaciju enterocita, regulaciju crijevne angiogeneze i zaštitu od enteričkih patogena (Gérard 2016).

3.2. RAZVOJ NORMALNE HUMANE CRIJEVNE MIKROBIOTE

Dugo se vjerovalo kako je crijevo čovjeka sterilno prije rođenja, ali novija istraživanja pokazuju kako crijevni mikrobiom postoji i *in utero*. Jimenez i suradnici, 2008. godine su na uzorcima iz prvog mekonija zdrave novorođenčadi proveli analizu gdje su sekvencionirali 16S rRNA gen i dobili rezultate koji su pokazali da se u mekoniju nalazi relativno jednostavna i oskudna zajednica mikroorganizama kojom dominiraju rodovi poput *Escherichia-Shigella*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Streptococcus*, a najnovija istraživanja su otkrila da, ne samo da se mikrobiom *in utero* nalazi u crijevima, nego da i u posteljici obitava oskudan, ali metabolički vrlo aktivan mikrobiom koji je sastavom najbliži oralnom mikrobiomu. Mikrobiom posteljice većinom čine nepatogene komenzalne bakterije iz koljena *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* i *Fusobacteria* (Hollister et al. 2014; Jimenez i sur., 2008; Aagaard et al. 2014).

Početni sastav crijevne mikrobiote novorođenčeta ovisi i o načinu poroda, da li je novorođenče rođeno vaginalnim putem ili carskim rezom. Novorođenčad rođena vaginalnim putem imaju mikrobiotu koja više nalikuje vaginalnoj mikrobioti majke i poglavito se sastoji od rodova *Lactobacillus* i *Prevotella*, dok novorođenčad rođena carskim rezom imaju mikrobiotu koja više nalikuje majčinoj mikrobioti na koži i sastoji se od rodova *Staphylococcus*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium*. Osim načina poroda, velik utjecaj na sastav mikrobiote ima i način hranjenja. Tako bebe dojene majčinim mlijekom koje sadrži različite nutrijente kao što su oligosaharidi, antitijela i različite komenzalne bakterije, imaju u crijevu mikrobiotu kojom dominiraju bakterije roda *Bifidobacterium* i u usporedbi s novorođenčadi hranjenoj s formulama imaju nižu razinu bakterija roda *Atopobium* (Hollister et al. 2014; Xu & Knight 2014).

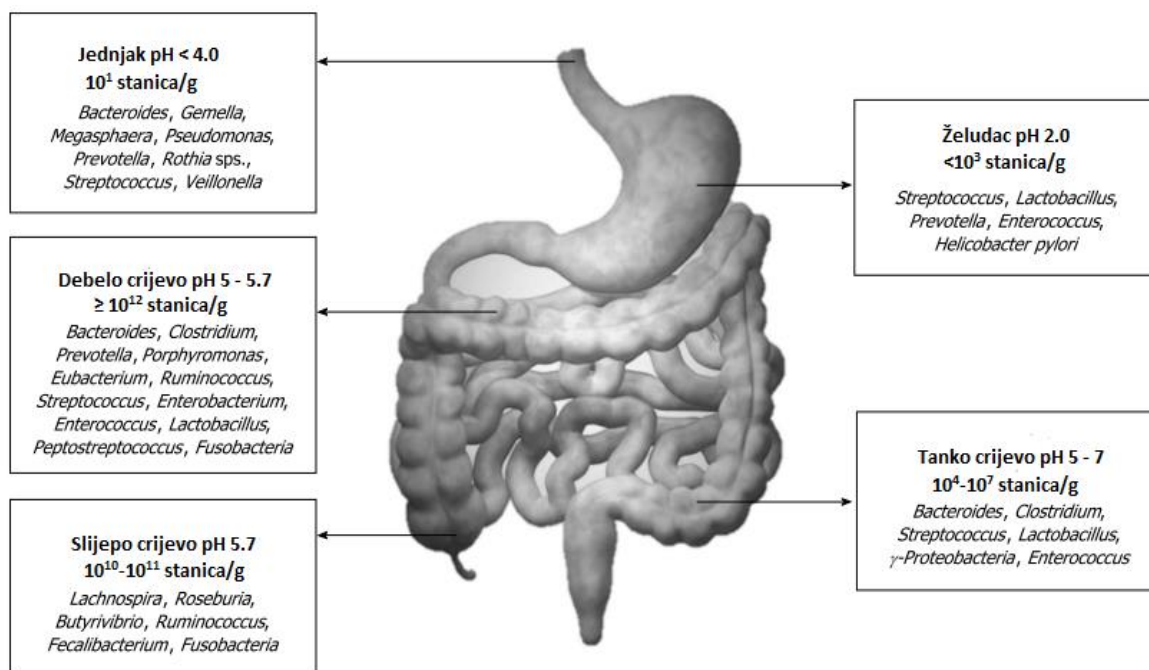
Budući da crijevo inicijalno sadrži nešto kisika, bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* te rodova *Streptococcus* i *Staphylococcus* su među prvim bakterijama u crijevu koje se mogu razmnožiti jer su aerotolerantne. Kako se povećava broj fakultativno anaerobnih bakterija, one troše kisik i smanjuju redukcijski potencijal na negativnu vrijednost. Takvi uvjeti pogoduju anaerobnim bakterijama iz rodova *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Clostridium* nakon čega se one počinju umnožavati i postaju zastupljenije naspram onih u prvim tjednima života (Conway P.L., 1995).

Povećanjem složenosti i raznolikosti konzumirane hrane te povećanjem izloženosti različitom okolišu, povećava se i složenost i zastupljenost mikrobiote. Smatra se da do djetetove treće godine života crijevna mikrobiota sastavom 40-60 % nalikuje mikrobioti odrasle osobe, odnosno relativno je postojanog sastava. Kako starimo, udio rodova *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii* i nekoliko pripadnika koljena *Firmicutes* opada, dok se udjeli

E.coli, pripadnici koljena *Proteobacteria* i roda *Staphylococcus* povećavaju (Hollister et al. 2014). Crijevni mikrobiom starijih osoba se razlikuje od mikrobioma mlađih osoba u smanjenoj sposobnosti biosinteze vitamina B₁₂, smanjenoj aktivnosti mikrobnih reduktaza, slabijem odgovoru na stres i slabijem imunološkom sustavu. Ova otkrića sugeriraju da crijevni mikrobiom starijih osoba potencijalno predstavlja proinflamatorni fenotip (Lan i sur., 2013).

3.3. BIORAZNOLIKOST MIKROBIOTE I METODE ODREĐIVANJA BIORAZNOLIKOSTI

Tipična crijevna mikrobiota odrasle osobe prvenstveno se sastoji od oko šest ili sedam različitih bakterijskih koljena od kojih dominiraju *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. Prisutne u manjem obilju, su bakterije iz koljena *Proteobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Actinobacteria* i *Euryarchaeota* (Voreades i sur., 2014). Iako je ovaj opći profil bakterija postojan, crijevna mikrobiota pokazuje vremenske i prostorne razlike u distribuciji mikroorganizama na razini roda i vrste. U probavnom sustavu između jednjaka i debelog crijeva prisutna je značajna razlika u raznolikosti (Slika 1.) i koncentraciji mikrobiote u rasponu od 10¹ po gramu sadržaja jednjaka i želudca do 10¹² po gramu sadržaja debelog crijeva (Jandhyala i sur., 2015).



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

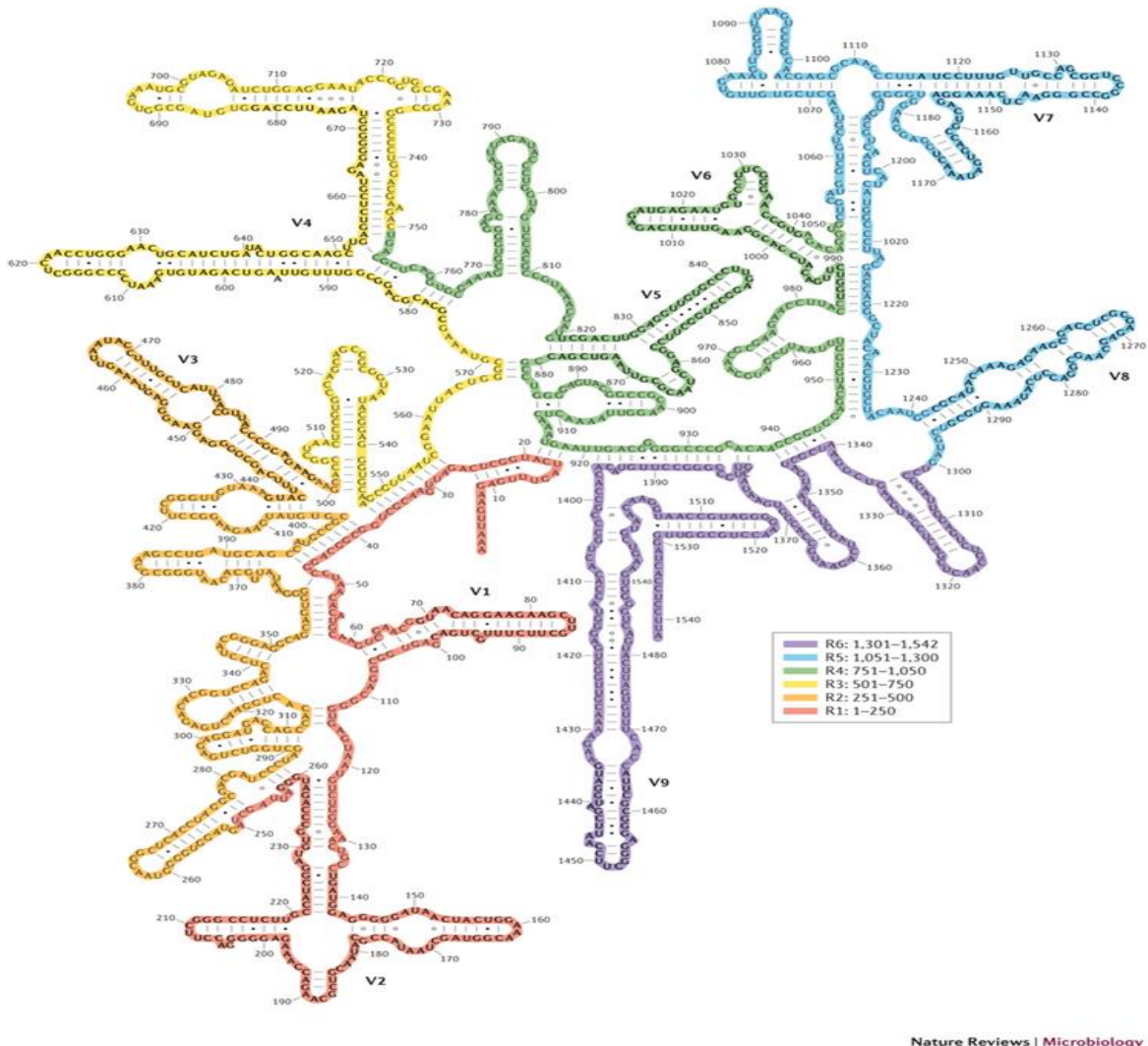
Bakterije koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* prevladavaju u debelom crijevu (čine >90% bakterijske populacije). Anaerobnih bakterija ima 100-1000 puta više od aerobnih bakterija (Dethlefsen *i sur.*, 2006). Debelo crijevo sadrži patogene kao što su *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* i *Bacteroides fragilis*, ali u niskim koncentracijama ($\leq 0,1\%$ od cijele crijevne mikrobiote). Bakterije koljena *Proteobacteria* su manje zastupljene, te zajedno uz visoko zastupljene *Bacteroides*, *Prevotella* i *Ruminococcus* bakterije ukazuju na zdravu crijevnu mikrobiotu. Mikrobna raznolikost debelog crijeva je vidljiva i u horizontalnoj raspodjeli mikrobiote između lumena i mukozne površine crijeva. *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Ruminococcus* su prevladavajući luminalni bakterijski rodovi što omogućuje njihovo prepoznavanje u fecesu. Rodovi *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Akkermansia* su prisutni u sluznici i epitelnim kriptama crijeva (Jandhyala *i sur.*, 2015).

Nedavna istraživanja pokazuju da se na temelju mikrobiote ljudi mogu kategorizirati u jedan od tri osnovna enterotipa neovisno o dobi, spolu, geografskom podrijetlu i tjelesnoj masi. Enterotipovi se međusobno razlikuju po sastavu i dominantnoj ulozi pojedinih bakterijskih vrsta – *Bacteroides*, *Prevotella* i *Ruminococcus* (Arumugan *et al.*, 2011). Iako je podjela mikrobiote u diskretne enterotipove novijim istraživanjima upitna, njihovo postojanje pojednostavilo bi i omogućilo bolje razumijevanje različitih reakcija ljudi na prehranu i lijekove zbog pretpostavke da bi različiti enterotipovi mogli utjecati na različite odgovore ljudi na navedeno (Knights *i sur.*, 2014).

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

Sekvencioniranje 16S rRNA gena smatra se „zlatnim standardom” za identifikaciju i taksonomsku klasifikaciju bakterijskih vrsta. 16S rRNA gen koristi se kao molekularni marker iz razloga što je univerzalan u bakterijama i upravo zato se može koristiti za određivanje bakterija od koljena pa sve do vrsta. Vrlo je koristan kod identifikacije bakterija koje se ne mogu kultivirati. Gen koji kodira 16S podjedinicu ribosoma je dužine 1,5 kb i sadrži konzervirane regije s 9 hipervarijabilnih područja. Hipervarijabilne regije korištene pri sekvencioniranju 16S rRNA gena pokazuju veliku različitost između bakterijskih vrsta te su zato korisne za identifikaciju bakterija. Česte regije u identifikaciji bakterija kod 16S rRNA su

V3, V4, V6, i V8, prikazane na slici 2 (Jandhyala i sur., 2015). Sekvencioniranje gena koji kodira 16S rRNA, kao i svaka metoda, ima svoja ograničenja koja se najbolje očituju kod vrlo bliskih vrsta s velikom sekvencijskom sličnošću jer je broj polimorfni mjesta u 16S rRNA izrazito malen što otežava razlikovanje vrlo srodnih vrsta. Unatoč svemu tome, i dalje ostaje najčešće korištena metoda za identifikaciju nepoznatih bakterija (Fraher i sur.,2012).



Slika 2. Sekundarna struktura 16S rRNA bakterije *Escherichia coli* (Jarza i sur., 2014)

3.4. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA SASTAV MIKROBIOTE

Iako je u prethodnom poglavlju 3.2. navedeno da je mikrobiota odrasle osobe relativno stabilna i postojana te da u njenom sastavu dominiraju bakterije koljena *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Actinobacteria*, crijevna mikrobiota ipak pokazuje interpersonalne i intrapersonalne razlike u sastavu. To se može objasniti činjenicom da na sastav mikrobiote pojedinca utječu razni unutarnji i vanjski čimbenici (Xu & Knight 2014).

Kolonizacija crijeva mikroorganizmima je već od najranijeg djetinjstva pod utjecajem čimbenika kao što su: način poroda (vaginalno/carskim rezom) i način hranjenja (dojenje majčinim mlijekom/hranjenje formulama), te se do treće godine života stabilizira nakon čega na nju utječu čimbenici poput geografskog područja odrastanja, spola, upotrebe antibiotika, mikrobnog međudjelovanja, genotipa, dobi, konzumacije probiotika i prebiotika te ponajviše prehrane (Sankar et al. 2015).

Mikrobna međudjelovanja u kombinaciji s natjecanjem mikroorganizama za izvore energije su odavno poznate važne determinante sastava crijevne mikrobiote. Najčešći mehanizmi interferencija uključuju proizvodnju toksičnih metabolita i specifičnih antimikrobnih spojeva kao što su bakteriocini¹ (Dethlefsen et al. 2006)

Jedan od važanih čimbenika koji utječu na sastav mikrobiote jest upotreba antibiotika. Učinak koji uzrokuje upotreba antibiotika uključuje smanjenu taksonomsku raznolikost i trajne promjene sastava mikrobiote kod velikog broja pojedinaca. Dokazano je da učinak kratkotrajne upotrebe (7 dana) antibiotika širokog spektra može trajati i do 2 godine, pri čemu je većinom smanjena raznolikost koljena *Bacteroidetes*. Sličan učinak je vidljiv i nakon antibiotičke terapije *H.pylori* nakon koje dolazi do dramatičnog smanjenja raznolikosti koljena *Actinobacteria*. Nakon prestanka terapije antibioticima i ponovnog uspostavljanja mikrobne zajednice primijećena je smanjena otpornost nanovo koloniziranih mikroorganizama što omogućuje stranim bakterijama da prerastu komenzalne i tako uzrokuju trajne promjene u strukturi mikrobiote i potencijalno pridonesu razvoju različitih bolesti. Osim smanjenja bioraznolikosti crijevne mikrobiote, druga velika briga oko uporabe antibiotika je pojava otpornosti patogenih bakterija na antibiotike (Clemente et al. 2012; Jandhyala et al. 2015).

Uz sve dosada navedene čimbenike prehrana se i dalje smatra najvažnijim čimbenikom koji utječe na oblikovanje sastava, raznolikosti i zastupljenosti mikrobiote. Općenito se prehrana bogata voćem, povrćem i prehrambenim vlaknima povezuje s brojnijom i raznovrsnijom mikrobiotom. Pošto ovakva prehrana podrazumijeva predominantno konzumaciju ugljikohidrata, od kojih velik udio čine netopljiva vlakna, razumljivo je da je u crijevu pojedinaca na ovakvoj prehrani detektirana veća zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes* kao što su: *Ruminococcus bromii*, *Roseburia* i *Eubacterium rectale* (Walker i sur., 2011). Wu i suradnici, 2011. godine su svojim istraživanjem pokazali da na cjelokupan sastav ljudske crijevne mikrobiote poglavito utječu čimbenici dugotrajne, odnosno ustaljene prehrane. Tako su otkrili da su bakterije roda *Prevotella* bile zastupljenije kod pojedinaca koji su

¹ Bakteriocini- mikrobicidni proteini koje proizvode bakterije i oni sprječavaju rast srodnih bakterija u blizini (Dethlefsen et al. 2006).

konzumirali prehranu bogatu ugljikohidratima i vlaknima, dok se bakterije roda *Bacteroides* povezuje s tipičnom „zapadnjačkom prehranom“ koju karakteriziraju visok udio proteina i masti u prehrani.

3.5. UTJECAJ PROBIOTIKA I PREBIOTIKA NA SASTAV MIKROBIOTE

Udio mikrobiote koji ima povoljni učinak na organizam može se povećati ili preinačiti na tri načina: probiotički, prebiotički i sinbiotički. Probiotici su kulture živih mikroorganizma koji, uneseni u prikladnim količinama, pomažu u održavanju zdravlja ljudi. Prebiotici su neprobavljivi sastojci hrane koji povoljno utječu na domaćina, selektivno stimulirajući rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom crijevu (Gibson i Roberfroid, 1995). Glavni cilj probiotika i prebiotika kao funkcionalnih sastojaka hrane je poboljšanje zdravlja potrošača selektivnom promjenom sastava i/ili aktivnosti mikrobne populacije unutar probavnog sustava, a može se postići zajedničkim unosom pro/prebiotika tzv. sinbiotika (Tobergte i Curtis, 2013). Sinbioticima se smatraju prehrambeni proizvodi ili dodaci prehrani koji sadrže probiotike i prebiotike čime se postiže sinergistički učinak u organizmu.

3.5.1. Probiotici

Probiotici imaju pozitivan utjecaj na interakcije između mikroorganizama kao i između domaćina i mikroorganizama, a također mogu i ograničiti rast patogena modulirajući interakcije kompetitivne crijevne mikrobiote i / ili proizvodnjom antimikrobnih spojeva. Probiotici imaju direktan utjecaj na sastav mikrobiote, crijevni metabolizam i imunološki odgovor (Rehman i sur., 2012). S obzirom na mali broj probiotičkih bakterija koje se primjenjuju kao dnevna doza, od 10^9 ili 10^{10} bakterija, u usporedbi sa otprilike 10^{14} bakterija koje obitavaju u debelom crijevu, donekle je iznenađujuće da je probiotički učinak uopće vidljiv. Ipak probiotičke bakterija dovode do potencijalnog smanjenja patogena. Smatra se da to postižu kaskadom reakcija koje dovode do inhibiranja adicije i invazije patogena, inaktivacije toksina te mogućnosti natjecanja za ograničene resurse s ostalim članovima mikrobiote (Oelschlaeger, 2010). Manipulacija crijevne mikrobiote primjenom probiotičkih supstrata rezultira prisutnošću velikog broja bakterija mliječne kiseline u tankom crijevu čovjeka, te se sav dostupan šećer podlaže procesu fermentacije pri čemu nastaju različite organske kiseline i/ili etanol. Inducirana promjena okolišnih uvjeta u crijevnom lumenu dovodi do znatnog smanjenja sinteze različitih

niskomolekularnih toksičnih metabolita i antigenih makromolekula za koje su zaslužni potencijalno patogeni mikroorganizmi. Sposobnost probiotika da utječu na metaboličku aktivnost crijevne mikrobiote djelomično je povezana s izravnom promjenom sastava crijevne mikrobiote (Tablica 1.), ali može se povezati i s promjenom metabolizma pojedinih komponenti mikrobiote kao odgovor na induciranu modifikaciju okolišnih uvjeta. Metabolički markeri koji su potencijalno podložni utjecaju probiotika su proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina i fekalna aktivnost enzima (Ouwehand and Vaughan, 2006).

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

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

Najčešće korišteni probiotici u hrani su bakterijske vrste iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (LAB bakterije – bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu). Ne-LAB bakterije, najčešće iz roda *Escherichia* i *Bacillus* te kvasac *Saccharomyces spp.*, također imaju probiotička svojstva.

3.5.2. Prebiotici

Probiotički pristup nastoji dati mogućnost direktnog utjecaja na sastav mikrobiote nastanjivanjem poželjnih mikroorganizma u lumen debelog crijeva dok prebiotici pružaju alternativnu strategiju. Umjesto egzogenog unosa kultura živih mikroorganizama, prebiotici

teže ka selektivnoj stimulaciji proliferacije i/ili aktivnosti poželjnih bakterijskih populacija već prisutnih u probavnom traktu. Karakteristike koje dijele svi prebiotici su da oni u velikoj mjeri ostaju neprobavljeni tijekom prolaska kroz želudac i tanko crijevo te selektivno stimuliraju samo korisne populacije bakterija u debelom crijevu. Važno je spomenuti da su prebiotici kao dijetalna vlakna supstrat procesa fermentacije te djelovanjem prisutne anaerobne mikrobiote debelog crijeva se oni fermentiraju do kratkolančanih masnih kiselina (SCFA) koje djeluju kao primarni izvor energije i ugljika za kolonocite (Simpson i Campbell, 2015). Prebiotici utječu na sastav mikrobiote stimulacijom rasta poželjnih bakterija i/ili inhibicijom rasta nepoželjnih bakterija, smanjenjem pH u lumenu debelog crijeva, fermentativnom razgradnjom do kratkolančanih masnih kiselina i promjenom u koncentraciji bakterijskih enzima (Woods i Grobach, 2001). Bakterije koje mogu razgraditi prebiotike sadrže specifične enzime koji su prikazani u (Tablici 2.).Unutar bakterijskog genoma nalaze se specifični genski klasteri koji definiraju funkciju saharolitčkih enzima bakterija i time omogućuju razgradnju prebiotičkih supstrata (Wilson i Whelan, 2017). Najznačajnije saharolitičke vrste bakterija u mikrobioti debelog crijeva pripadaju rodovima *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* i *Clostridium*. Glavni supstrati za njihov rast su neprobavljivi oligosaharidi tj. prebiotici koje razgrađuju do acetata, propionata i butirata (SCFA) (Roberfroid i sur., 2010). Postoji značajna povezanost između razine SCFA i sastava mikrobiote. Visoka koncentracija SCFA u lumenu debelog crijeva dovodi do snižavanja pH te kao rezultat toga dolazi do inhibicije rasta gram-negativnih *Enterobacteriaceae* uključujući patogene *Salmonella spp.* i *Escherichia coli* (Simpson i Campbell, 2015).

Prebiotici dokazane djelotvornosti koji se najčešće koriste kao funkcionalni sastojak hrane su neprobavljivi oligosaharidi, od toga najviše inulin. U ovom radu se koristio pšenični dekstrin u obliku komercijalnog proizvoda NUTRIOSE® FB06.

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

Prebiotik	Bakterijski enzim potreban za hidrolizu prebiotika	Rodovi bakterija specifičnih za prebiotik i fermentacijski produkt
Inulin		<i>Bifidobacteria</i> (acetat,laktat)

Oligofruktoza	β – fructofuranozidaza (fruktanaza)	<i>Lactobacilli</i> (laktat)
Frukot-oligosaharid		<i>Bacteroides</i> (acetat, propionat)
β -Galakto-oligosaharidi	β – galaktozidaza	<i>Bifidobacteria</i> (acetat, laktat)
Pšenični dekstrin(NUTRIOSE® FB06)	β – glukozidaza	<i>Bacteroides</i> (acetat, propionat)

INULIN

Inulin je prirodni polisaharid sastavljen od D-fruktoze i u maloj količini (2-3%) D-glukoze što ga čini neprobavljivim za ljudski organizam. Brojna istraživanja su dokazala da prebiotički utjecaj inulina djeluje pozitivno na sastav mikrobiote, a posljedično i na zdravlje čovjeka. Produkti nastali fermentacijom inulina dovode do smanjenja pH i izazivaju promjene u sastavu crijevne mikrobiote što ima pozitivne fiziološke učinke na debelo crijevo i doprinosi smanjenu rizika od disbioze. Inulin selektivno stimulira rast bakterija iz roda *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. Bifidu*, *B. Longum*), roda *Firmicutes* (*F. prausnitzii*) uz inhibiciju rasta potencijalnih patogena poput primjerice *E. coli* (Simpson i Campbell, 2015).

NUTRIOSE® FB06

NUTRIOSE® FB06 je neviskozni pšenični dekstrin s ukupnim sadržajem vlakana do 85%, te mono- i disaharidnim sadržajem $\leq 0.5\%$. Strukturu proizvoda čine linearne ili razgranate glukozidne veze što ju čini otpornom na hidrolizu u tankom crijevu te istodobno raspoloživu za bakterijsku fermentaciju u debelom crijevu. Bakterijska fermentacija topivih vlakna pokazala je smanjenje pH u lumenu debelog crijeva, dovela do promjene mikrobiote i inducirala proizvodnju kratkolančanih masnih kiselina. Istraživanja na pšeničnom dekstrinu pokazala su sličan fermentabilni učinak kao kod inulina. Pšenični dekstrin kao i inulin dovodi do smanjen pH, ali sa zantno manjom proizvodnjom vodika i ukupnog plina nego što je slučaj kod inulina (Lefranc-Millot i sur., 2012).

Trenutno dostupna istraživanja pokazuju da dnevna potrošnja od 8 g do 10 g NUTRIOSE® unutar 14 dana povećava koncentraciju roda *Bacteroides*. Osim toga, koncentracija *Clostridium perfringens*, potencijalno štetnih bakterija, znatno je smanjena konzumacijom 15 g/dan topivih vlakna kroz 14 dana (Lefranc-Millot i sur., 2012; Hobden i sur., 2013).

Istraživanje provedeno u *in vitro* kontinuiranom sustavu debelog crijeva pokazalo je da pšenični dekstrin značajno povećava proliferaciju gram-pozitivnih bakterija *Clostridium*

XIV Cluster i roda *Roseburi*, ključnih proizvođača butirata (Hobden i sur., 2013). Eksperimentalni rad na glodavcima sugerira da je pretilost obrnuto proporcionalna koncentraciji *Clostridium XIV Cluster* i *Roseburi* bakterija (Neyrinck i sur., 2012). Postoji mogućnost da pšenični dekstrin također može imati restorativne učinke na mikrobnu populaciju *Clostridium XIV Cluster* i *Roseburia* roda u pretilih osoba i osoba s prekomjernom tjelesnom težinom. Također se pokazalo da zbog svoje specifične strukture ne dovodi do značajnog povećanja razine *Bifidobacterium spp.* u *in vitro* sustavu debelog crijeva (Hobden i sur., 2013). Dodatna istraživanja su potrebna za određivanje prebiotičkog efekta pšeničnog dekstrina.

3.6. SASTAV MIKROBIOTE I PRETILOST

Uz već poznate čimbenike koji mogu doprinijeti razvoju pretilosti, kao što su genetika i nepravilne prehrambene navike, nova istraživanja pokazuju da crijevna mikrobiota također može utjecati na metabolizam čovjeka.

Kod osoba s normalnom tjelesnom težinom očituje se veća bioraznolikost crijevne mikrobiote nego kod pretilih osoba, osim toga postoje indikacije da je pretilost povezana s modifikacijom crijevne mikrobiote na način da povećava omjer *Firmicutes/Bacteroidetes* (Ley i sur., 2006). Mehanizmi pomoću kojih crijevna mikrobiota utječe na pretilost kod ljudi su komplicirani i uglavnom nepoznati, ali se smatra da su neki od uzroka: pretjerano oslobađanje energije u tijelu, visoke razine fermentiranih kratkolančanih masnih kiselina koji potiču adipogenezu, ekspresija gena vezanih uz pretilost i povećana proizvodnja plazmatskih lipopolisaharida (LPS) koji uzrokuju pretilost i upale (Chen i sur., 2014).

Na temelju dosadašnjih saznanja se smatra da se sastav crijevne mikrobiote čovjeka mijenja kao odgovor na prehrambene utjecaje i gubitak tjelesne težine (Turnbaugh i sur., 2009). Zastupljenost bakterija koljena *Firmicutes* je veća kod pretilih osoba, dok su bakterije koljena *Bacteroidetes* manje zastupljene. Tijekom smanjenja tjelesne težine kod pretilih osoba dolazi do povećanja zastupljenosti bakterija *Bacteroidetes* koljena, što upućuje na pretpostavku da promjena kalorijskog unosa utječe na njih (Ley i sur., 2006). Smanjenje omjera *Firmicutes / Bacteroidetes* kod pretilih pojedinaca korelira s gubitkom tjelesne težine i ukazuje da modifikacija prisutnih bakterijskih zajednica može biti korisna u tretiranju pretilosti (Remely i sur., 2015). Bakterije roda *Lactobacillus* koji su pripadnici koljena *Firmicutes*, su kao promotori rasta povezani s porastom tjelesne težine i upalnim procesima do kojih dolazi zbog pretilosti (Armougom i sur., 2009). *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus ingluviei* su pokazali pozitivan utjecaj na povećanje tjelesne težine

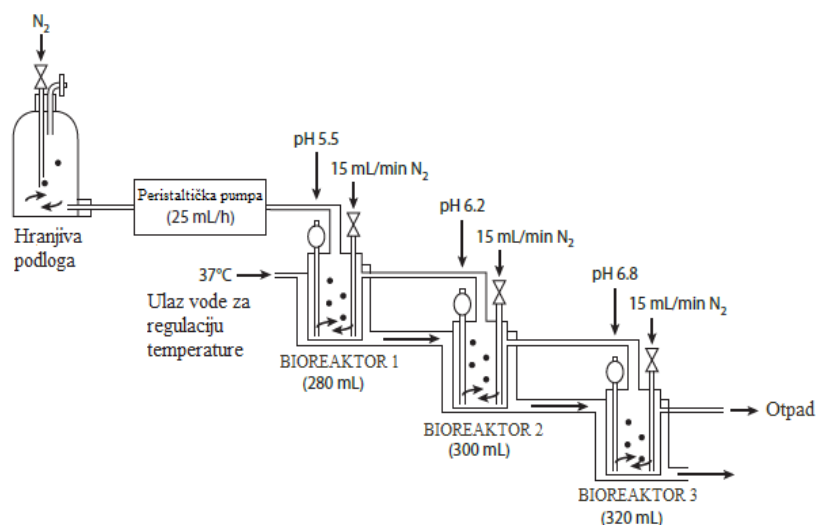
dok su *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus gasseri* bili više povezani s gubitkom tjelesne težine. Međutim postoje istraživanja u kojima nisu uočene značajne razlike u prisutnosti bakterijskih koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* između pretilih osoba i osoba sa normalnom tjelesnom težinom te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se razlika u koljenima bakterija koristila kao biomarker pretilosti (Gérard, 2016).

3.7. IN VITRO SUSTAVI ZA SIMULACIJU UVJETA DEBELOG CRIJEVA

Brojna ograničenja s kojima se susreću znanstvenici prilikom *in vivo* istraživanja probavnog sustava na ljudima i životinjama, npr. etička ograničenja kod provođenja istraživanja na ljudima te neophodnost žrtvovanja životinja za dobivanje svih potrebnih rezultata, potaknula su razvoj *in vitro*, *ex vivo* i *in silico* sustava koji pomažu u simulaciji probavnog sustava. Iako ovakvi sustavi još uvijek ne mogu zamijeniti *in vivo* istraživanja odličan su alat za provjeru koncepta istraživanja prije same *in vivo* validacije (Petrof i sur., 2013). Nadalje, *in vitro* modeli imaju svoja ograničenja kao što su nedostatak epitelne sluznice, nemogućnost preciznog *in vivo* simuliranja učinaka neuroendokrinog i imunološkog sustava, procesa apsorpcije crijeva, kao i izostanak izlučivanja sokova probavnog sustava. Što se tiče prednosti, bitno je spomenuti jednostavnost uzorkovanja, mogućnost ispitivanja toksičnih supstanci, te kontrolu parametara procesa kao što su pH vrijednost, temperatura i brzina prihrane (Macfarlane i sur., 1998; Macfarlane i Macfarlane, 2007).

Od različitih *in vitro* modela za simulaciju uvjeta u debelom crijevu prema literaturnim podacima najzastupljeniji su SHIME i TIM-2 modeli, a navode se još EnteroMix, PolyFermS, P-ECSIM, SIMGI, Twin-SHIME i M-SHIME sustavi. S obzirom na postupak kultivacije mikrobiote u *in vitro* modelima postupci se dijele na šaržne, kontinuirane, višestupnjevite kontinuirane i kontinuirane postupke s imobiliziranom mikrobiotom. Kod najjednostavnijih *in vitro* modela utjecaj različitih komponenti ili različitih mikroorganizama ispituje se u jednoj posudi, odnosno dovoljan je jedan bioreaktor koji osigurava anaerobne uvjete, postojanu temperaturu procesa i postojan pH čija vrijednost varira ovisno o dijelu probavnog sustava koji se želi simulirati. Nadalje, peristaltika crijeva oponaša se različitim tipovima miješala, peristaltičkim pumpama ili drugim inovativnim načinima miješanja. Što se tiče trajanja eksperimenata kod procesa šaržnog tipa najčešće se provode procesi u trajanju od 72 sata, dok trajanje kontinuiranih procesa može biti i do 30 dana.

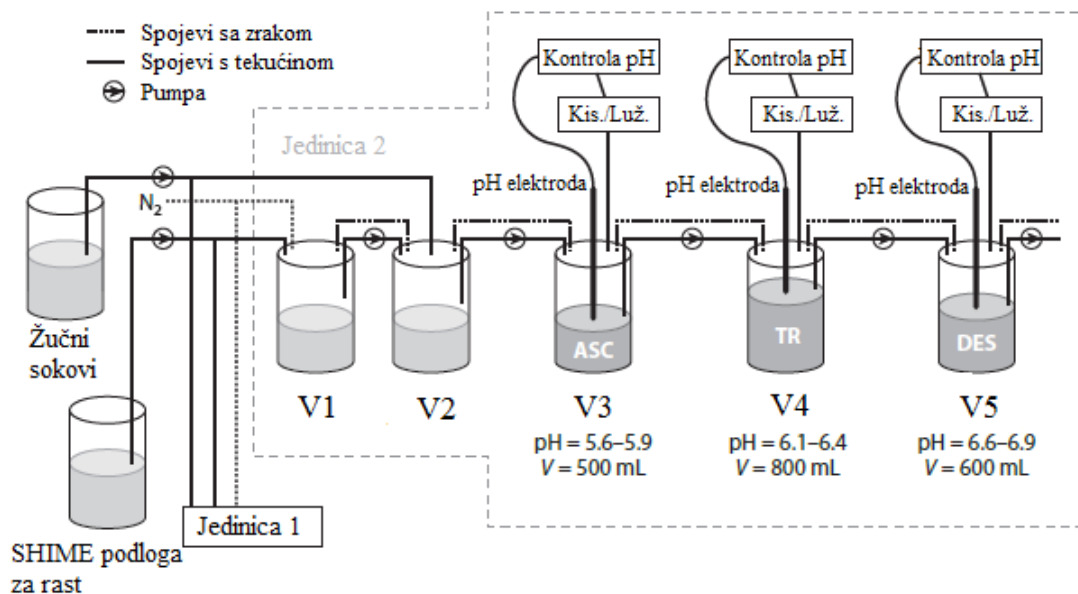
Jedan od prvih *in vitro* sustava koji je uspješno simulirao uvjete debelog crijeva je kontinuirani trostupanjski simulator (Slika 3) čiji je zadatak bio ispitivanje utjecaja glavnih nutritivnih i okolišnih uvjeta na proces fermentacije. Predstavili su ga 1988. godine Gibson i suradnici, a 1998. godine Macfarlane zajedno sa suradnicima ga je poboljšao i takva inačica sustava se koristi i danas. Radi se o kontinuiranom sustavu kojeg čine 3 radne posude različitih radnih volumena (220 ml, 320 ml i 320 ml) pri čemu svaka posuda bioreaktora simulira jedan dio debelog crijeva (uzlazni, transverzalni te silazni dio). Ovisno o dijelu debelog crijeva koji se simulira, pH vrijednosti tijekom procesa održavaju se na 5.8, 6.2, te 6.8. Specifičnost navedenog simulatora je da se nakon završenog početnog šaržnog procesa, proces vodi kontinuirano u trajanju od 16 dana da bi se uspostavilo ustaljeno stanje. Potom 22 dana traje ispitivanje testirane komponente dodane u sustav, a posljednja faza je faza ispiranja u kojoj se ispituje trajanje uočenog djelovanja testirane komponente nakon što se ista više ne nalazi u hranjivom mediju. Ova faza može trajati i do 50 dana, a vrijeme zadržavanja u takvom sustavu varira od 27 do 67 sati (Gibson i sur., 1988; Macfarlane i sur., 1998).



Slika 3. Gibson/Macfarlane simulator (Prilagođeno od Williams i sur., 2015)

SHIME simulator (Slika 4) osmislili su i opisali Molly i sur 1993. god. Model simulira probavni sustav od želudca do debelog crijeva. Sustav čini 5 bioreaktora različitih radnih volumena (300 - 1600 ml) gdje prva dva simuliraju želudac i tanko crijevo, a zadnja tri debelo crijevo (uzlazni, transverzalni i silazni dio). Postupak uzgoja je kontinuirani pri čemu uspostavljanje ustaljenog stanja za proces koji simulira želudac i tanko crijevo traje 8 dana, a za proces koji simulira debelo crijevo 10 dana. Nadalje, nakon uspostavljanja ustaljenog stanja slijedi korak u kojem se ispituje utjecaj supstrata ili druge komponente u trajanju od 12 dana, i

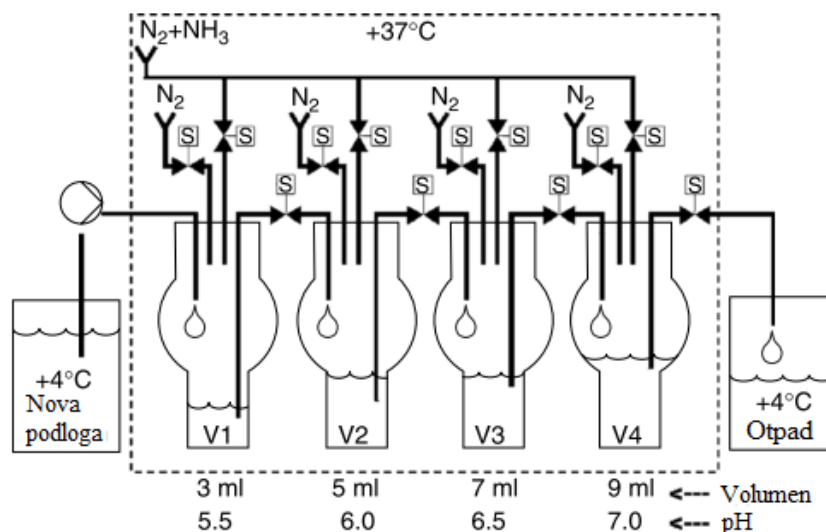
na kraju dolazi faza ispiranja (sa SHIME podlogom) u trajanju od 10 dana. Vrijeme zadržavanja u ovom sustavu je 84 sata, a što se tiče zadnja tri bioreaktora koji opisuju debelo crijevo zadržavanje traje 72 sata. (Molly i sur., 2013; Alander i sur., 1999). Postoji i proširena verzija s dva paralelna SHIME sustava koja omogućuju istovremenu usporedbu dvaju različitih tretmana i naziva se Twin-SHIME (Van Den Abbeele i sur., 2010).



Slika 4. SHIME model koji su osmislili Molly i sur., 1993. Godine.

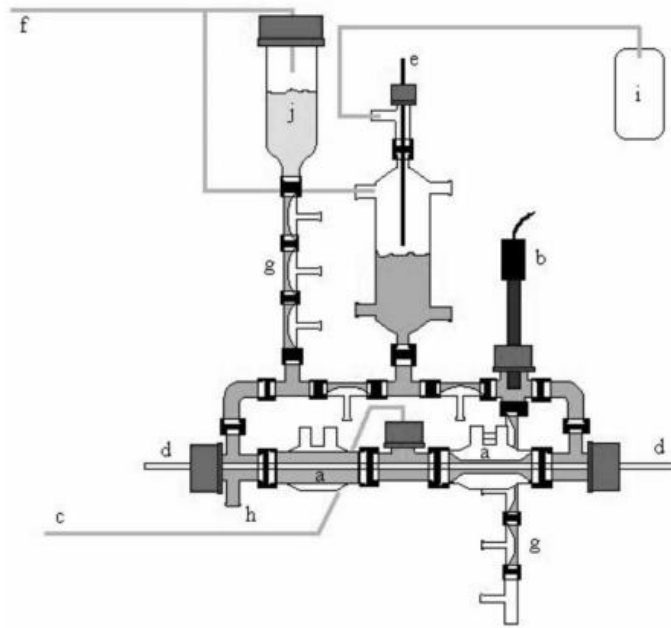
V1- Želudac, V2- Tanko crijevo, V3- Uzlazni dio debelog crijeva, V4- Transverzalni dio debelog crijeva, V5- Silazni dio debelog crijeva (Prilagođeno od (Williams et al. 2015).

EnterMix simulator (Slika 5) osmislili su i opisali 2005. god. Mäkivuokko i suradnici. Sustav kao i Gibson/Macfarlane model simulira rad debelog crijeva uz dodatni četvrti odjeljak koji se odnosi na sigmoidalno debelo crijevo/rektum. Specifičnost ovog modela u usporedbi s prethodno opisanim modelima je ta što koristi izrazito male radne volumene (6, 8, 10 i 12 ml) i primjenjuje polukontinuirani postupak uzgoja. Nadalje, prednost simulatora je mogućnost istovremenog vođenja 4 paralelna procesa pri čemu se koristiti isti uzorak inokuluma, uz dokazanu dobru korelaciju s *in vivo* istraživanjima (Mäkivuokko i sur., 2005). Vrijeme zadržavanja u takvom sustavu je 15 sati, a ukupno vrijeme procesa je 48 sati.



Slika 5. EnteroMix sustav (Prilagođeno od Ouwehand i Vaughan, 2006)

TIM-2 simulator debelog crijeva (Slika 6) je dio TNO intestinalnih modela, a predstavili su ga Minekus i suradnici 1999. godine. Sustav za simulaciju uvjeta u uzlaznom, transverzalnom i silaznom dijelu debelog crijeva sastoji se od nekoliko modula s fleksibilnom unutarnjom silikonskom membranom koja omogućuje peristaltičko gibanje promatranog medija u definiranim intervalima i u suprotnim smjerovima. Specifičnost ovog sustava je membrana sa šupljim vlaknima koja služi kao sustav za dijalizu kojom se voda s proizvedenim metabolitima kontinuirano uklanja iz sustava dok se istovremeno u sustav dodaje otopina soli, takozvani dijalizat. Dakle, ono što TIM-2 sustav razlikuje od ostalih *in vitro* modela jest njegovo jedinstveno peristaltičko miješanje, visoka koncentracija mikroorganizama i integrirana membrana sa šupljim vlaknima što omogućuje dobru reproducibilnost eksperimentalnih podataka (Venema i sur., 2000).



Slika 6: Shematski prikaz TIM-2 sustava. a) odjeljci čija je namjena peristaltičko gibanje medija, b) pH elektroda, c) pumpa za dodavanje lužine ili kiseline, d) membrana sa šupljim vlaknima, e) senzor razine, f) dobava dušika, g) ventili za ulaz/izlaz, h) otvor za uzorkovanje, i) otpadni plinovi, j) posuda za prihranu (van Nuenen i sur., 2003).

4. MATERIJALI I METODE

Etičko pitanje

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

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Hranjiva podloga za anaerobni uzgoj u bioreaktoru

U eksperimentalnom dijelu radu korištena je SIEM (Simulated Ileal efflux medium) kompleksna hranjiva podloga.

➤ **SIEM podloga**

SIEM hranjiva podloga simulira neprobavljene komponente hrane koje iz zadnjeg dijela tankog crijeva, ileusa, ulaze u debelo crijevo. Hranjive karakteristike ove podloge tipične su za tzv. zapadnjačku prehranu. Sastav podloge naveden je u tablici 3.

Tablica 3. Sastav SIEM podloge.

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

➤ Otopina soli

Sastav otopine soli prikazan je u tablici 4. Pripremljena otopina sterilizira se odvojeno od ostale podloge u koju se dodaje nakon sterilizacije u autoklavu.

Tablica 4. Sastav otopine soli.

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

➤ Otopina vitamina

Sastav otopine vitamina prikazan je u tablici 5. Pripremljena otopina čuva se u hladnjaku (4°C) i dodaje se u SIEM podlogu neposredno prije korištenja.

Tablica 5. Sastav otopine vitamina

SASTOJAK	KOLIČINA (za 10 mL)
Menadion	0,010
D-biotin	0,020
Vitamin B ₁₂	0,005
Pantotenat	0,100
Nikotinamid	0,050
p-aminobenzen	0,050
Tiamin	0,040
Destilirana voda	Do 10 mL

4.1.2. Bakterijska probiotička kultura

U ovom radu korišten je soj *Lactobacillus plantarum D13* dobiven iz zbirke Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu u koncentraciji od 1×10^8 CFU/mL. Za uzgoj bakterijske kulture korištena je tekuća MRS (Man-Rogosa-Sharpe) hranjiva podloga.

4.1.3. Prebiotik

U radu je korišten komercijalni proizvod NUTRIOSE® FB06 (Roquette, SAD), topiva vlakna pšenice, tzv. pšenični dekstrin u koncentraciji 21 g/L.

4.1.5. Mikrobna kultura za inokulaciju

U ovom radu kao izvor mikrobne kulture za inokulaciju hranjive podloge korišten je uzorak stolice zdrave pretile ženske osobe. Provedenom anketom i antropološkim mjerenjem ustanovljeno je da osoba ima indeks tjelesne težine (*eng.* Body Mass Index, BMI) 31 kg/m² što ju svrstava u skupinu pretilih osoba. Osoba nije konzumira lijekove ili supstance koje bi mogle interferirati sa sastavom crijevne mikrobiote.

4.1.4. Laboratorijska oprema za pripremu, praćenje procesa i obradu uzoraka

4.1.4.1. Pribor

- Automatske pipete
- Erlenmeyerove tikvice
- Silikonske cijevi različitih promjera
- Kleme
- Falcon kivete
- Spojnice
- Staklene boce

4.1.4.2. Bioreaktor s miješalo (Fermentor)

U ovom istraživanju korišten je bioreaktor Jupiter 2.0 (Solaris Biotechnology, Mantova, Italija) korisnog volumena od 2 L. Bioreaktor je opremljen sustavom za regulaciju temperature, sustavom za korekciju pH vrijednosti, ORP elektrodom (mjeri oksidacijsko reduksijski potencijal), masenim mjerачem protoka dušika, senzorom razine, sustavom za aseptično uzimanje uzoraka, tehničkom vagom i kontrolnom jedinicom s integriranim peristaltičkim pumpama. Otvori za inokulaciju, uzimanje uzorka, prtok hranjive podloge, te za dodavanje kiseline i lužine nalaze se na gornjoj podnici bioreaktora. Dva turbinska i jedno propellersko

miješalo pokreće elektromotor snage 266 W. Za vođenje i upravljanje procesom koristi se programska podrška „Leonardo“.

4.1.4.3. Uređaj za automatiziranu izolaciju i pročišćavanje DNA

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

4.1.4.4. Ostali laboratorijski uređaji

- Autoklav „Sutjeska“, Jugoslavija
- Analitička vaga model Eclipse EBL 314i, Adam, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Centrifuga Universal 320 R, Hettich, Njemačka
- Hladnjak, Beko, Turska
- Zamrzivač Forma 900 (-86 °C), Thermo scientific, Njemačka
- Magnetska mješalica, Heildoph, Njemačka
- Tehnička vaga, KERN fkb, Njemačka

4.1.4.5. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

- Arabinogalaktan, *Sigma*, Sjedinjene Američke Države
- Baktopepton, *Sigma-Aldrich*, Španjolska
- Cijanokobalamin, *Fluka*, Sjedinjene Američke Države
- D-biotin, *Fischer-BioReagens*, Kina
- Kalcijev klorid, bezvodni, *Gram mol*, Hrvatska
- Kalijev hidrogenfosfat (99%), bezvodni, *Acros*, Španjolska
- Kazein, *Sigma*, Sjedinjene Američke Države
- Kukuruzni škrob, *Sigma-Aldrich*, Sjedinjene Američke Države
- Ksilan, *Carl Roth GmbH*, Njemačka
- L-cistein, *Sigma*, Sjedinjene Američke Države
- Magnezijev sulfat heptahidrat (99,5%), *Acros*, Španjolska
- Menadion, *Sigma*, Njemačka
- Natrijev klorid, *Carlo Erba Reagens*, Italija
- Nikotinamid, *Acros*, Sjedinjene Američke Države
- p-aminobenzen, *Sigma*, Kina

- Pantotemat (99%), *Sigma*, Kina
- Pektin (izoliran iz jabuke), *Sigma*, Švicarska
- Tiamin hidroklorid, *Fischer-BioReagens*, Njemačka
- Tween 80, *Sigma*, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Željezov (II) sulfat (99,5%), *Acros*, Španjolska
- Žučne soli, *Fluka*, Novi Zeland

4.1.4.6. Plin pod tlakom

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

4.1.4.7. Ostale kemikalije

- Etanol (70%), *Gram mol*, Hrvatska
- Glicerol, *Gram mol*, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, *Carlo Erba Reagens*, Italija
- Meliseptol, *Braun*, Njemačka
- Mukasol, *Schulke*, Njemačka
- Natrijev hidroksid, *Carlo Erba Reagens*, Italija
- Octena kiselina, *Baker*, Njemačka
- PlivaSept Tinktura, *Pliva*, Hrvatska
- Pufer pH 4, *Reagecon*, Irska
- Pufer pH 7, *Reagecon*, Irska
- Pufer pH 10, *Reagecon*, Irska
- Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit, *Promega*, Sjedinjene Američke Države
- Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit, *Promega*, Sjedinjene Američke Države

4.1.5. Računalni programi za analizu podataka

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

4.2. METODE

4.2.1. Priprema hranjivih podloga

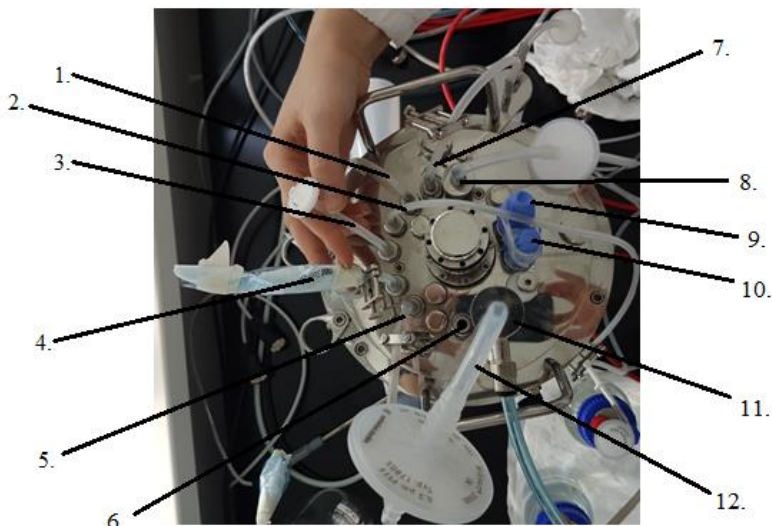
Kompleksna hranjiva podloga za eksperimentalni dio ovog rada pripremljena je prema literaturnim podacima (Maathuis i sur. 2009). Za simulaciju uvjeta u debelom crijevu pripremljena je SIEM hranjiva podloga volumena 300 ml (sastav naveden u tablici 3), uz dodatak otopine soli (tablica 4) i otopine vitamina (tablica 5). Hranjive podloge pripremljene su otapanjem izvaganih sastojaka u demineraliziranoj vodi u tri različite Erlenmeyerove tikvice. Podloge su identičnog sastava izuzev treće koja još sadrži prebiotik NUTRIOSE[®] FB06. Podloge su pripremljene sa dvostruko manje vode s obzirom da se radi o polukontinuiranom načinu rada.

4.2.2. Sterilizacija podloge, pribora i aparature

Laboratorijski bioreaktor zajedno s pomoćnim dijelovima sterilizira se u autoklavu pri temperaturi od 121°C kroz 15 minuta. Prije same sterilizacije potrebno je s bioreaktorom spojiti boce s otopinama kiseline i lužine za regulaciju pH vrijednosti, praznu Erlenmeyerovu tikvicu za homogenizaciju uzorka stolice i pripremu inokuluma, te Erlenmeyerovu tikvicu s pripremljenom hranjivom podlogom. Nadalje, potrebno je još baždariti pH i ORP elektrodu i zatvoriti sve otvore koji se ne koriste bilo sa silikonskom cijevi i klemom ili filterom za zrak. Nakon sterilizacije, bitno je da se otopine soli koje su sterilizirane zasebno prebace u tikvice s podlogom, po mogućnosti dok su još vruće kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije.

4.2.3. Faza prilagodbe mikrobiote u laboratorijskom bioreaktoru

Eksperiment je započeo homogeniziranjem svježeg uzorka fecesa mase 30 g u otopini soli volumena 300 mL (sastav je prikazan u tablici 4) u Erlenmeyerovoj tikvici i prebacivanjem u bioreaktor pomoću peristaltičke pumpe. Prilagodba mikrobiote u trajanju od 4 sata provedena je u bioreaktoru u uvjetima koji simuliraju silazni dio debelog crijeva (37 °C i pH 6.8). Prilagodba je vođena u anaerobnim uvjetima uz malu rotaciju miješala brzinom 30 o/min.

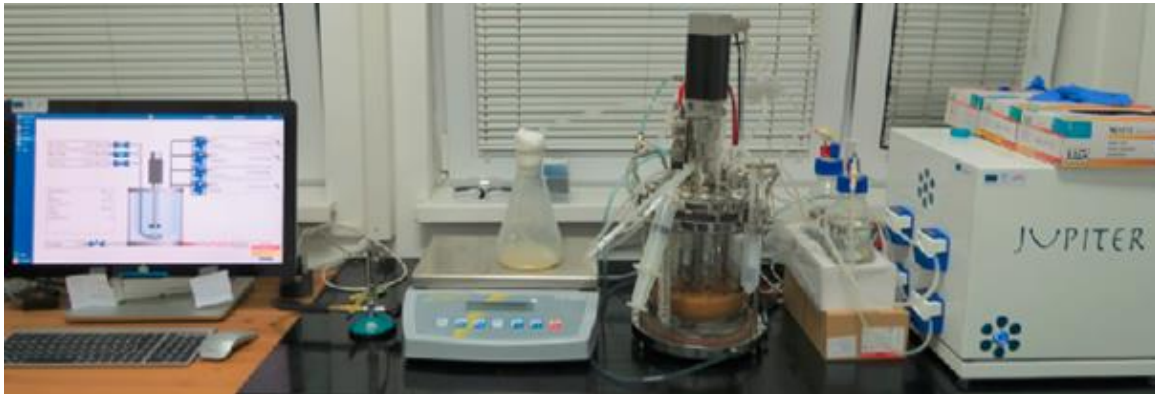


Slika 7. Položaji priključaka na poklopcu bioreaktora (prije sterilizacije):

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

4.2.4. Vođenje anaerobnog mikrobnog procesa u bioreaktoru

Fazu prilagodbe slijedi faza uspostave stabilne ravnotežne mikrobiote. Radi se o šaržnom postupkom koji počinje miješanjem bazne hranjive podloge volumena 300 ml (poglavlje 4.2.1.) sa suspenzijom mikrobiote u otopini soli (poglavlje 4.2.3.) istog volumena koji traje 24 sata. Druga faza je faza praćenja utjecaja probiotika na uspostavljeni ravnotežni mikrobiom u *in vitro* sustavu. Polukontinuirani postupak započinje prvom izmjenom podloge i ubacivanjem probiotičke kulture *Lactobacillus plantarum D13* (1 mL, $1 \cdot 10^8$ CFU/ml). Bitno je napomenuti da je prilikom izmjene podloge 300 ml takozvane fermentirane podloge (mješovite mikrobne kulture) ostavljeno u posudi bioreaktora, a dodano je 300 ml nove, bazne hranjive podloge. Na sličan način provedena je i treća, zadnja faza čiji cilj je bio utvrditi utjecaj prebiotika, komercijalno dostupnog rezistentnog topivog vlakna NUTRIOSE® FB06, na sastav kompleksne mikrobne kulture. Ono što razlikuje treću fazu je to što se novom izmjenom podloge dodaje bazna hranjiva pologa s prebiotikom čija koncentracija iznosi 21 g/L.



Slika 8. Laboratorijski sustav za vođenje procesa fermentacije u bioreaktoru

Homogenost medija tijekom procesa održavana je definiranim profilom miješanja (10 minuta pri 30 o/min uz stupnjevitu promjenu na 150 o/min kroz 2 minute). Tijekom fermentacije pH vrijednost je održavana na 6.8 dodavanjem otopine NaOH ili HCl, dok je anaerobnost osigurana kontinuiranim protokom dušika (0,2 NI/min). Za vrijeme ukupnog trajanja procesa od 76 sati praćeni su svi bitni parametri procesa (brzine okretaja miješala, temperatura, pH vrijednost, protok dušika, oksido-redukcijski potencijal). Za praćenje biodinamike mikrobiote uzimani su uzorci medija pomoću sustava za sterilno izuzimanje u vremenski definiranim intervalima od 12 sati koji su odmah po izuzimanju pospremljeni u ledenicu na -80°C.

4.2.5. Automatizirana izolacija DNA

Izolacija DNA iz početnih uzoraka fecesa i sakupljenih uzoraka iz bioreaktora provedena je na Maxwell uređaju prema uputama proizvođača. Za izolaciju DNA iz uzoraka izuzetih tijekom uzgoja u bioreaktoru korišten je Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit, dok je za uzorke fecesa korišten Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit. U jažicu za dodavanje uzoraka kazete Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kita-a dodano je 0,5 g fecesa dok je u slučaju Cell DNA Purification Kit-a dodano 400 µL suspenzije stanica. Postupak izolacije DNA se odvijao prema uputama proizvođača za pojedini kit. Na kraju procesa izolirana i pročišćena DNA biva u elucijskom puferu. U jednom radnom ciklusu moguće je istovremeno obraditi 16 uzoraka.

4.2.6. Mjerenje koncentracije DNA

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

4.2.7. Sekvencioniranje 16S rRNA marker gena

Sekvencioniranje DNA izvršeno je kao vanjska usluga u Molecular Research Lab, Teksas, SAD. Korištena je metoda sekvencioniranja sparenih krajeva (pair-end sequencing) na Illumina MiSeq uređaju. Korištene su početnice 341F-806R za umnažanje V3 i V4 regija gena koji kodira za 16S rRNA korištenjem polimerazne lančane reakcije (PCR) u 30 ciklusa. Nakon umnažanja fragmenta gena PCR produkti su provjereni na 2%-om agaroznom gelu te su pročišćeni korištenjem kalibriranih Ampure XP kuglica. Pročišćeni PCR produkti su korišteni za izradu DNA knjižnica upotrebom Illumina TruSeq DNA library protokola te zatim sekvencionirani Illumina MiSeq platformom.

4.2.8. Obrada podataka sekvencioniranja i analiza bakterijske bioraznolikosti

Sirovi podaci sekvencioniranja fragmenta gena 16S rRNA dolaze u dva dokumenta u FASTQ formatu koji sadržavaju podatke o očitanoj slijedi nukleotida i o kvaliteti očitavanja svakog pojedinog nukleotida. Svaki dokument odgovara jednom smjeru čitanja DNA i da bi dobili ukupni umnoženi fragment potrebno je dva očitavanja (eng. read) spojiti. Za spajanje korišten je program PandaSeq sa standardnim postavkama i s očekivanom dužinom spojenih sljedova od 400 do 500 nukleotida. Spojeni sljedovi su služili kao ulazni podaci za programski paket QIIME. Svaki je sljed dodijeljen odgovarajućem uzorku na osnovu očitanoj barkoda koji se nalazi na početku svakog sljedova. Sljedovi kojima prvih 8 nukleotida nije u potpunosti odgovaralo jednom od korištenih barkodova su odbačeni iz daljnjih analiza. Sljedovi svakog uzorka su klasterirani u operacijske taksonomske jedinice (OTU) sa minimalnom pokrivenošću od 97% i minimalnom identičnošću od 97% korištenjem UCLUST algoritma implementiranog u QIIME programskom paketu (Caporaso i sur; 2010). Reprezentativni sljed svakog klastera je poravnat sa SILVA taksonomskom bazom korištenjem pynast algoritma. Filogenetsko stablo je izrađeno korištenjem Neighbor-joining metode s Kimura dvo-parametarskim modelom implementiranim u Clearcut programu. Za određivanje različitosti između svakog para uzoraka

(bakterijskih zajednica) korištena je UniFrac metrika koja se zasniva na dijelu duljine grane stabla 16S rRNA gena dijeljenog između dva uzorka. Mala UniFrac udaljenost karakterizira uzorke koji imaju sličan sastav bakterijskih zajednica i koje su evoluciono bliske. U potrebi su dva tipa UniFrac metrika - težinska i netežinska. Težinska UniFrac metrika pri izračunu udaljenosti zajednica uzima u obzir prisutnost i zastupljenost pojedine taksonomske jedinice, dok netežinska uzima u obzir samo prisutnost.

5. REZULTATI

Rezultat obrade sirovih podataka sekvencioniranja u programu QIIME je biom tablica, koja sadrži sve informacije o sekvencama i taksonomskoj identifikaciji uzoraka i html dokument koji sadrži poveznice za vizualizaciju alfa i beta raznolikosti te sastav taksonomskih skupina po uzorcima prikazan stupčastim dijagramom.

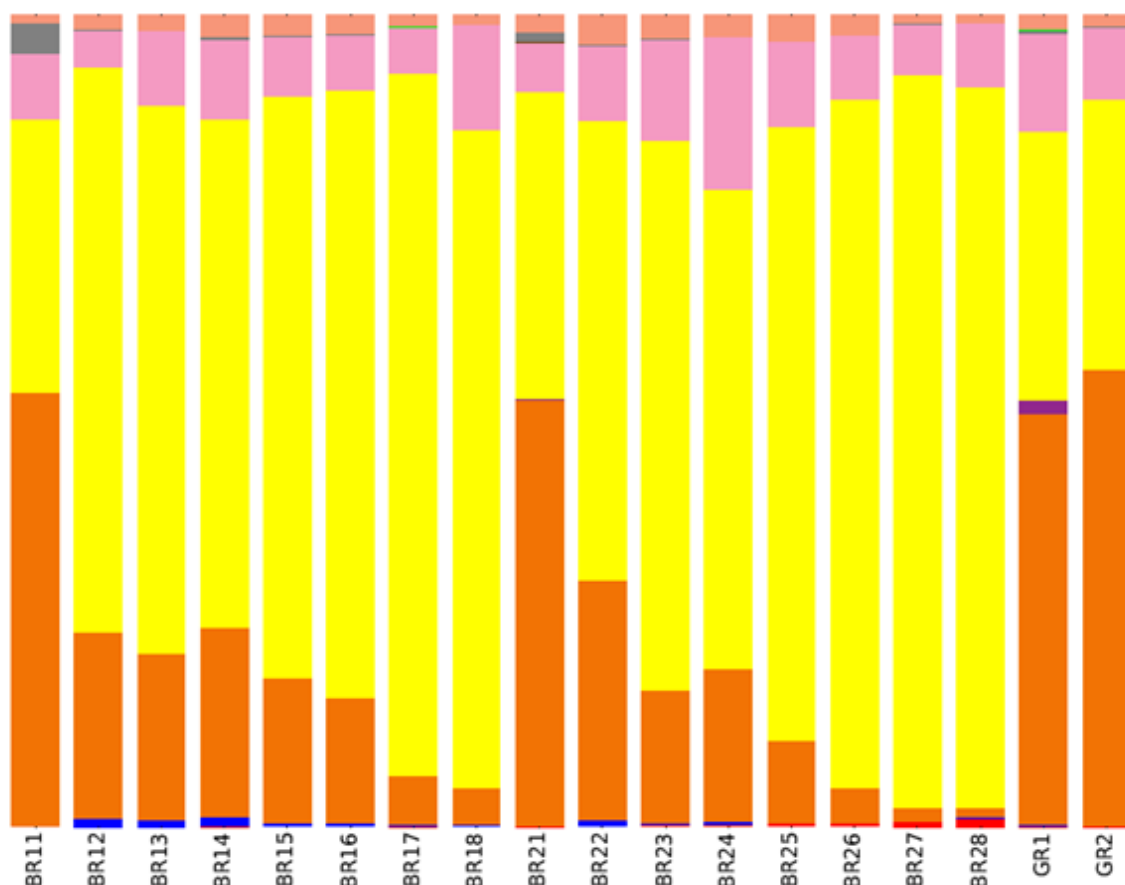
Na grafičkim prikazima se nalaze rezultati dvaju uzastopnih uzgoja provedenih u bioreaktoru. Šiframa BR11 - BR18 su označeni uzorci iz prvog uzgoja, šifre BR21 - BR28 odnose na uzorke iz drugog uzgoja, a šifre GR1 i GR2 označavaju uzorke izvornog fecesa za svaki pojedini uzgoj. Tablica 6 prikazuje opis šifriranih uzoraka.

Tablica 6. Prikaz koncentracije izolirane DNA i objašnjenje šifriranih uzoraka,

Prvi uzgoj	Koncentracija (ng/ μ L); 2 μ L	Drugi uzgoj	Koncentracija (ng/ μ L); 2 μ L	Vrijeme uzorkovanja(h)	
GR1	/	GR2	/	Feces	
BR11	22,79	BR21	53,29	0	Hranjiva podloga (HP)
BR12	65,45	BR22	100,09	12	
BR13	20,55	BR23	44,93	24	Hranjiva podloga s dodanim probiotikom
BR14	16,5	BR24	10,54	24	
BR15	15,22	BR25	36,75	36	
BR16	11,83	BR26	55,05	48	Hranjiva podloga s dodatkom prebiotika
BR17	16,57	BR27	28,39	60	
BR18	9,15	BR28	32,58	72	

5.1. REZULTATI TAKSONOMSKE RAZNOLIKOSTI

Stupčasti dijagrami prikazuju taksonomski sadržaj mikrobiote kultivirane u bioreaktoru i promjene u taksonomskom sastavu nakon dodatka probiotika i prebiotika u sustav. Promjene u sastavu mikrobiote prikazane su na razini koljena koje je označeno šifrom D_1, razreda označenog šifrom D_2, reda označenog šifrom D_3, porodicu označenu sa šifrom D_4 te roda označenog šifrom D_5.



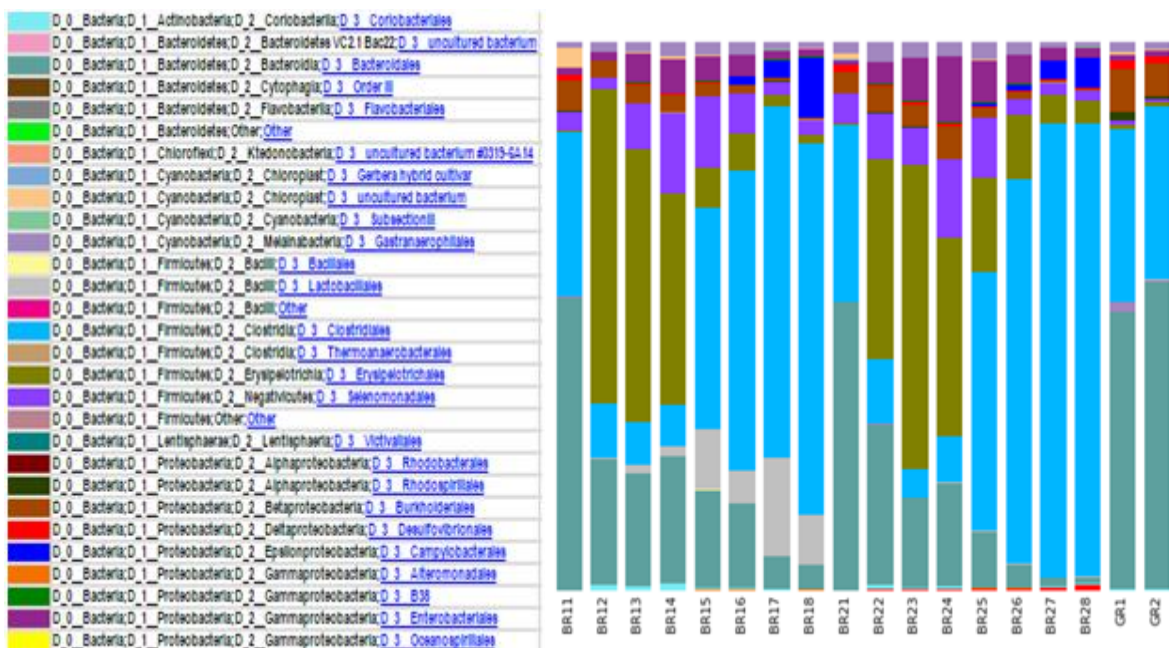
Slika 9. Stupčasti dijagram zastupljenosti bakterijskih koljena u sastavu ispitivane crijevne mikrobiote

Legend		Taxonomy	Total	BR11	BR12	BR13	BR14	BR15	BR16	BR17	BR18	BR21	BR22	BR23	BR24	BR25	BR26	BR27	BR28	GR1	GR2
	D_0_Archaea;D_1_Euryarchaeota	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.2%	0.2%	0.3%	0.3%	0.3%	0.6%	1.0%	0.0%	0.0%	
	D_0_Bacteria;D_1_Actinobacteria	0.4%	0.1%	1.1%	0.8%	1.3%	0.4%	0.4%	0.3%	0.2%	0.1%	0.8%	0.3%	0.4%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.1%	
	D_0_Bacteria;D_1_Bacteroidetes	22.5%	53.4%	22.9%	20.6%	23.2%	17.9%	15.5%	6.0%	4.5%	52.6%	29.4%	16.4%	18.8%	10.2%	4.2%	1.6%	1.1%	50.6%	56.2%	
	D_0_Bacteria;D_1_Chloroflexi	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
	D_0_Bacteria;D_1_Cyanobacteria	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.8%	0.1%	
	D_0_Bacteria;D_1_Firmicutes	65.2%	33.6%	69.5%	67.4%	62.6%	71.7%	74.8%	86.5%	81.0%	37.9%	56.6%	67.6%	59.0%	75.5%	84.8%	90.3%	88.7%	33.0%	33.3%	
	D_0_Bacteria;D_1_Lentisphaerae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
	D_0_Bacteria;D_1_Proteobacteria	9.2%	8.2%	4.6%	9.2%	9.8%	7.3%	6.9%	5.7%	13.0%	6.1%	9.3%	12.6%	18.7%	10.5%	8.0%	6.4%	8.0%	12.1%	8.7%	
	D_0_Bacteria;D_1_Saccharibacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
	D_0_Bacteria;D_1_Tenericutes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
	D_0_Bacteria;D_1_Verrucomicrobia	0.4%	3.7%	0.1%	0.1%	0.4%	0.2%	0.1%	0.1%	0.1%	1.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.5%	0.2%	
	D_0_Bacteria;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	
	Unassigned:Other	2.0%	0.9%	1.8%	1.9%	2.7%	2.4%	2.3%	1.4%	1.1%	2.1%	3.5%	2.8%	2.6%	3.2%	2.4%	1.0%	0.9%	1.8%	1.4%	

Slika 10. Tablični prikaz zastupljenosti bakterijskih koljena u sastavu ispitivane crijevne mikrobiote.

Stupčasti dijagram na slici 9 prikazuje da su dva najzastupljenija bakterijska koljena u ispitivanoj mikrobioti *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. U sastavu mikrobiote iz uzorka fecesa udio koljena *Firmicutes* je bio 33,0 – 33,6 %, a koljena *Bacteroidetes* značajno veća, 50,6 – 56,2 %. Zastupljenost navedenih bakterijskih koljena ostala je održana nakon adaptacijskog perioda

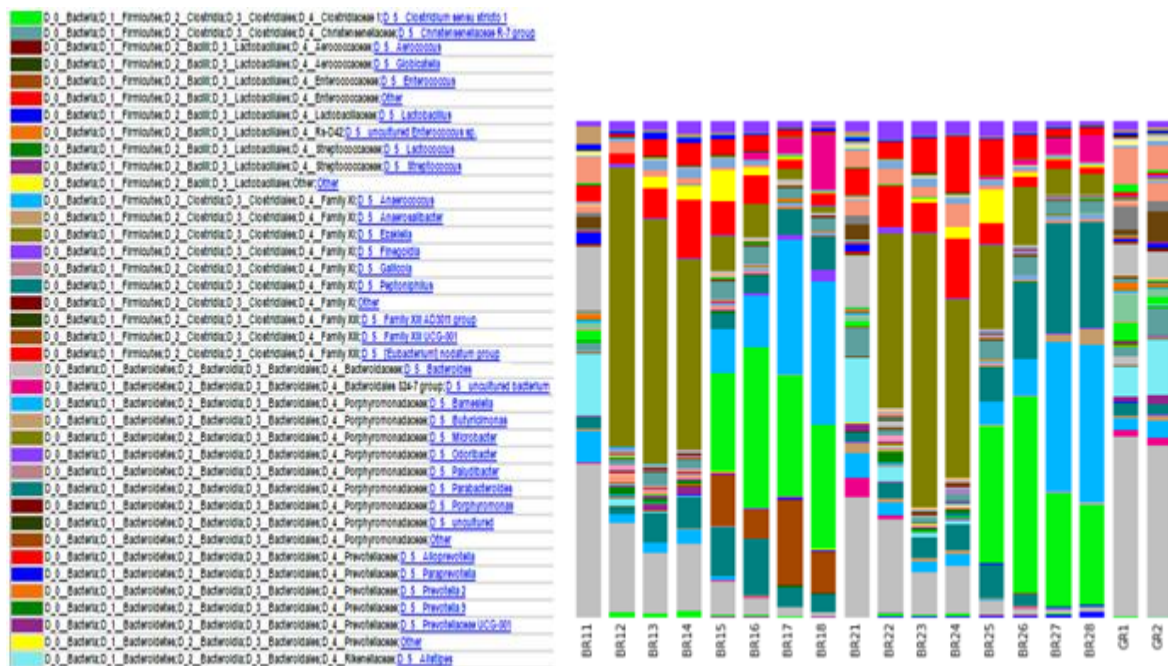
(vrijeme prilagodbe!) u trajanju od 4 sata. Tijekom procesa došlo je do značajnih promjena u zastupljenosti pojedinih bakterijskih koljena uslijed dodavanja hranjivih podloga koje su sadržavale probiotik i prebiotik. Na kraju procesa došlo je do značajnog porasta zastupljenosti bakterija koljena *Firmicutes* na udio 81,0 – 88,7 % dok se zastupljenost koljena *Bacteroidetes* smanjila na 1,1 – 4,5 %. Slika 10, osim promjene u zastupljenosti koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, prikazuje i udjele drugih bakterijskih koljena kao što su *Proteobacteria* i *Actinobacteria* čija zastupljenost se nije značajno mijenjala tokom cijelog procesa, dok su koljena *Verrucomicrobia* i *Cyanobacteria* bila prisutna samo u početnoj fazi procesa održavanja mikrobiote u *in vitro* sustavu.



Slika 11. Stupčasti dijagram zastupljenosti bakterijskih redova u sastavu ispitivane crijevne mikrobiote.

Taksonomska podjela na razini reda prikazana je stupčastim dijagramom na slici 11. Iz njega je vidljivo da u bakterijskom koljenu *Firmicutes* dominiraju bakterije reda *Clostridiales*, *Erysipelotrichales* i *Lactobacillales*. Dvanaest sati nakon dodatka probiotika porasla je zastupljenost bakterija reda *Lactobacillales* na udjel 10,93% s prijašnjih 1,36% te je došlo do obrata zastupljenosti bakterija druga dva reda pri čemu je dodatkom probiotika red *Erysipelotrichales* gotovo nestao i „zamijenjen“ je sa bakterijama reda *Clostridiales*. U sljedećih 12 sati procesa, postupnim trošenjem hranjivih tvari, opao je udjel bakterija reda *Lactobacillales* na 6,04% te je nakon dodatka nove hranjive podloge u koju je dodan prebiotik ponovo došlo do porasta udjela bakterija navedenog reda na 17,92% te je do kraja procesa zastupljenost iznosila 8,88%.

U drugom uzgoju, iz slike 11 je vidljiva slična zastupljenost bakterijskih redova kao i u prvom uzgoju izuzev reda *Lactobacillales* čiji porast nije bio značajan.

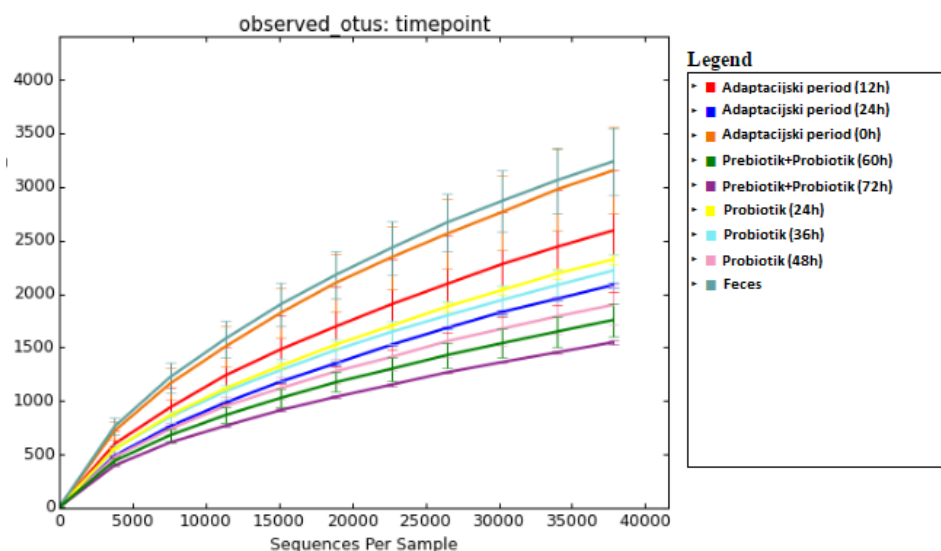


Slika 12. Stupčasti dijagram zastupljenosti bakterijskih rodova u sastavu ispitivane crijevne mikrobiote.

Crijevnu mikrobiotu čine bakterije različitih rodova kao što je prikazano na slici 12. U bakterijskom koljenu *Firmicutes* bili su najzastupljeniji rodovi *Erysipelotrichaceae UCG-003*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Anaerococcus* dok je u koljenu *Bacteroidetes* prevladala prisutnost rodova *Bacteroides*, *Parabacteroides* i *Enterococcus*.

5.2. ALFA RAZNOLIKOST

Alfa raznolikost opisuje raznolikost vrsta u svakom pojedinom uzorku ili staništu. Za vizualizaciju alfa raznolikosti koriste se regresijske krivulje poput ove prikazane na slici 13. Svaka krivulja prikazuje broj procijenjenih OTU-ova u određenoj vremenskoj točki procesa za oba uzgoja s naznačenom razinom greške. Iz Slike 13. je vidljivo da nije dosegnuta horizontalna asimptota što označava da broj očitanih sljedova po uzorku nije bio dovoljan da bi u potpunosti odredio njihovu bakterijsku bioraznolikost.

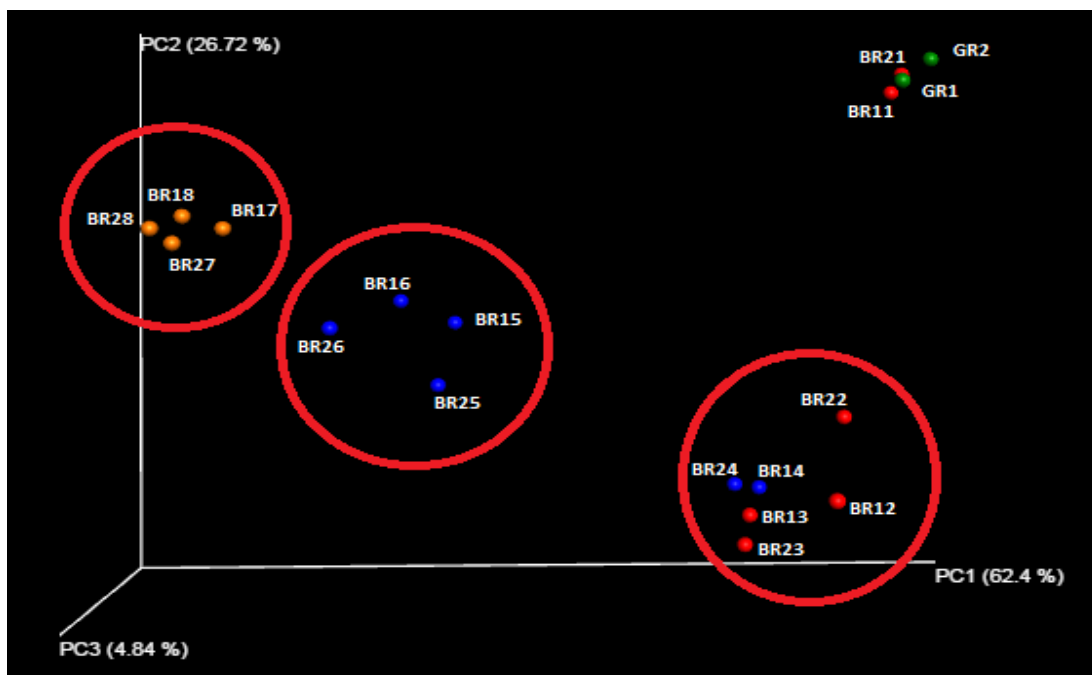


Slika 13. Rarefrakcijska krivulja koja prikazuje alfa raznolikost uzoraka na temelju vremena.

Iz regresijske krivulje prikazane na slici 13 koja uspoređuje alfa raznolikost svih uzoraka može se iščitati da je najveća alfa raznolikost zamijećena kod uzorka fecesa tj. početne mikrobiote. Značajan pad je vidljiv između prvog uzorka adaptacije i adaptacije u 12-om satu, ostale regresijske krivulje prikazuju konstantno smanjivanje s vremenom trajanja uzgoja u bioreaktoru. Najmanja alfa raznolikost se postiže na kraju procesa uzgoja nakon 72 h. Procijenjeni broj OTU-ova u početnim uzorcima fecesa je 3236 ± 312 dok je nakon 72 sata procesa procijenjen broj OTU-ova 1651 ± 151 .

5.3. BETA RAZNOLIKOST

Beta raznolikost predstavlja raznolikost između više uzoraka u analizi, a za usporedbu sastava mikrobiote između svih uzoraka izabrana je osnovna koordinatna analiza („Principal Coordinates Analysis“ - PCoA). PCoA metoda smješta uzorke u trodimenzionalni okvir na temelju udaljenosti koja je određena metrikom, što je vidljivo na slici 14. Kod UniFrac metrike, koja je korištena u ovom radu, razlikuje se težinska i netežinska UniFrac metrika. Težinska UniFrac metrika obuhvaća prisutnost i zastupljenost samih taksonomskih grupa, što ju čini kvantitativnom, dok netežinska UniFrac metrika uzima u obzir samo prisutnost ili odsutnost taksonomskih grupa. Težinski PCoA je korišten za prikaz rezultata što omogućuje uočavanje sličnosti, odnosno različitosti uzoraka na osnovu prisutnosti i zastupljenosti različitih mikrobnih vrsta.



Slika 14. PCoA prikaz udaljenosti uzoraka mikrobnih populacija na temelju njihove raznolikosti. Svaka boja točaka u grafu predstavlja uzorak s određenom intervencijom: zelena - feces; crvena – bazna prihrana (BP)/1.dan; plava – BP i probiotik/ 2.dan; narančasta – BP i prebiotik/3.dan.

Na slici 14 se nalazi trodimenzionalni okvir s naznačenim klasterima uzoraka slične raznolikosti po danu. Klasteri odgovaraju tipu intervencije - početna prilagodba mikrobiote na uvjete u bioreaktoru, dodatak probiotika i dodatak prebiotika i statistički su značajni sa p-vrijednošću 0,001 opaženog klasteriranja dobivenu neparametrijskom adonis statističkom metodom implementiranom u paketu QIIME. Na temelju udaljenosti uzoraka u PCoA prikazu vidljivo je da mikrobiota nakon prvog dana tretiranja s baznom prihranom postiže sličnu raznolikost u oba uzgoja te se razlikuje od mikrobiote u početnim uzorcima. Isti rezultati se postižu i za druge dvije intervencije, probioticima i prebioticima, nakon drugog i trećeg dana uzgoja u *in vitro* sustavu.

6. RASPRAVA

Većina istraživanja mikrobiote u *in vitro* uvjetima su fokusirana na promjene koncentracije raznih SCFA ovisno o uvjetima uzgoja i dodanim supstratima, dok je broj istraživanja koji prati odgovor mikrobiote na uvjete *in vitro* uzgoja i na dodatak raznih supstrata zanemariv. U ovom radu praćen je odgovor mikrobiote u *in vitro* sustavu na dodatak probiotičke bakterije *Lactobacillus plantarum* i prebiotika NUTRIOSE® FB06 .

Iz beta raznolikosti uzoraka (Slika 14.) vidljivo je da su početni uzorci fecesa i uzorci izuzeti iz biorektora odmah nakon naciepljivanja vrlo slični te možemo isključiti utjecaj uporabe različitih kitova na sam postupak određivanja bakterijske bioraznolikosti. Bliskost ostalih vremenskih točki dvaju uzgoja potvrđuje reproducibilnost samog procesa *in vitro* kultivacije uz naglašenu individualnu komponentu svakog uzorka, što je potvrđuju dostupna istraživanja (Cordonnier i sur., 2015; Aguirre i sur., 2014).

Na osnovu taksonomske analize prikazane na slikama 9,10 i 11 vidljivo je da su najzastupljenija bakterijska koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, odnosno redovi *Bacteroidales* i *Clostridiales* što potkrepljuje već spomenutu činjenicu da su upravo spomenuta koljena najzastupljenija u sastavu crijevne mikrobiote (Voreades i sur., 2014). Iz prikazanih rezultata možemo primijetiti da tijekom uzgoja u *in vitro* uvjetima dolazi do značajnih promjena u odnosu koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. Taj odnos je upravo bio jedan od prvih identificiranih markera koji je povezivao sastav mikrobiote sa pretilošću (Ley i sur., 2006). U procesu uzgoja mikrobiote *in vitro* došlo je do značajnog smanjenja zastupljenosti bakterijskog koljena *Bacteroidetes* – s prosječno 55% u uzorku fecesa i početnom uzorku naciepljenom u biorektoru na samo ~5% prisutnih nakon završetka uzgoja. Mogući razlog značajnog gubitka koljena *Bacteroidetes* može se objasniti nedostatnim izvorom nutrijenata potrebnih za rast istoimenih bakterija s obzirom da to koljeno zahtijeva nutrijente životinjskog podrijetla (DSMZ, 2017) koji nisu predviđeni hranjivom podlogom SIEM koja je korištena u postupku simulacije. Većina bakterijskih rodova koljena *Bacteroidetes* kao što su *Prevotella* i *Paraprevotella* se povezuju s visokom konzumacijom hrane biljnog podrijetla što objašnjava njihov gubitak nakon inokulacije. Rod *Bacteroides* sačinjavaju vrste bakterija koje imaju sposobnost razgradnje jednostavnih šećera i polisaharida, održavajući svoju zastupljenost u svakom uzorku mikrobiote što je prikazano u tablici na slici 11 (Conlon i Bird, 2015).

Bakterijsko koljeno *Firmicutes* prolazi kroz izmjene zastupljenosti na razini reda bakterija nakon samoga početka procesa uzgoja te postiže konformaciju sličnu početnoj nakon

uvođenja probiotičke prihrane te dodane prebiotičke prihrane. Najveće su promjene vidljive na reda *Clostridiales* koji u početku uzgoja u fazi perturbacije mikrobiote zamjenjuje red *Erysipelotrichales*. Pokušaj uspostavljanja sličnog sastava kao početne mikrobiote može biti objašnjeno homeostatskim učinkom probiotika da se održi stabilna crijevna mikrobiota čovjeka (Sanders, 2016).

Kao rezultat intervencije probiotičkom bakterijom *Lactobacillus plantarum* za koju je potvrđeno (Million i sur., 2012) da djeluje pozitivno gubitak tjelesne težine došlo je do drastične promjene zastupljenosti pojedinih rodova u uzorku 12 sati nakon probiotičke intervencije. Valja napomenuti da promjena nije bila u potpunosti identična u prvom i drugom uzgoju uslijed različitog početnog sastava mikrobiote u uzorku fecesa, međutim na osnovu rezultata beta raznolikosti vidljivo je da intervencija probiotikom rezultira mikrobiotom koja je svojim sastavom slična. Značajno je smanjen *Erysipelotrichaceae* UCG-003 s 56,49 % u prvom uzorku do 1,36% u zadnjem uzorku. U prvom uzgoju u uzorcima nakon dodatka probiotika došlo je do povećanja zastupljenosti rodova: *Enterococcus* (10,29%), *Clostridium sensu stricto 1* (19,84%), *Anaerococcus* (8,67%). U drugom uzgoju došlo je povećanja rodova *Clostridium sensu stricto 1* (27,56%), *Anaerococcus* (4,69%), *Peptoniphilus* (6,85%). Dok porast roda *Enterococcus* nije primijećen. U oba uzorka dolazi do porasta roda *Campylobacter* i to u uzorcima nakon dodatka prebiotika doseže i do 11,09%. Slični rezultati su pokazani i u drugim istraživanjima gdje je intervencija probiotikom dovela do ponovnog porasta bakterija roda *Clostridium*, *Enterococcus* i *Campylobacter* (Kristensen i sur., 2016).

Probiotik *Lactobacillus plantarum*, odnosno rod *Lactobacillus*, je detektiran u prvom uzgoju sa zastuplenošću od 0.1% u svim uzorcima nakon intervencije, dok u drugom uzgoju nije detektiran. Jedan od razloga je sama koncentracija probiotika koja je dodana u sustav i iznosila je $1 \cdot 10^6$ (1 ml suspenzije čiji je CFU/mL $1 \cdot 10^8$) dok je pretpostavljena koncentracija bakterija nacijepljena u bioreaktor $1 \cdot 10^{10}$ (jer je dodano 5% inokuluma, uz pretpostavljeni ukupni CFU/mL $1 \cdot 10^{12}$). Drugi mogući razlog za izostanak detekcije roda *Lactobacillus* nakon intervencije može biti u nedovoljnoj pokrivenosti uzoraka sekvencioniranjem što je vidljivo iz rarefrakcijske krivulje alfa raznolikosti.

Intervencija prebiotikom nije izazvala promjene u sastavu mikrobiote nego u zastupljenosti pojedinih bakterijskih rodova. Tako je u oba uzgoja povećana zastupljenost roda *Anaerococcus* na ~ 30%. U prvom uzgoju je došlo do povećanja zastupljenosti roda *Enterococcus* do 17% , a u drugom uzgoju roda *Peptoniphilus* do 22%. U oba uzgoja došlo je do smanjenja zastupljenosti roda *Clostridium sensu stricto 1* s prosječnih 40% na 25% nakon intervencije prebiotikom. Nije primijećeno povećanje zastupljenosti roda *Bacteroides* koja je

opisana u literaturi (Lefranc-Millot i sur., 2012; Hobden i sur., 2013) što bi se moglo objasniti negativnim utjecajem hranjive podloge na zastupljenost koljena *Bacteroidetes* tokom cijelog uzgoja.

Na temelju rezultata alfa raznolikosti dobivenih rarefrakcijskim dijagramima pokazanim na slici 12 vidljivo je smanjenje raznolikosti mikrobiote u sustavu što su već opazili (Aguirre i Venema, 2017) pri provođenju eksperimenata u *in vitro* sustavu. Do ove pojave najvjerojatnije dolazi zbog uvjeta postavljenih u sustavu koji se minimalno mijenjaju tokom cijelog procesa te zbog fiksnog sastava hranjive podloge s kojom se vrši prihrana mikrobiote. U daljnjim istraživanjima će biti potrebno optimizirati podlogu s naglaskom na bakterije koljena *Bacteroidetes* čiji gubitak je najvidljiviji u *in vitro* uvjetima uzgoja. Također je potrebno produžiti vrijeme uzgoja kako bi se dobila informacija da li će se broj bakterijskih rodova ustaliti i tako definirati sastav mikrobiote *in vitro* sustava koja bi se kasnije mogla koristiti kao standardni početni inokulum za sve buduće procese.

7. ZAKLJUČCI

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

- 1.) Postavljenim *in vitro* sustavom postignuta je mikrobiota stabilnog sastava u vremenskom rasponu od 24 sata koju je moguće razlikovati od ostalih faza uzgoja
- 2.) Na osnovu rezultata beta raznolikosti postignuta je ponovljivost samog procesa *in vitro* kultivacije uzevši u obzir varijacije samog inokuluma
- 3.) Dodavanje prebiotika *Lactobacillus plantarum* u stabiliziranu mikrobiotu značajno utječe na promjenu sastava mikrobiote što je vidljivo iz rezultata beta raznolikosti
- 4.) Dodavanje prebiotika utječe na promjenu zastupljenosti rodova *Enterococcus* i *Anaerococcus* i bilo je ovisno o uzgoju
- 5.) Uzgojem crijevne mikrobiote u *in vitro* uvjetima dolazi do smanjenja broja bakterijskih rodova vidljive iz analiza alfa raznolikosti
- 6.) Potrebno je provesti dodatna testiranja s modificiranom hranjivom podlogom kako bi se očuvala zastupljenost koljena *Bacteroidetes* u uvjetima uzgoja *in vitro*

8. ZAHVALE

Prvenstveno se zahvaljujemo mentoru doc.dr.sc. Jurici Žučku što nam je omogućio izradu i prijavu ovog rada za Rektorovu nagradu te na njegovoj pomoći i vrijednim savjetima pri pisanju rada.

Veliko hvala i dr.sc. Damiru Orosu na njegovom neiscrpnom strpljenju, stručnom vodstvu i dugim satima provedenima s nama tokom laboratorijskog rada te na svom prenesenom znanju i pomoći.

Zahvaljujemo se svim djelatnicima Kabineta za bioinformatiku što su nam omogućili stjecanje novih radnih iskustava i ugodnoj atmosferi.

Zahvaljujemo se djelatnicima Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu na njihovom doprinosu u provedbi ovoga rada.

Posebno se zahvaljujemo svojim obiteljima i prijateljima na podršci, bodrenju i strpljenju.

9. POPIS LITERATURE

- Aagaard, K., Ma, J., Anthony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J., Versalovic, J. (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* **6**, 237-265.
- Abbeele, P. V. D., Grootaert, C., Marzorati, M., Possemiers, S., Verstraete, W., Gérard, P. (2010) Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for bacteroidetes and Clostridium cluster IX. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5237–5246.
- Aguirre, M. i Venema, K. (2017) Challenges in simulating the human gut for understanding the role of the microbiota in obesity. *Benef Microbes.* **8**, 31-53.
- Aguirre, M., Jonkers, D., Troost, F. J., Roeselers, G., Venema, K (2014) In Vitro Characterization of the Impact of Different Substrates on Metabolite Production, Energy Extraction and Composition of Gut Microbiota from Lean and Obese Subjects. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0113864
- Alander, M., De Smet, I., Verstraete, W., Wright, A., Mattila-Sandholm, T., (1999) The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *Int. J. Food Microbiol.*; **46**, 71–79.
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., Raoult, D. (2009) Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One* **4**, e7125.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180.
- Boureau, H., Hartmann, L., Karjalainen, T., Rowland, I., Wilkinson, M. H. F. (2000) Models to study colonisation and colonisation resistance. *Microb. Ecol. Health D* **2**, 247–58.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. .K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D.,

- Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**, 335-336.
- Chen, J., He, X., Huang, J. (2014) Diet Effects in Gut Microbiome and Obesity. *J. Food Sci.* **79**, 1-10.
 - Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., Knight, R. (2012) The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* **148**, 1258–1270.
 - Conlon, M. i Bird, A. (2015) The impact of diet and lifestyle on the gut microbiota and human health. *Nutrients* **7**, 17-44.
 - Conway, P.L. (1995) Microbial ecology of the human large intestine. U: Human Colonic Bacteria: Nutrition, Physiology, and Pathology, (Gibson, G. R., Macfarlane, G. T., ured.), Boca Raton: CRC, 1–24.
 - Cordonnier, C., Thévenot, J., Etienne-Mesmin, L., Denis, S., Alric, M., Livrelli, V., Blanquet-Diot, S. (2015) Dynamic In Vitro Models of the Human Gastrointestinal Tract as Relevant Tools to Assess the Survival of Probiotic Strains and Their Interactions with Gut Microbiota. *Microorganisms* **3**, 725-745.
 - D'Argenio, V., Salvatore, F. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta.* **451**, 97–102.
 - Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M., Relman, D. A. (2006) Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol. Evol.* **21**: 517–523.
 - Dicksved, J., Halfvarson, J., Rosenquist, M., Jarnerot, G., Tysk, C., Apajalahti, J., Engstrand, L., Jansson, J. K. (2008) Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J.* **2**, 716–27.
 - DSMZ (2017) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, <https://www.dsmz.de>. Pristupljeno 20. travnja 2017.
 - Egert, M., Graaf, A. A., Smidt, H., Vos, W. M., Venema, K. (2006) Beyond diversity: Functional microbiomics of the human colon. *Trends Microbiol.* **14**, 86–91.
 - Gérard, P. (2016) Gut microbiota and obesity. *Cell Mol. Life Sci.* **73**, 147–162.

- Gibson, G. R., Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. (1988) Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2750–2755.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **6**, 1401-1412.
- Hill, M. J., (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev.* **6**, 43-45.
- Hollister, E. B., Gao, C., Versalovic, J. (2014) Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology* **146**, 1449–1458.
- Hobden, M. R., Martin-Morales, A., Guérin-Deremaux, L., Wils, D., Costabile, A., Walton, G. E., Rowland, I., Kennedy, O. B., Gibson, G. R. (2013) In Vitro Fermentation of NUTRIOSE® FB06, a Wheat Dextrin Soluble Fibre, in a Continuous Culture Human Colonic Model System. *PLoS One* **8**, e77128.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D. N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **21**, 8836–8847.
- Jimenez, E., Marin, M. L., Martin, R. (2008) Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* **159**, 187–193.
- Koppe, L., Fouque, D. (2017) Microbiota and prebiotics modulation of uremic toxin generation. *Panminerva Med.* **59**, 173–187.
- Kristensen, N., Bryrup, T., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T. H., Pedersen, O. (2016) Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Med.* **8**, doi: 10.1186/s13073-016-0300-5
- Lan, Y., Kriete, A., Rosen, G. (2013) Selecting age-related functional characteristics in the human gut microbiome. *Microbiome.* **1**, 2-11.
- Lefranc-Millot, C., Guerin-Deremaux, L., Wils, D., Neut, C., Miller, L., Saniez-Degrave, M. (2012) Impact of a Resistant Dextrin on Intestinal Ecology: How Altering the Digestive Ecosystem with NUTRIOSE®, a Soluble Fibre with Prebiotic Properties, May Be Beneficial

for Health. *J. Int. Med. Res.* **40**, 211–224.

- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022–1023.
- Macfarlane, G. T., Macfarlane, S. (2007) Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 156–162.
- Macfarlane, G. T., Macfarlane, S., Gibson, G. R. (1998) Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microb. Ecol.* **35**, 180–187.
- Mäkivuokko, H., Nurmi, J., Nurminen, P., Stowell, J., Rautonen, N., (2005) In vitro effects on polydextrose by colonic bacteria and Caco-2 cell cyclooxygenase gene expression. *Nutr. Cancer.* **52**, 93–103.
- Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougom, F., Leibovici, L., Raoult, D. (2012) Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb. Pathog.* **53**, 100-108.
- Molly, K., Vande, W. M., Verstraete, W., (1993) Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 254–258.
- Neyrinck, A. M., Possemiers, S., Verstraete, W., De Backer, F., Cani, P. D. (2012) Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (*Roseburi spp.*) by chitin–glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 51-59.
- Nuenen, M. H. M. C., Diederick, M. P., Venema, K. (2003) The Effect of Various Inulins and *Clostridium difficile* on the Metabolic Activity of the Human Colonic Microbiota in vitro. *Microb. Ecol. Health Dis.* **15**, 137–144.
- Oelschlaeger, T. A. (2010) Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 57–62.
- Ouwehand, A. C., Vaughan, E. E. (2006) *Gastrointestinal Microbiology*, Taylor & Francis Group, New York.

- Petrof, E. O., Gloor, G. B., Vanner, S. J., Weese, S. J., Carter, D. (2013) Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: “RePOOPulating” the gut. *Microbiome* **1**, 3-14.
- Rehman, A., Heinsen, F. A., Koenen, M. E., Venema, K., Knecht, H., Hellmig, S., Schreiber, Stefan, O., Stephan, J. (2012) Effects of probiotics and antibiotics on the intestinal homeostasis in a computer controlled model of the large intestine. *BMC Microbiol.* **12**, 47-57.
- Remely, M., Tesar, I., Hippe, B., Gnauer, S., Rust, P., Haslberger, A. G. (2015) Gut microbiota composition correlates with changes in body fat content due to weight loss. *Benef. Microbes* **6**, 431–439.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Meheust, A. (2010) Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* **104**, 1-63.
- Sanders M., S. (2016) Probiotics and microbiota composition. *BMC Med.* **14**, 1-3. doi: 10.1186/s12916-016-0629-z
- Sanders, M. E., Lenoir-Wijnkoop, I., Salminen, S., Merenstein, D. J., Gibson, G. R., Petschow, B. W. (2014) Probiotics and prebiotics: Prospects for public health and nutritional recommendations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1309**, 19–29.
- Sankar, S. A., Lagier, J. C., Pontarotti, P., Raoult, D., Fournier, P. E. (2015) The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**, 276–286.
- Simpson, H. L., Campbell, B.J. (2015) Review article: Dietary fibre-microbiota interactions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **42**, 158–179.
- Šušković, J., (2016) Crijevna mikroflora, prehrana i zdravlje: Mikrobna ekologija gastrointestinalnog trakta [interna skripta]. Zagreb: Prehrambeno - biotehnoški fakultet.
- Tobergte, D. R., Curtis, S. (2013) Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. *J. Chem. Inf. Model* **53**, 1689–1699.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E.,

- Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., Gordon, J. I. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins *Nature* **457**, 480–4.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., Gordon, J.I. (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* **1**, 6-14.
 - Venema, K., Maathuis, A. J. H., Steijart, M. N., Graaf, A. A. (2012) Use of ¹³C-labelled carbohydrates to trace microbial metabolism in the colon; light in the tunnel! *FASEB J.* **26**, 638-639.
 - Venema, K., Nuenen, M., Smeets-Peeters, M., Minekus, M., Havenaar, R. (2000) TNO's in vitro large intestinal model: an excellent screening tool for functional food and pharmaceutical research. *Ernährung/Nutrition* **24**, 558–564.
 - Voreades, N., Kozil, A., Weir, T. L. (2014) Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front. Microbiol.* **5**, 1-9.
 - Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Parkhill, J., Flint, H. J. (2011) Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* **5**, 220-230.
 - Williams, C. F., Walton, G. E., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., Gibson, G. R. (2014) Comparative Analysis of Intestinal Tract Models. *Annu. Rev. Food. Sci. Technol.* **6**, 1-22.
 - Wilson, B., Whelan, K. (2017) Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **32**, 64–68.
 - Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**, 105–108.
 - Xu, Z., Knight, R. (2014) Dietary effects on human gut microbiome diversity. *Br. J. Nutr.* **113**, 1–5.

- Yarza, P. i sur. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 635-645.

10. SAŽETAK

***In vitro* sustav za testiranje utjecaja probiotika i prebiotika na ravnotežu crijevne
mikrobiote**

Tena Čadež i Marina Zubčić

Sažetak

Mikrobiota, definirana kao zajednica mikroorganizama koji obitavaju na i u ljudskom tijelu, stekla je značajnu ulogu u određivanju utjecaja na zdravlje i dobrobit ljudi. Mikrobiota se mijenja tokom životnog vijeka i njen sastav odražava čovjekove životne i prehrabene navike te upotrebu lijekova. Međutim, neke promjene mikrobiote se povezuju s raznim bolesnim stanjima koje variraju od gastrointestinalnih i metaboličkih pa sve do bolesti kao što je Alzheimerova bolest. Pretilost je također jedna od tih bolesti, odnosno stanja, za koje se vjeruje da su povezane s mikrobiotom pa se iz tog razloga ulažu naponi da se takva stanja liječe manipulacijom mikrobiote. Postoji nekoliko načina manipulacije mikrobiote od kojih su najčešći upotreba probiotika i prebiotika. U ovom radu se istraživao učinak upotrebe (dodatka) probiotičkih bakterija koje se povezuju s pojavom smanjenja tjelesne težine i prebiotika na sastav mikrobiote u probavnom sustavu pretile osobe. Iz tog razloga, korišten je *in vitro* sustav za simulaciju silaznog dijela ljudskog debelog crijeva, a promjene u mikrobioti su istraživane sekvencioniranjem 16S rRNA gena. Dobiveni rezultati ukazuju da dodavanje probiotika i prebiotika, mijenja sastav mikrobiote probavnog sustava na svojstven način prikazan beta raznolikošću koja omogućuje specifično grupiranje svake zasebne vrste intervencije. Također je uočeno smanjenje bakterijske bioraznolikosti u *in vitro* sustavu tokom vremena.

Ključne riječi: pretilost, mikrobiota probavnog sustava, probiotik, prebiotik

11. SUMMARY

In vitro testing system for the impact of probiotics and prebiotics on the maintenance of human gut microbiota

Tena Čadež i Marina Zubčić

Summary

Microbiota, defined as microorganisms living on and in human host, has gained significant role in determining and affecting human health and wellbeing. Our microbiota changes through lifetime and reflects the lifestyle, nutritional habits and medication usage of the host. However some changes in microbiota have been link to diseased states ranging from gastrointestinal, metabolic and even diseases like Alzheimer's disease. Obesity is also one of the diseases believed to be linked to microbiota and there are efforts to treat it by affecting the microbiota. There are several ways to affect microbiota – most common being administration of probiotics and prebiotics. In this work, effects of administration of probiotic bacteria correlated to weight loss and prebiotic on composition of gastrointestinal microbiota of obese person are assessed. For that purpose we have used *in vitro* system simulating distal part of the human colon and changes in the microbiota were assessed by 16S rRNA gene sequencing. Results indicate that addition of both probiotic and prebiotic changes the composition of gastrointestinal microbiota with distinct pattern, as assessed by beta diversity analysis, allowing us to distinctly cluster each type of intervention. Also observed, was the reduction of bacterial biodiversity with elapsed time in the *in vitro* system.

Keywords: obesity, gastrointestinal microbiota, probiotic, prebiotic