

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Arijana FILIPIĆ

**VPLIV MIROVANJA NA MIKROBIOTO
PREBAVNEGA TRAKTA LJUDI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Arijana FILIPIĆ

**VPLIV MIROVANJA NA MIKROBIOTO PREBAVNEGA TRAKTA
LJUDI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**IMPACT OF STATIONARY LIFESTYLE ON HUMAN GUT
MICROBIOTA**

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes - Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje medoddelčnega študija mikrobiologije je dne 12.05.2015 sprejela temo in za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Blaža Stresa, za recenzentko pa znan. svet. Bojano Bogovič Matijašič.

Mentor: prof. dr. Blaž Stres

Recenzentka: znan. svet. Bojana Bogovič Matijašič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Blaž STRES

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: znan. svet. Bojana BOGOVIČ MATIJAŠIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Arijana Filipić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 579.61:616.3:796.012(043)=163.6
KG	medicinska mikrobiologija/črevesna mikrobiota/prebavni trakt/telesna neaktivnost/debelost
AV	FILIPIC, Arijana, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	STRES, Blaž (mentor)/ BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2016
IN	VPLIV MIROVANJA NA MIKROBIOTO PREBAVNEGA TRAKTA LJUDI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XI, 59 str., 5 pregl., 19 sl., 3 pril., 100 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Izvedli smo primerjalno analizo fekalnih vzorcev treh zdravih moških v šestih časovnih točkah iz projekta PlanHab z namenom ugotavljanja vpliva mirovanja na (i) spremembo strukture bakterijske mikrobne združbe črevesja ter na (ii) parametre okolja v prebavilih. Raziskali smo tudi, ali (iii) te spremembe sovpadajo z odzivi humane fiziologije preiskovancev v istem eksperimentu. Preiskovanci so po sedmih dneh navajanja na novo okolje v Olimpijskem športnem centru Planica, Slovenija, začeli z 21 dnevним mirovanjem v strogo kontroliranemu okolju, s standardiziranimi, enakimi jedilniki ter pri znižanem parcialnem tlaku kisika. V raziskavi so v vzorcih blata bili izmerjeni pH, velikost organskih molekul, koncentracija organskih molekul, redukcijskih sladkorjev, celokupnih in posameznih hlapnih maščobnih kislin ter delež vode. Dinamika mikrobnih združb je bila opisana s hitrimi molekularnimi tehnikami tipizacije gena za 16S rRNA bakterij. Variabilnosti fizikalno-kemijskih parametrov ter struktura mikrobne združbe so bili v največji meri povezani z razliko v humani fiziologiji vsakega preiskovanca, ter deloma z razmerami eksperimenta. V 7+21 dneh eksperimenta so se pokazale pomembne reverzibilne razlike v človeški fiziologiji (PlanHab), z uporabljenimi analitskimi tehnikami pa značilnih razlik v mikrobioti in okoljskih parametrih črevesja med začetkom in koncem eksperimenta nismo zaznali. Zato sklepamo, da je za razvoj težko reverzibilne ali ireverzibilne debelosti najverjetneje potreben daljši obseg neaktivnosti od 21 dni, pri čemer pa se merljive negativne a še reverzibilne spremembe v humani fiziologiji zgodijo že bistveno prej. To kaže na evlucijski pomen stabilne in proti pretresom odporne strukture mikrobiote v prebavilih, ter na to, da debelosti primarno ne povzroča okužba, ampak odločitev za neaktivni slog življenja ter posledični fiziološki odzivi človeka. Ti vodijo v spremenjene termodinamske razmere v prebavilih in s tem ustvarjanje novih niš, ki favorizirajo drugačno aktivnost obstoječih mikroorganizmov, oziroma naselitev patogenov. Razširjene analize na drugih vzorcih so v teku.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC UDC 579.61:616.3:796.012(043)=163.6
CX medical microbiology/gut microbiota/alimentary tract/physical inactivity/obesity
AU FILIPIĆ, Arijana
AA STRES, Blaž (supervisor)/ BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (reviewer)
STR SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2016
TI IMPACT OF STATIONARY LIFESTYLE ON HUMAN GUT MICROBIOTA
DT M. Sc. Thesis (Master study Programmes – Field Microbiology)
NO XI, 59 p., 5 tab., 19 fig., 3 ann., 100 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Comparative analysis of faecal samples of three healthy men in six time periods from the project PlanHab was used to determine the influence of bed rest (i) on the changes in microbial community and (ii) on the environmental parameters of human gut. Furthermore, we examined (iii) whether those changes have similar trends as changes of the participant's physiology in the experiment. After seven days of adjusting on a new environment in Olympic Sport Center Planica, Slovenia, subjects started 21 days of bed rest under strictly controlled conditions with the same, standardised menus and under lower partial pressure of oxygen. During the research the following measurements were made: pH, molecular size of organic compounds, concentration of organic molecules, reducing sugars and of total and individual short-chain fatty acids and water content. Dynamics of microbial communities were described by using rapid molecular techniques for typisation of bacterial gene for 16S rRNA. Diversity of physical–chemical parameters and of microbial community was best correlated with the physiology of each individual and also partially with the environment in which the experiment was done. In 7+21 days of the experiment, reversible changes in human physiology were obvious (PlanHab) but no significant differences in physical–chemical parameters and microbial communities were noted. That is why we concluded that periods longer than 21 days of inactive lifestyle are needed for the development of hardly reversible or irreversible obesity while negative and measurable changes in human physiology are present after only a few days of stationary lifestyle. From an evolutionary point of view this shows how stable and resistant the microbial structure of human gut is to changes and also that a change in a microbial community is not the primary reason for the development of obesity as much as the decision for an inactive lifestyle, consequently changing thermodynamic conditions in the gut and enabling the development of new niches that favour a different activity of present microorganisms and the colonisation of pathogens. Extended research with the other samples is currently in progress.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 CILJI IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED LITERATURE	3
2.1 OPIS RAZISKAVE “PLANETARY HABITAT SIMULATION”	3
2.1.1 Splošno o Planetary Habitat Simulation (PlanHab)	3
2.1.2 Ozadje raziskave	3
2.1.3 Struktura raziskave	3
2.2 GASTROINTESTINALNI TRAKT	5
2.2.1 Črevesje in črevesna mikrobiota	5
2.2.2 Tipizacija mikrobne združbe črevesja	10
2.3 VPLIV RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA STRUKTURO ČREVESNE MIKROBIOTE	11
2.3.1 Mikrobni metaboliti povezani z zdravjem človeka	11
2.3.1.1 HMK	11
2.3.2 Vpliv pH na črevesno mikrobioto	12
2.3.3 Vpliv makronutrientov na črevesno mikrobioto	13
2.3.3.1 Organske spojine in celokupni topni organski ogljik (CTOO)	13
2.3.3.1.1 Ogljikovi hidrati (OH)	14

2.3.3.1.1.1	Redukcijski sladkorji	15
2.3.3.1.1.2	Dietna vlakna	15
2.3.3.2	Proteini	16
2.3.3.3	Maščobe	16
2.3.4	Vodni delež v blatu	17
3	MATERIAL IN METODE	18
3.1	SHEMA	18
3.2	PROTOKOL DELA	18
3.3	IZMERJENI FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI V BLATU	19
3.3.1	Meritve pH	19
3.3.2	Ugotavljanje velikosti topnih organskih spojin z merjenjem absorpcijskih spektrov	19
3.3.3	Merjenje celokupnega topnega organskega ogljika	21
3.3.4	Ugotavljanje redukcijskih sladkorjev z uporabo reagenta PAHBAH	22
3.3.5	Ugotavljanje HMK	23
3.3.6	Ugotavljanje vodnega deleža	24
3.4	DELO Z DNK IN LH-PCR	24
3.4.1	Ekstrakcija, kvantifikacija in pomnoževanje DNK	24
3.5	STATISTIČNE ANALIZE	27
3.5.1	Analiza in normalizacija podatkov LH-PCR	27
3.5.1.1	Ugotavljanje "pravih" vrhov	27
3.5.1.2	Primerjava elektroferogramov	27
3.5.2	Ne metrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS)	28
4	REZULTATI	30
4.1	FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI	30
4.1.1	pH	30
4.1.2	Koncentracija HMK	31
4.1.3	Velikost topnih organskih spojin	34
4.1.4	Koncentracija celokupnega topnega organskega ogljika	35
4.1.5	Koncentracija redukcijskih sladkorjev	37
4.1.6	Vodni delež	38

4.2	KONCENTRACIJA DNK	40
4.3	ORDINACIJSKA ANALIZA	40
4.3.1	Fizikalno-kemijski parametri	40
4.3.2	Mikrobna združba	41
5	RAZPRAVA	43
6	SKLEPI	50
7	POVZETEK	51
8	VIRI	52
	ZAHVALE	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Struktura in funkcija bakterijske združbe črevesja (Rosenbaum in sod., 2015)	7
Preglednica 2: Prevod angleških izrazov Slike 3	9
Preglednica 3: Protokol pomnoževanja gena 16S rDNK z reakcijo PCR	25
Preglednica 4: Protokol za LH-PCR	26
Preglednica 5: Koncentracija DNK	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Časovni potek kampanje	5
Slika 2: Struktura raziskave	5
Slika 3: Prikaz debelega črevesja in procesov (Netter, 2016)	8
Slika 4: Shema eksperimenta	18
Slika 5: Sprememba pH blata oseb S2, S4 in S5 po času	30
Slika 6: Relativni delež HMK osebe S2 po času	32
Slika 7: Relativni delež HMK osebe S4 po času	32
Slika 8: Relativni delež HMK osebe S5 po času	33
Slika 9: Koncentracija celokupnih HMK podana kot miligram celokupnih HMK na gram suhe snovi vzorca po času	33
Slika 10: Sprememba velikosti topnih organskih spojin oseb S2, S4 in S5 po času	34
Slika 11: Sprememba velikosti topnih organskih spojin oseb S2, S4 in S5 po času	35
Slika 12: Sprememba koncentracije celokupnega topnega organskega ogljika oseb S2, S4 in S5 po času	36
Slika 13: Sprememba koncentracije celokupnega topnega organskega ogljika oseb S2, S4 in S5 po času	36
Slika 14: Sprememba koncentracije redukcijskih sladkorjev oseb S2, S4 in S5 po času	37
Slika 15: Sprememba koncentracije redukcijskih sladkorjev oseb S2, S4 in S5 po času	38
Slika 16: Sprememba vodnega deleža oseb S2, S4 in S5 po času	39
Slika 17: Sprememba vodnega deleža oseb S2, S4 in S5 po času	39
Slika 18: Ordinacijska analiza fizikalno-kemijskih parametrov vseh oseb v vseh časih s tehniko NM-MDS	41
Slika 19: Ordinacijska analiza mikrobne združbe vseh oseb v vseh časih s tehniko NM-MDS	42

KAZALO PRILOG

Priloga A: Predvideni in dejanski dnevi vzorčenja

Priloga B: Vnos gramov maščob, proteinov in OH na dan

Priloga C: Vpliv zauživanja vlaknin na zdravje

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BPK	biokemijska potreba po kisiku
COO	celokupni organski ogljik
CTOO	celokupni topni organski ogljik
DGGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu
DNK	deoksiribonukleinska kislina
GIT	gastrointestinalni trakt
HAMB	hipoksično gibanje (angl. Hypoxic ambulatory confinement)
HBR	hipoksično mirovanje (angl. Hypoxic bed rest confinement)
HMK	hlapne maščobne kisline
KCTOO	kromoforna ali obarvana raztopljena organska snov
KPK	kemijska potreba po kisiku
KVMK	kratkoverižne maščobne kisline
LH- PCR	analiza dolžinske heterogenosti z verižno reakcijo s polimerazo (angl. Length heterogeneity PCR)
LPS	lipopolisaharidi
MO	mikroorganizem
NBR	normoksično mirovanje (angl. Normoxic bed rest confinement)
NM-MDS	ne metrično več dimenzionalno lestvičenje
OH	ogljikovi hidrati
PAHBAH	hidrazid parahidroksi benzojeva kislina
RNK	ribonukleinska kislina
TGGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v časovnem temperaturnem gradientu
T-RFLP	polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov

1 UVOD

Danes ljudje vse več časa preživljajo v sedečem položaju oz. vse več mirujejo in se vse manj gibljejo in telovadijo. Na to vpliva razvoj tehnologije, avtomatizacija gospodinjstkih opravil, način prevoza in številni drugi dejavniki. Zaradi mirovanja trpijo velike mišice nog, hrbta in trupa (Hamilton in sod., 2007). Epidemiološke raziskave so pokazale največjo stopnjo različnih bolezni in smrti pri najmanj aktivnih osebah (Hamilton in sod., 2004). Osebe, ki se ne gibljejo dovolj, imajo večjo možnost za razvoj metabolnega sindroma, ki vključuje visok krvni tlak, povečano koncentracijo glukoze v plazmi in druge simptome, diabetesa tipa 2, debelosti in kardiovaskularnih bolezni (Zhao, 2013; Hamilton in sod., 2007). Osebe, ki imajo službe, v katerih veliko sedijo, imajo dvakrat višjo stopnjo kardiovaskularnih bolezni v primerjavi z osebami, ki v službah veliko stojijo oz. se gibljejo (Hamilton in sod., 2007). Pokazali so tudi, da so trije tedni konstantnega mirovanja pri sicer zdravih moških imeli večji vpliv na fizično zmogljivost pri delu kot tri desetletja staranja (Hamilton in sod., 2007).

Mirovanje, telovadba in prehrana so nekateri od mnogih dejavnikov, ki vplivajo na spremembo črevesne mikrobiote. Z raziskovanjem zdravih športnikov so pokazali, da na raznolikost mikrobne združbe močno vplivata telovadba in prehrana. Mikrobna raznovrstnost je v vseh ekosistemih pomembna za vzdrževanje stabilnosti in učinkovitosti le-teh. V kolikor je mikrobna raznovrstnost človeka zmanjšana, lahko vodi do razvoja bolezni, kot so avtizem, gastrointestinalne bolezni in debelost. Pri športnikih in aktivnih osebah je raznovrstnost črevesne mikrobne združbe signifikantno večja kot pri manj aktivnih osebah podobne telesne zgradbe, spola in starosti (Clarke in sod., 2014).

1.1 NAMEN DELA

Prehod iz aktivnega v negibljivi način življenja v večini primerov povzroči spremembe v fiziologiji človeka v zelo kratkem času, zaradi česar pride do sprememb v kosteh, mišični masi, delovanju srca, hidrostatskih tlakih in delovanju prebavnega trakta (Agostini in sod., 2008; Berg in sod., 2007; Eiken in sod., 2008; Iovino in sod., 2013; Thijssen in sod., 2010; Biolo in sod., 2008). Na spremembe v sistemu se odzovejo tudi mikrobne združbe, navkljub kontrolirani prehrani (Stres in sod., 2014).

S primerjalno analizo rezultatov hitrih tipizacijskih tehnik gena za 16S rRNA bakterijskih mikrobnih združb fekalnih vzorcev prostovoljcev v kontroliranem eksperimentu skozi čas ter parametrov okolja smo nameravali opisati razlike med začetnim in končnim stanjem skupine prostovoljcev ene od vej eksperimenta PlanHab ter ugotoviti, kateri dejavniki okolja so najbolj povezani z eksperimentom ter spremembami v strukturi mikrobne združbe.

1.2 CILJI IN HIPOTEZE

Opredeliti časovno dinamiko mikrobnih združb v vzorcih fecesa pred in po prenehanju gibanja in ugotoviti, kako sprememba gibanja vpliva na spremembo mikrobiote prebavnega trakta ljudi v povezavi z izmerjenimi fiziološkimi podatki prostovoljcev.

Postavili smo dve hipotezi raziskave:

H₁: Sprememba gibanja vpliva na fizikalno-kemijske lastnosti mikrobnega okolja.

H₂: Sprememba gibanja povzroči spremembo mikrobiote prebavnega trakta ljudi.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 OPIS RAZISKAVE »PLANETARY HABITAT SIMULATION«

2.1.1 Splošno o Planetary Habitat Simulation (PlanHab)

Magistrska naloga predstavlja del analiz, opravljenih v sklopu FP7 EU projekta PlanHab (PI prof. Igor Mekjavič, IJS). Cilj projekta je bil proučiti vpliv hipoksije in mirovanja na fiziologijo človeka, v sklopu raziskav o tem, kako poteka dekondicioniranje človeškega telesa, ki so mu izpostavljeni astronauti v času poletov ter navadni zemljani v času neaktivnosti in boleznih. Dolgotrajno ležanje v postelji je pogosto uporabljena metoda raziskovalnih skupin NASA in ESA za simulacijo nekaterih bioloških učinkov, ki nastanejo zaradi zmanjšane gravitacije in so potencialno nevarni za astronaute. Ker bo v bodočih planetarnih habitatih parcialni tlak kisika nižji kot atmosferski tlak (do cca 1000 m n.m.v.), je potrebno proučiti tudi, kakšen vpliv ima le-ta oz. kakšne skupne efekte imata dolgotrajna zmanjšana gravitacija in hipoksija na zdravje, varnost in zmogljivost astronautov.

Po drugi strani pa je ta raziskava pomembna tudi z medicinskega stališča predvsem za paciente, ki zaradi respiratornih težav ob kronično zmanjšani fizični aktivnosti živijo v konstantni hipoksiji (recimo kronična obstruktivna pljučna bolezen) (European Commission, 2014; Debevec in sod., 2014a).

2.1.2 Ozadje raziskave

Leta 2004 je predsednik ZDA objavil novo vizijo vesoljskih raziskav, ki naj bi bile usmerjene v človeške misije na luno in Mars. Iz tega razloga so se nekatere države z aktivnim vesoljskim programom usmerile v ustvarjanje človeških kolonij na luni in končno tudi na Marsu. Pred tem je seveda potrebno opraviti ogromno različnih preiskav, med katere sodi tudi vpliv različnih razmer življenja na zdravje, varnost in učinkovitost pri delu. V kolonijah bi osebe živele v habitatih z zmanjšanim parcialnim tlakom kisika, saj bi to omogočalo večjo varnost iz tehnološkega kot tudi medicinskega stališča, ker bi s tem zmanjšali tveganje za pojav dekompresijskih boleznih pri izvajanju aktivnosti zunaj habitatov (European Commission, 2014; Debevec in sod., 2014a).

2.1.3 Struktura raziskave

Raziskovanje je potekalo v Olimpijskem športnem centru Planica v Sloveniji, ki ima vso potrebno infrastrukturo za tovrstne kontrolirane raziskave, vključno z laboratorijem, opremo za vzdrževanje določenega parcialnega tlaka kisika ter kontrolnimi sistemi, ki brez prestanka preprečujejo zmanjšanje koncentracije kisika pod kritično mejo zadušitve. V raziskavi je sodelovalo 14 zdravih moških. Vse osebe so skozi celotno raziskavo bodisi

mirovale v postelji ali pa so imele omejeno gibanje na področje znotraj objekta, kjer je bil vzdrževan ustrezen parcialni tlak kisika. Raziskava je bila razdeljena v tri kampanje, ki so trajale po 32 dni in so bile razdeljene v tri faze. Prva faza prilagajanja (Faza I; »Run-in«) je bila dolga 7 dni. V tem času so se udeleženci navajali na novo okolje, predpisano prehrano in cirkadiane ritme, in je služila za določanje bazne linije parametrov humane fiziologije ter stanja telesa. Tej fazi je sledilo 21 dni poskusa (Faza II) in na koncu še 4 dni kontroliranega okrevanja (Faza III), ki je bilo po potrebi podaljšano glede na medicinsko sliko in predlog kontrolnega zdravnika v eksperimentu (Slika 1) (European Commission, 2014; Debevec in sod., 2014a).

Dve osebi sta sodelovali samo v prvih dveh kampanjah (iz osebnih razlogov se nista udeležili tudi tretje), tretja oseba je tretjo kampanjo zapustila zaradi gastrointestinalnih težav. Na koncu je ostalo 11 oseb. Vsak dan sta dve osebi začeli z določenim poskusom. V vsaki kampanji so osebe sodelovale v enem od poskusov:

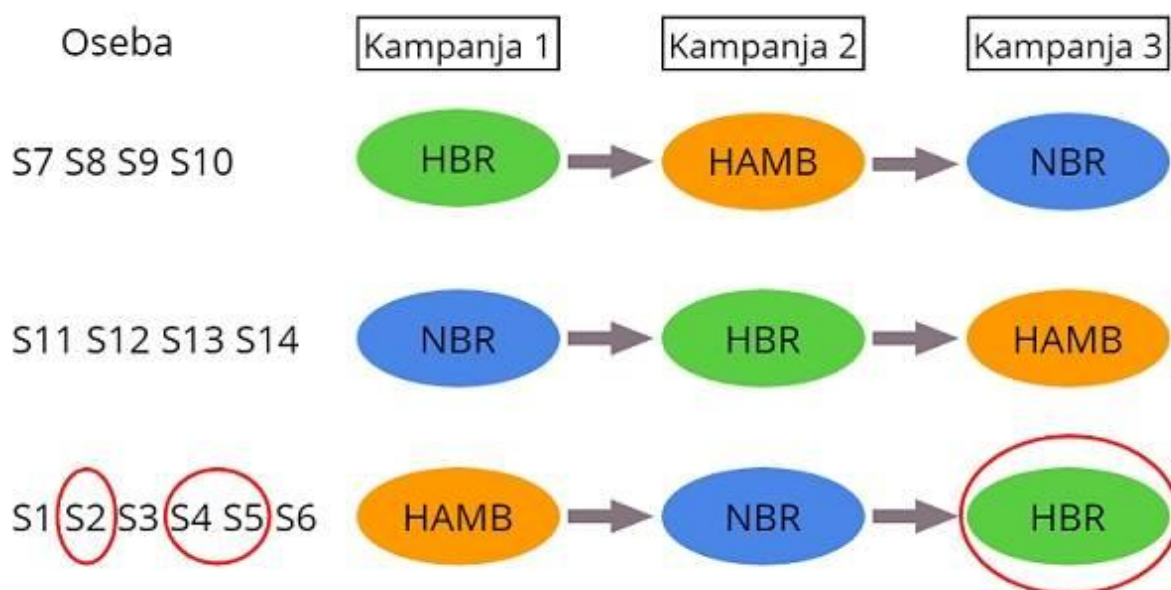
- a) Hipoksično mirovanje (HBR) – razmere: horizontalno mirovanje v postelji (vse aktivnosti so bile izvajane v horizontalnem položaju – vključno s tuširanjem) pri 12.5 kPa O₂ (tlak pri 4000 m nadmorske višine)
- b) Normoksično mirovanje (NBR) – razmere: horizontalno mirovanje v postelji (vse aktivnosti so bile izvajane v horizontalnem položaju – vključno s tuširanjem) pri 21 kPa O₂
- c) Hipoksično gibanje (HAMB) – razmere: gibanje znotraj objekta pri 12.5 kPa O₂

Vse osebe so sodelovale v vseh treh kampanjah, vendar so bile v vsaki kampanji del drugega poskusa (Slika 2). Med kampanjami so osebe imele 4 mesečno pavzo (»Wash-out«) (European Commission, 2014; Debevec in sod., 2014a).

Vse okoljske razmere (temperatura, vlažnost, tlak) so bile strogo kontrolirane. Vsi udeleženci so imeli po meri narejene, kontrolirane in standardizirane jedilnike skozi vse tri kampanje, ki so se med dnevi razlikovali, vendar pa so bili na isti dan kampanje enaki. Tako je bilo zagotovljeno, da so preiskovanci imeli skozi celotno kampanjo enako zaporedje standardiziranih jedilnikov, s čimer je bil zagotovljen tudi vpogled v količino in karakteristične spremembe prehranskih navad zaradi izpostavitve drugačnim okoljskim razmeram (Debevec in sod., 2014a).



Slika 1: Časovni potek kampanje. Pod črtami so napisani dnevi posamezne faze. Z rdečo obkroženi dnevi so tisti, katere smo planirali uporabiti pri naši raziskavi. Faza I: »Run-in«, obdobje privajanja in sinhronizacije; Faza II: »Experiment«, Faza III: okrevanje pod medicinskim nadzorom in odhod v domačo oskrbo ter vsakdanje življenje.



Slika 2: Struktura raziskave. Z rdečo so obkroženi preiskovanci in poskus, katerih vzorce smo uporabili v naši raziskavi.

2.2 GASTROINTESTINALNI TRAKT

2.2.1 Črevesje in črevesna mikrobiota

Znotraj človeškega gastrointestinalnega trakta (GIT) je približno $1 \cdot 10^{13}$ - $1 \cdot 10^{14}$ mikroorganizmov (MO), kar je desetkrat več kot somatskih celic v celem telesu (Conlon in Bird, 2014; Ling in Xiang, 2011). Večino mikroorganizmov predstavljajo bakterije, vendar so lahko prisotne tudi kvasovke, enocelični evkarionti, virusi in manjši parazitski črvi. Število, tip in funkcija mikroorganizmov se spreminjajo vzdolž GIT v odvisnosti od lastnosti in funkcije GIT na določenem mestu. Večina MO se nahaja v debelem črevesju, kjer sodelujejo pri depolimerizaciji kompleksnih organskih snovi. Z lastnimi encimi dodatno razgrajujejo kompleksne rastlinske ostanke in vršijo fermentacijo na površini še neprebavljenih delcev hrane, predvsem vlaknin in ogljikovih hidratov, ter s tem vplivajo na strukturo blata (Conlon in Bird, 2014). Čeprav je raznolikost na nivoju debela ali družine

mikroorganizmov znotraj GIT zelo velika, se vseeno pojavljajo določeni trendi. Dominantna bakterijska debla v prebavilih so Bacteroidetes (~20-25 %) Firmicutes (~60-65 %), Proteobacteria (~5-10 %), Actinobacteria (~3 %) in ostali (Preglednica 1) (Rosenbaum in sod., 2015). Najpogostejši rodovi bakterij, ki jih najdemo v GIT, so *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Streptococcus* in *Ruminococcus*. Pri približno 50 % preiskanih ljudi so v prebavilih zaznali tudi arheje, ki proizvajajo metan (Conlon in Bird, 2014).

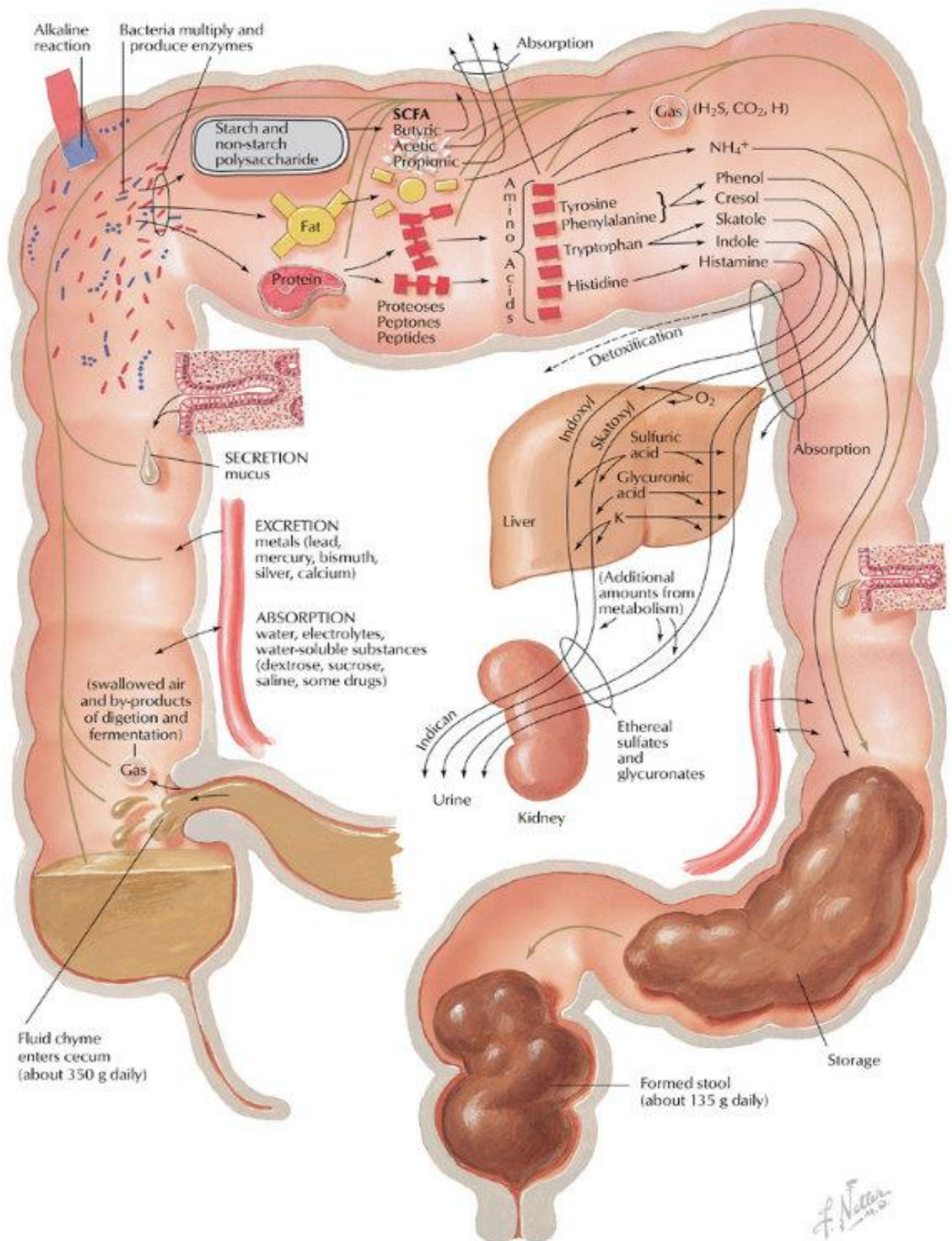
Mikrobiota prebavnega trakta je sestavljena predvsem iz anaerobnih mikroorganizmov – teh je za 2 do 3 velikostne razrede več kot aerobov in fakultativnih anaerobov (Walsh in sod., 2014). Vsaka oseba ima lahko več 100 različnih mikrobnih vrst v GIT, medtem ko je znotraj celotne človeške populacije prisotno na tisoče različnih mikroorganizmov, kar kaže na izredno veliko raznolikost v sestavi mikrobiote med osebki (Human Microbiome Project Consortium in sod., 2012; Huse in sod., 2012). Le-ta se sinhronizira znotraj družine (Schloss in sod., 2014) in fizičnega področja, kjer skupina ljudi prebiva (Lax in sod., 2014). Kljub temu je spekter mikrobnih genov za osnovne metabolne funkcije zelo podoben med posamezniki (Conlon in Bird, 2014). To pomeni, da je taksonomska variabilnost v človeškem GIT veliko večja kot funkcionalna raznolikost in da različno sestavljene mikrobne združbe lahko opravljajo iste funkcije (Rosenbaum in sod., 2015). Iz tega lahko sklepamo, da je funkcionalnost črevesne mikrobiote veliko bolj pomembna kot sama taksonomska sestava MO.

Funkcije in poti, po katerih jih izvaja mikrobiom jedrne združbe (MO, ki so zadolženi za osnovne metabolne funkcije, prisotne pri vseh osebah), imajo pozitivni vpliv na gostitelja in so esencialni za normalno delovanje prebavil. Nekatere koristne funkcije mikroorganizmov v črevesju so: zaščita pred patogeni, razgradnja polisaharidov, proizvodnja esencialnih vitaminov, stimulacija angiogeneze, regulacija shranjevanja maščob in modulacija gostiteljevega imunskega sistema.

Novejše raziskave so pokazale, da črevesna mikrobiota vpliva na povezavo črevesje-možgani in da vpliva na simptome, povezane s stresom, kot sta anksioznost in toleranca za bolečino (Walsh in sod., 2014). Porušenje ravnotežja populacije mikroorganizmov v črevesju vpliva na razvoj različnih bolezni, kot so sindrom razdražljivega črevesja, debelost, diabetes tipa 2, kardiovaskularne bolezni in druge (Conlon in Bird, 2014; Ling in Xiang, 2011). Pri osebah z visoko telesno težo pride do sprememb v koncentraciji in raznolikosti metabolnih funkcij črevesne mikrobiote, kar se odraža v spremenjenem razmerju med pripadniki skupin bakterij iz debel Firmicutes in Bacteroidetes (Rahat-Rozenbloom in sod., 2014). Te osebe imajo manjšo raznolikost mikrobne združbe v primerjavi z osebami brez problemov s težo, a vseeno večjo mikrobno raznolikost v primerjavi z osebami z diabetesom tipa 2 (Remely in sod., 2014).

Preglednica 1: Struktura in funkcija bakterijske združbe črevesja (Rosenbaum in sod., 2015).

Debilo	% Mikrobioma	Rodovi in vrste	Funkcija	Vir
Firmicutes	~60-65 %	<i>Clostridium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Faecalibacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Roseburia</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Streptococcus</i>	Fermentacija vlaknin do butanojske kisline Simbioza Patogeneza	
Bacteroidetes	~20-25 %	<i>Alistipes</i> <i>Bacteroides</i> <i>Parabacteroides</i> <i>Prophyromonas</i> <i>Prevotella</i>	Razgradnja polisaharidov Fermentacija vlaknin do butanojske kisline	Prehrana, bogata s proteini
Proteobacteria	~5-10 %	<i>Escherichia coli</i>		
Actinobacteria	~3 %	<i>Bifidobacterium</i> <i>Colinsella</i>	Biosinteza vitaminov	Pogosti probiotiki
Deferribacteres	<1 %		Razgradnja železa	Povečanje črevesnih krvavitev
Fusobacteria	<1 %	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Vnetni črevesni tumorski faktor	Povečanje mesne prehrane
Melainabacteria	<1 %		Sinteza vitamina B in K Fermentacija ogljikovih hidratov do etanola, laktata in formata	Povečanje rastlinske prehrane
Spirochaetes	<1 %	<i>Treponema</i>		Bolj pogoste na ruralnih področjih in pri prehrani, bogati z vlakninami
Verrucomicrobia	<1 %	<i>Akkermansia muciniphilla</i>	Razgradnja mucina Zmanjšanje vnetja Povečanje debeline mukoznega sloja črevesne sluznice	



Slika 3: Prikaz debelega črevesja in procesov (Netter, 2016). Prevodi posameznih oznak se zaradi jasnosti nahajajo na naslednji strani v Preglednici 2.

Preglednica 2: Prevod angleških izrazov Slike 3.

Angleški izrazi	Slovenski izrazi
Fluid chyme enters cecum (about 350 g daily)	Želodčni sokovi vstopijo v slepo črevo (približno 350 g dnevno)
Swallowed air and by-products of digestion and fermentation	Pogoltnjen zrak in stranski produkti prebave in fermentacije
Gas	Plin
ABSORPTION water, electrolytes, water-soluble substances (dextrose, sucrose, saline, some drugs)	ABSORPCIJA voda, elektroliti, vodotopne substance (dekstroza, saharoza, soli, nekatera zdravila)
EXCRETION metals (lead, mercury, bismuth, silver, calcium)	EKSKRECIJA kovine (svinec, živo srebro, bizmut, srebro, kalcij)
SECRETION mucus	SEKRECIJA mukusa
Alkaline reaction	Alkalna reakcija
Bacteria multiply and produce enzymes	Bakterije se razmnožujejo in tvorijo encime
Starch and non-starch polysaccharide	Škrobni in ne-škrobni polisaharidi
Fat	Maščobe
Protein	Proteini
SCFA butyric, acetic, propionic	HMK butanojska, etanojska in propanojska kislina
Proteoses, Peptones, Peptides	Produkti razgradnje proteinov, Peptoni, Peptidi
Absorption	Absorpcija
Amino Acids – tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine	Amino kisline - tirozin, fenilalanin, triptofan, histidin
Phenol, Cresol, Skatole, Indole, Histamine	Fenol, kresol, skatol, indol, histamin
Detoxification	Razstrupljanje
Liver – indoxyl, skatoxyl, sulfuric acid, glycuronic acid	Jetra – indoksil, skatoksil, žveplova kislina, glukuronska kislina
Additional amounts from metabolism	Dodatne količine iz metabolizma
Kidney – indican, urine	Ledvica – indikan, urin
Ethereal sulfates and glycuronates	Estri žveplove kisline in glukuronat
Storage	Shramba
Formed stool (about 135 g daily)	Formirano blato (približno 135 g na dan)

2.2.2 Tipizacija mikrobne združbe črevesja

V začetkih razvoja mikrobiologije je le-ta temeljila na izolaciji in karakterizaciji čistih kultur. Sčasoma so se raziskovalci začeli zavedati, da so za bolj natančno karakterizacijo dinamike in strukture mikrobnih združb potrebne nove metode. Tako je prišlo do razvoja metod kot so poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE), poliakrilamidna gelska elektroforeza v časovnem temperaturnem gradientu (TGGE), analiza dolžinske heterogenosti z verižno reakcijo s polimerazo (LH-PCR) in polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP) (Stres, 2006; Moreno in sod., 2011). Te metode omogočajo profiliranje mikrobne združbe brez sekvenciranja velikih klonskih knjižnic. Z uporabo le-teh pa ne moremo ugotavljati, kateri organizem je v vzorcu, kakor tudi ne dobimo filogenetske informacije. S temi metodami ugotavljamo le spremembo strukture mikrobne združbe ali pa primerjamo združbe (Mills in sod., 2007).

Večina molekularnih metod, ki jih uporabljamo za tipizacijo mikrobnih združb, temelji na genih, ki kodirajo ribosomalno RNK (Tiirola in sod., 2003). Za razliko od metode T-RFLP, ki identificira razlike v dolžini fragmentov PCR na podlagi variabilnosti restrikcijskega mesta, LH-PCR izkorišča hipervariabilnost v dolžini sekvenc različnih domen znotraj 16S rDNK, ki so pri bakterijah ubikvitarni (Moreno in sod., 2011; Ritchie in sod., 2000). To pomeni, da LH-PCR ločuje različne organizme na podlagi razlik v dolžini sekvenc 16S rDNK (Ritchie in sod., 2000).

LH-PCR je enostavna, hitra in ponovljiva metoda, ki jo uporabljajo za tipizacijo mikrobnih združb (Ritchie in sod., 2000). To metodo so že uporabili za ugotavljanje strukture mikrobnih združb v tleh, za proučevanje sprememb združb bakterioplanktonov kot posledice dodajanja različnih hranil ter za ugotavljanje vira fekalnih onesnaženj v obalnih vodah (Ritchie in sod., 2000; Moreno in sod., 2011; Tiirola in sod., 2003).

Prvi korak LH-PCR je uspešna izolacija DNK (Mills in sod., 2007). Temu sledi pomnoževanje variabilnih regij s PCR, pri katerem uporabimo fluorescenčno označene univerzalne začetne oligonukleotide. Namnožene fragmente ločimo z elektroforezo in odkrivamo z avtomatskim genskim sekvenatorjem. Ta z laserjem vzbudi fluorokrome in ti začnejo emitirati svetlobo, ki jo zazna kamera (Biocompare, 2007; Ritchie in sod., 2000). Podatke o fluorescenci analizator spremeni v elektroferograme. Vrhovi elektroferograma predstavljajo fragmente različnih velikosti, površina vrhov predstavlja relativni delež fragmenta. Dolžino fragmentov (v baznih parih) preračuna programska oprema na podlagi uporabljenega standarda (Ritchie in sod., 2000). Analizator zazna samo označene fragmente (Abdo in sod., 2006).

Dolžine posameznega pomnožka lahko primerjamo s sekvencami klonskih knjižnic, s čimer lahko dobimo omejeno filogenetsko informacijo. Moramo pa biti previdni, saj so fragmenti istih dolžin lahko prisotni pri različnih taksonih (Mills in sod., 2007).

2.3 VPLIV RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA STRUKTURO ČREVESNE MIKROBIOTE

2.3.1 Mikrobni metaboliti povezani z zdravjem človeka

Mikroorganizmi so v gastrointestinalnem traktu zmožni proizvodnje širokega spektra metabolitov. Ta je odvisna od številnih dejavnikov, kot so dostopnost hranil in dejavniki okolja. Predvsem je pomemben pH. Mikrobne metabolite lahko uporabijo gastrointestinalna tkiva ali pa druga tkiva, do katerih pridejo metaboliti s transportom po krvi, ali pa se izločijo z urinom in izdihovanjem. Fermentacija vlaknin in proteinov v debelem črevesu proizvede velike količine fiziološko zelo pomembnih produktov – kratkoveržnih maščobnih kislin (KVMK) oz. hlapnih maščobnih kislin (HMK) (Conlon in Bird, 2014). Po drugi strani so produkti fermentacije beljakovin, kot so amonijak, fenoli in vodikov sulfid, lahko tudi toksični. Nekatere bakterije proizvajajo tudi vitamine (K, B12, biotin, folat), encime, pomembne za razgradnjo nutrientov, kot so kompleksni polisaharidi, biološko aktivne lipide, vključno z lipopolisaharidi (LPS), ki lahko povzročajo vnetja, toksine in pline (metan, vodik, vodikov sulfid). Lahko tudi presnavljajo produkte gostiteljevega metabolizma, kot so mucin in drugi kompleksni izločki, ter pretvarjajo žolčne kisline v sekundarne derivate, ki so v določenih razmerjih tudi škodljivi. (Conlon in Bird, 2014).

2.3.1.1 HMK

HMK predstavljajo vir energije za kolorektalna tkiva in črevesne bakterije ter promovirajo celične mehanizme, ki vzdržujejo celovitost tkiv (Conlon in Bird, 2014). Poleg tega, da služijo kot vir energije, imajo HMK tudi pomembno vlogo kot signalne molekule pri glukoneogenezi in adipogenezi (Lin in sod., 2012). Proizvajanje HMK poteka v debelem črevesju z razgradnjo ogljikovih hidratov (poli, oligo in frukto-oligosaharidov), proteinov in peptidov. Od teh je najbolj pomembna fermentacija ogljikovih hidratov (Richards in sod., 2016; Remely in sod., 2014). Približno 10 % potrebnih kalorij človek dobi z absorpcijo HMK, ki jih proizvedejo mikroorganizmi debelega črevesa (Gilbert, 2008). Najvišja koncentracija HMK je v proksimalnem delu debelega črevesa (~100 mM). Etanojska, propanojska in butanojska kislina (lahko jim rečemo acetat, propionat in butirrat, saj je 95 % HMK v črevesju v anionski obliki) predstavljajo 90 % vseh HMK v približnem razmerju 65:20:15 (Conlon in Bird, 2014; Rahat-Rozenbloom in sod., 2014). Butanojsko kislino kot vir energije uporabijo kolonocite, propanojsko kislino primarno uporabijo jetra, etanojska kislina pa pride v krvni obtok in potuje v periferna tkiva in jetra (Lin in sod., 2012; Conlan in Bird, 2014). Proizvodnja HMK je odvisna od prisotne mikrobiote, vrste

substrata in črevesnega tranzicijskega časa (Wong in Jenkins, 2007; Mårtensson in sod., 2002). Koncentracija celotnih HMK v blatu ter etanojske, propanojske, izopentanojske in pentanojske kisline narašča s povečanim zauživanjem ogljikovih hidratov. Visoko proteinska prehrana z malo ogljikovih hidratov kot tudi prehrana z veliko maščobe in manj ogljikovih hidratov vpliva v smeri znižanja koncentracijo HMK v blatu (Dao in sod., 2015). Povečana produkcija HMK je povezana z znižanjem pH, kar zmanjša možnost okužbe z nekaterimi patogeni, z zmanjšano topnostjo žolčnih kislin, s povečano absorpcijo mineralov in z zmanjšano absorpcijo amonijaka (Wong in Jenkins, 2007).

Bakterije, ki proizvajajo butanojsko kislino, se nahajajo v debelem črevesju. Butanojska kislina je pomembna, ker vzdržuje homeostazo črevesja in integriteto epitelija, saj je osnovni vir energije kolonocit. Direktno vpliva na regulacijo genske ekspresije z inhibicijo histonske deacetilaze in moti delovanje nekaterih vnetnih signalov, kot je NF- κ B. Butanojska kislina nastane z razgradnjo kompleksnih polimerov, kot sta škrob in ksilan, po poti actil-KoencimA, vendar lahko nastane tudi iz proteinov, recimo po poti lizina. To nakazuje na zmožnost adaptacije mikroorganizmov na različna hranila za sintezo istega ključnega metabolita - butanojske kisline (Vital in sod., 2014). Butanojska in propanojska kislina regulirata izločanje črevesnih hormonov in zavirata razvoj debelosti, ki nastane zaradi prehrane (Lin in sod., 2012). Prehrana, bogata z nefermentabilnimi substrati (kot je recimo celuloza), vpliva na zmanjšano produkcijo propanojske kisline (Weitkumat in sod., 2015).

Pri zaprtih osebah pride do spremembe v koncentraciji HMK. Tako so Kang in sod. (2015) izmerili značilno višjo koncentracijo izobutanojske kisline (HMK, ki nastane z razgradnjo proteinov) pri zaprtih osebah v primerjavi z zdravimi osebami. Prisotnost izobutanojske kisline v blatu je posledica razgradnje proteinov, ki so se izognili razgradnji v tankemu črevesju in so prispeli v debelo črevo, kot tudi proteinov iz endogenih virov, kot so mucin, bakterijski lizati in citoplazmatska vsebina odmrlih epiteljskih celic (Kang in sod., 2015). Koncentracije HMK v blatu oseb s prekomerno telesno težo so višje kot pri osebah brez teh problemov, kar je lahko posledica povečanega vnosa hrane ali pa večje aktivnosti določenih mikrobnih skupin (Salazar in sod., 2015).

2.3.2 Vpliv pH na črevesno mikrobioto

Gastrointestinalni pH ima pomembno vlogo pri absorpciji vitaminov in elektrolitov in vpliva na aktivnost encimov razgradnje (Osuka in sod., 2012). Zdrave osebe imajo pH zgornjega debelega črevesa $7,05 \pm 0,32$, srednjega debelega črevesa $7,42 \pm 0,51$ in spodnjega debelega črevesa $7,15 \pm 0,44$ (Wilson, 2010). Normalne vrednosti pH v blatu so med 6 in 7,2. (Osuka in sod., 2012). pH v splošnem zelo vpliva na rast črevesnih bakterij, podobno kot je eden glavnih regulatorjev tudi v drugih sistemih (tla, rumen). Različni mikrobní sevi vršijo svoje aktivnosti pri njim lastnih optimalnih vrednostih pH, zato posledično nekoliko

različen pH vodi v obstoj bolj specifičnih mikrobnih niš znotraj prebavil. Po drugi strani tudi bakterije s svojimi metabolnimi produkti (kot so HMK) vplivajo na spremembo oz. znižanje pH. Mikrobove debelega črevesja zato lahko v skladu z veljavnimi principi bioloških sistemov razdelimo na generaliste, ki tolerirajo širok spekter pH, in specialiste, ki rastejo in so aktivni samo pri določenem pH, vendar imajo večjo hitrost rasti (Kettle in sod., 2014). Tako tudi kratkoročna in dolgoročna prehrana, poleg mikrobnih metabolitov, vpliva na spremembo pH, saj uživanje hrane s težje razgradljivimi ogljikovimi hidrati vpliva na povečano koncentracijo HMK (etanojske, propanojske in butanojske kisline) in s tem na znižanje pH v sistemu (Balamurugan in sod., 2014).

Osebe z alkalnim blatom (pH nad 7.2) imajo značilno manjšo vsebnost *Bacteroidaceae*, *Bifidobacterium* sp. in *Enterobacteriaceae* v primerjavi z zdravimi osebami. Osebe s kislim blatom imajo značilno manjšo vsebnost *Bacteroidaceae*, *Bifidobacterium* sp., ne pa tudi *Enterobacteriaceae*. Alkalno blato je na splošno slabše kot rahlo kislo, saj nizek pH zavira rast patogenov, ki preferirajo nevtralni pH, in spodbuja rast koristnih bakterij. Ko pride do porušitve normalne mikrobiote, pride do zmanjšanja števila dobrih bakterij, kar povzroči povečanje fekalnega pH nad 7,2 in s tem omogoči razvoj škodljivih bakterij. Te proizvajajo mlečno in jantarno kislino, ki znižata fekalni pH in poškodujeta črevesni epitelij. Poškodovani epitelij ne more absorbirati laktoze, zaradi česar se pH zniža pod 5 (Osuka in sod., 2012).

2.3.3 Vpliv makronutrientov na črevesno mikrobioto

Debelo črevo odrasle osebe ima približno 500 g vsebine, ki je v velikem deležu sestavljena iz bakterij. Na dan se z blatom odvede 100 g vsebine. Tipična zahodnjaška dieta oskrbi bakterije s približno 50 g/dan fermentabilnih substratov, večinoma dietnih vlaknin. Neškrobni polisaharidi so pomembne sestavine dietnih vlaknin in predstavljajo 20-40 % suhe snovi, ki pride v debelo črevo. Enostavni sladkorji in oligosaharidi predstavljajo 10 %, škrob in produkti hidrolize škroba pa 8 % suhe snovi. Nekateri alkoholni sladkorji lahko zapustijo tanko črevo in so v manjši meri tudi substrati za mikroorganizme debelega čreva. Dnevno pride v proksimalni del debelega čreva približno 5-15 gramov proteinov in 5-10 gramov lipidov. Polifenoli, katehini, lignini, tanini in mikronutrienti so tudi lahko vir hranil za mikroorganizme (Conlon in Bird, 2014). Nekateri polifenoli in mikronutrienti vstopajo v kri in delujejo kot antioksidanti v gostitelju. Poleg hrane predstavljajo pomemben vir energije/hrane za mikrobovo rast glikani mukusa oz. črevesne sluzi gostitelja (Vital in sod., 2014).

2.3.3.1 Organske spojine in celokupni topni organski ogljik (CTOO)

Topni organski ogljik je frakcija topnih organskih spojin z velikostjo od 0,22 do 0,45 μm . Eden največjih rezervoarov CTOO na Zemlji so vodene površine. CTOO nastaja kot

rezultat razkroja neživega organskega materiala, kot so recimo rastline. Raztopljene organske spojine so pomemben vir hrane za mikroorganizme in imajo ključno vlogo pri kroženju ogljika skozi mikrobno zanko (Allen, 1976; Zhang, 2013). Le-te lahko s frakcionacijo razdelimo glede na njihovo molekulsko težo na CTOO z visoko molekulsko maso (>1 kDa) in CTOO z nizko molekulsko maso (<1 kDa) (Allen, 1976; Helms in sod., 2008). Organske spojine z večjo molekulsko maso so fulvične in huminske kisline. Organske spojine z nižjo molekulsko maso so proteini, ogljikovi hidrati in organske kisline. Kemijska sestava in biološka reaktivnost CTOO se modificira z mikrobno izrabo in predelavo. S tem nastajajo majhne raztopljene organske spojine, ki so odporne proti nadaljnji razgradnji in porabi s strani mikroorganizmov. Ena od glavnih karakteristik organskih mešanic je kompleksnost in le-to lahko razdelimo na kompozicijsko in strukturno. Med kompozicijske razlike štejemo število različnih kombinacij atomov, ki naredijo molekulo, med strukturne razlike pa štejemo kemijske ureditve atomov v molekularnem okolju, kot so funkcijske skupine in izomeri (Lechtenfeld in sod., 2015).

Pomembne topne organske spojine, ki jih MO v črevesju uporabljajo kot vir ogljika in energije, so predvsem ogljikovi hidrati in proteini (Conlon in Bird, 2014; Eswaran in sod., 2013; Macfarlane in Mcbain, 1999).

2.3.3.1.1 Ogljikovi hidrati (OH)

OH so kemijske komponente, sestavljene iz ogljika, vodika in kisika. V človeški prehrani igrajo ključno vlogo, saj služijo kot glavni vir energije ter imajo druge pozitivne učinke, ki omogočajo telesu, da opravlja osnovne funkcije (Donato-Capel in sod., 2014).

Na splošno so mikroorganizmi v črevesju zmožni hidrolize mnogih nutrientov, zlasti kompleksnih polisaharidov (Conlon in Bird, 2014). To jim med ostalimi omogočajo številne glikozidne hidrolaze in liaze, ki preferenčno delujejo na bolj dostopne strukturne in rezervne polisaharide (v primerjavi z gostiteljevimi glikani) (Gilbert 2008). Velika večina bakterij debelega črevesja je saharolitičnih (Macfarlane in Mcbain, 1999), kar pomeni, da izrabljajo OH, ki so odporni na razgradnjo s človeškimi encimi in tiste, ki se niso absorbirali v tankem črevesju, kot osnovni vir energije ter jih razgradijo do HMK in plinov, pri čemer se ustvarja toplota (Conlon in Bird, 2014; Wong in Jenkins, 2007). S fermentacijo OH ustvarjajo mikroekologijo in fiziologijo debelega črevesja (Macfarlane in Mcbain, 1999). Različni MO debelega črevesja preferirajo različne OH kot vir energije. Razlike so prisotne na nivoju vrst in sevov (Macfarlane in Mcbain, 1999).

OH lahko razdelimo na (Cummings, 1997):

- Sladkorje (monosaharidi in disaharidi)
- Oligosaharide (α -glukani in ne- α glukani)
- Polisaharide (škrob in ne-škrobni polisaharidi).

Nekatere oligosaharide (ne- α glukane) in polisaharide uvrščamo med dietne vlaknine (glej 2.3.3.1.1.2) (Eswaran in sod., 2013).

2.3.3.1.1.1 Redukcijski sladkorji

Sladkorji so v splošnem pomenu sladke spojine, ki jih najdemo v hrani in pijači, vendar se pojavljajo tudi naravno v sadju, zelenjavi, mleku in medu. Enostavne sladkorje, kot so glukoza, fruktoza in galaktoza, imenujemo monosaharidi. Ko se dva enostavna sladkorja kovalentno povežeta, nastane disaharid, kot je saharoza, maltoza in laktoza (Baškan in sod., 2016). Med sladkorje v hrani uvrščamo samo monosaharide in disaharide (Codex Alimentarius Commission, 2015). Danes so diete usmerjene na zmanjševanje sladkorjev v prehrani, saj ima lahko njihovo prekomerno uživanje slabe učinke na zdravje (Baškan in sod., 2016).

Med redukcijske sladkorje uvrščamo vse sladkorje, ki imajo reducirajoče konce. To so vsi monosaharidi, večina oligosaharidov in nekateri glukozni polimeri, kot sta škrob in celuloza (Baškan in sod., 2016). Večino zaužitih OH razgradijo človeške amilaze in disaharidaze do monosaharidov, predvsem do glukoze, galaktoze in fruktoze. Te absorbirajo celice tankega črevesja. Po absorpciji se galaktoza in fruktoza pretvorita v glukozo, ki se bodisi uporabi v metabolizmu ali pa se shrani (Wright in sod., 2003).

Malabsorpcija sladkorjev je lahko pokazatelj kliničnih stanj, kot sta sindrom kratkega črevesja in diabetes, poslabšanih procesov razgradnje (slabše delovanje trebušne slinavke) ali spremenjenega delovanja transporterjev sladkorjev (Wright in sod., 2003; Nelson in Cox, 2011).

2.3.3.1.1.2 Dietna vlakna

Dietna vlakna definiramo kot ogljikove hidrate, ki imajo deset ali več monomernih enot, ki se ne hidrolizirajo z endogenimi encimi v tankem črevesju in sodijo v naslednje kategorije (Codex Alimentarius Commission, 2015):

- užitni OH, ki so naravno prisotni v hrani
- polimeri OH, ki so pridobljeni iz surove hrane s fizičnimi, encimskimi ali kemijskimi sredstvi in ki imajo dokazano pozitiven fiziološki efekt na zdravje
- sintetični polimeri OH, ki imajo dokazano pozitiven fiziološki efekt na zdravje.

Na splošno sprejeta definicija dietnih vlaknin je, da so to ogljikovi hidrati, ki se ne hidrolizirajo in absorbirajo v zgornjem delu gastrointestinalnega trakta (Eswaran in sod., 2013). Dietna vlakna igrajo zelo pomembno vlogo v prebavnem traktu, saj jih bakterije delno ali popolnoma fermentirajo do HMK in plinov, kot so ogljikov dioksid, vodik,

metan, amonijak in H₂S. Poleg tega imajo tudi druge pozitivne učinke na GIT (Priloga C) (Meier, 2009). Fermentacija vlaknin posredno vpliva na konsistenco blata s stimulacijo mikrobne rasti, kar poveča mikrobno biomaso, ali pa neposredno, saj omogoči zadrževanje vode v blatu. Fermentabilnost in topnost vlaknin je odvisna od njihove kemijske kompozicije. Lahko jih razdelimo glede na topnost in zmožnost fermentacije na (i) kratkoverižne ogljikove hidrate oz. vlakna (frukto-oligosaharidi in galakto-oligosaharidi, kot je rafinoza), ki so visoko fermentabilna, in (ii) dolgoverižna vlakna (Eswaran in sod., 2013).

Slednja razdelimo na: (i) topne in visoko fermentabilne neškrobne polisaharide (odporni škrob, pektin, inulin), (ii) srednje topna in fermentabilna vlakna (psyllium - sliva in oves), (iii) netopna in slabo fermentabilna vlakna (pšenični otrobi, lignin, sadje in zelenjava) ter (iv) netopna in nefermentabilna vlakna (celuloza, metilceluloza) (Eswaran in sod., 2013).

2.3.3.2 Proteini

Ljudje nismo sposobni sinteze številnih aminokislin in zato za vzdrževanje zdravja potrebujemo proteine, ki jih pridobimo s hrano. Kljub temu da večino proteinov iz hrane razgradijo encimi tankega črevesja, del proteinov vseeno pride v debelo črevo, kjer služi kot glavni vir dušika za mikroorganizme. Dušik MO potrebujejo za rast, asimilacijo OH in proizvodnjo za človeka koristnih metabolitov, kot so npr. HMK. S fermentacijo proteinov nastane veliko več različnih plinov in metabolitov v primerjavi s fermentacijo OH. Posledica povečanja z dušikom bogatih substratov je nastanek fermentacijskih produktov iz gnitja, kot so amonijak, vodikov sulfid, fenoli, tioli in indoli, ki so citotoksini, genotoksini in karcinogeni ter vplivajo na razvoj in napredovanje nekaterih bolezni, kot so kolorektalni rak ali kronična vnetna črevesna bolezen (Conlon in Bird, 2014).

2.3.3.3 Maščobe

Tudi maščobe vplivajo na sestavo in metabolno aktivnost črevesne mikrobiote. Prehrana z visoko vsebnostjo maščob poveča količino bakterijskih lipopolisaharidov v obtoku, saj poveča prepustnost črevesja. Ti so imunomodulatorji in povzročajo vnetja ter vplivajo na razvoj metabolnih bolezni. Maščobe lahko vplivajo na črevesno mikrobioto posredno preko žolčnih kislin, saj maščobe povečajo njihovo proizvodnjo v žolčniku in sproščanje v tanko črevo, zaradi česar se zviša tudi količina žolčnih kislin, ki jih sistem ne uspe ponovno privzeti in tako ostane na voljo za mikrobne transformacije v debelem črevesu. Mikrobiota v debelem črevesju iz le-teh proizvede sekundarne žolčne kisline, ki so potencialno kancerogene, saj je njihova prisotnost povezana z nekaterimi gastrointestinalnimi boleznimi (Conlon in Bird, 2014).

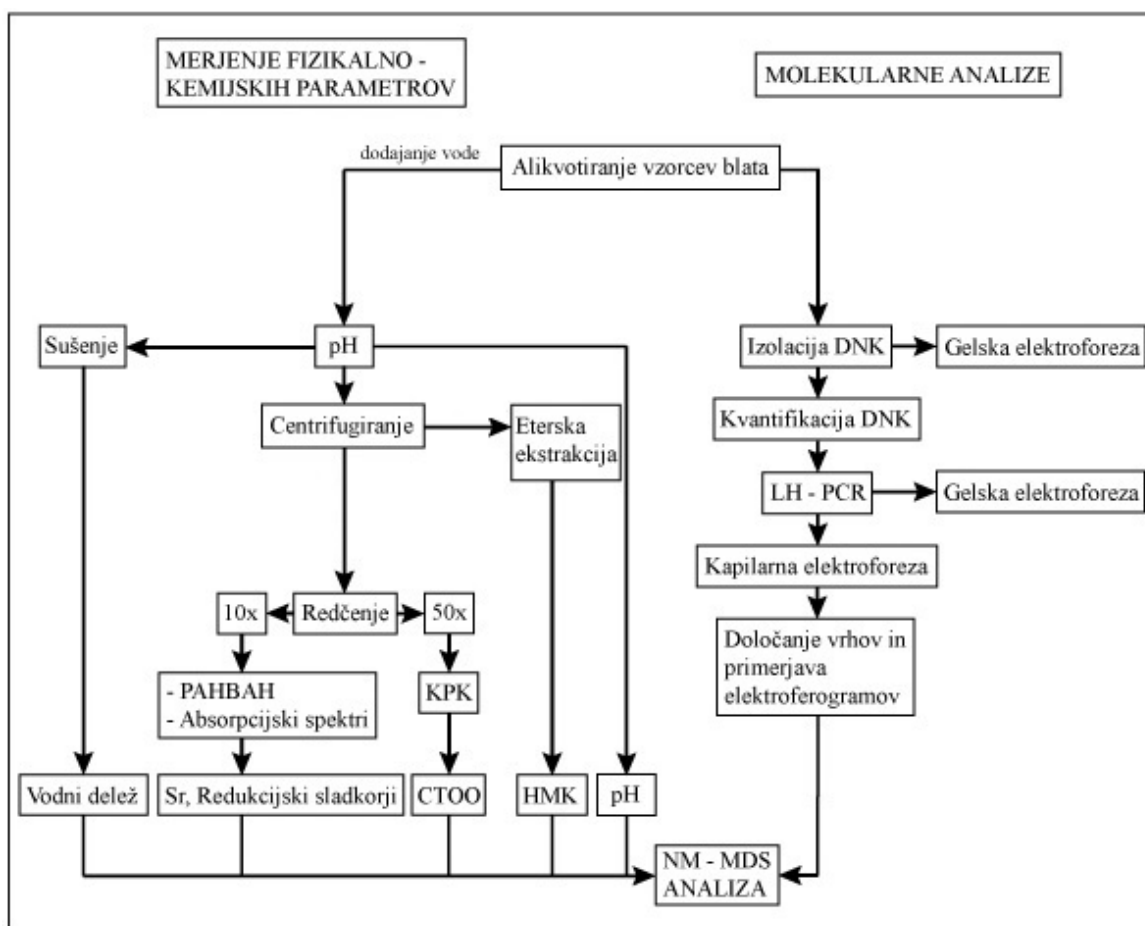
2.3.4 Vodni delež v blatu

Blato je sestavljeno iz vode, proteinov, nerazgrajenih maščob, polisaharidov, bakterijske biomase in nerazgrajenih delcev hrane (Rose in sod., 2015). Merjenje vsebnosti vode v blatu je pomemben pokazatelj uspešnosti razgradnje hrane (Jensen in sod., 1976). Povprečna vrednost vode v človeškemu blatu je 75 % in je v rangu med 63 in 86 %. Na leto vpliva prehrana, tranzicijski čas, starost, bolezni ter delovanje črevesja (Jensen in sod., 1976; Rose in sod., 2015). Absorpcija vode je povezana s črevesno peristaltiko kot tudi s pretokom krvi v GIT (Jensen in sod., 1976).

Vegetarijanska prehrana ima večjo vsebnost vode, zaradi česar je posledično delež vode v blatu vegetarijancev višji (povprečno 78,9 %) v primerjavi z osebami, ki se prehranjujejo s hrano z več proteinov in manj vlaknin. Le-ti imajo nižji vodni delež v blatu (povprečno 72,6 %). Osebe, ki imajo krajši tranzicijski čas, imajo povečano vsebnost vode v blatu in obratno. To pomeni, da imajo zaprte osebe, pri katerih se poveča tranzicijski čas, nižjo vsebnost vode v iztrebkih (Rose in sod., 2015). Spremenjena vsebnost vode v blatu je lahko pokazatelj prebavnih motenj, kot so driska, zaprtost in malabsorpcija (Jensen in sod. 1976).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SHEMA



Slika 4: Shema eksperimenta.

3.2 PROTOKOL DELA

Zamrznjene vzorce človeških fecesov, ki so bili odvzeti v sklopu projekta PlanHab, smo alikvotirali v 50 ml-falsonke. Uporabili smo vzorce treh oseb (S2, S4 in S5) iz tretje kampanje poskusa HBR (Slika 2). Od vsake osebe smo vzeli 6 vzorcev iz 6 različnih časovnih točk. Planirali smo, da bi imeli vzorce, odvzete v dneh -5, -1 (Faza I) in v dneh 3, 10, 18 in 21 (Faza II), saj bi tako zajeli začetne, sredinske, kot tudi pozne dneve eksperimenta. Ker pri vseh proučevanih osebah nismo imeli vseh načrtovanih vzorcev, smo izbrali tiste, ki so bili najbližje tem dnevom (Priloga A). Za vsak vzorec smo naredili tri ponovitve meritev (a,b,c). Na koncu smo imeli 54 vzorcev. Med delom smo orodje razkuževali z etanolom. Po tem smo alikvotirane po 2 g vzorca iz falsonk prenesli v 2 ml-mikrocentrifugirke (te vzorce smo uporabili za izolacijo DNK). V falsonke smo dodali 20

ml avtoklavirane destilirane vode in izmerili pH. Nato smo falkonke centrifugirali in 2 ml supernatanta prenesli v 15 ml-falkonke. Ostali supernatant smo prenesli v 1,5 ml-mikrocentrifugirke.

Vzorci v 15 ml-falkonkah smo uporabili za ekstrakcijo hlapnih maščobnih kislin. Supernatant iz mikrocentrifugirk smo redčili 10 krat, 50 krat in 100 krat. Redčitve smo uporabili za ugotavljanje redukcijskih sladkorjev celokupnega topnega organskega ogljika in indeksa molekulske mase. Vse vzorce smo shranjevali pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. 50 ml-falkonke smo prenesli v sušilnik in vsebino sušili do zračne suhosti pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iz pridobljenih rezultatov smo izračunali vodni delež.

Po izolaciji DNK iz treh alikvotov smo namnožili gen za 16S rRNA bakterij v sklopu profiliranja s tehniko LH-PCR. Pridobljene amplikone smo na podlagi velikosti ločili s kapilarno elektroforezo. Rezultate smo analizirali s programoma R in PAST.

3.3 IZMERJENI FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI V BLATU

3.3.1 Meritve pH

pH smo izmerili s pH metrom Eutech pH 700. Med vsako meritvijo smo pH meter dobro sprali z destilirano vodo.

3.3.2 Ugotavljanje velikosti topnih organskih spojin z merjenjem absorpcijskih spektrov

Lastnosti CTOO so zelo različne in so odvisne od njihovega vira in fizikalno-kemijskih parametrov okolja. Del raztopljenih organskih spojin oz. raztopljenega organskega ogljika, ki lahko absorbira ultravijolično in vidno svetlobo, imenujemo kromoforna ali obarvana raztopljena organska snov (KCTOO) (Helms in sod., 2008; Rochelle-Newall in Fisher, 2002).

Z znižanjem valovne dolžine se absorpcijski spekter KCTOO povečuje približno eksponencialno (Twardowski in sod., 2004). Za pridobivanje informacij o lastnostih KCTOO so v preteklosti uporabljali številne spektralne parametre, predvsem pa absorpcijska razmerja (Helms in sod., 2008). De Haan in De Boer (1987) sta za spremljanje relativne velikosti raztopljenih organskih spojin uporabila razmerje absorpcij pri 250 in 365 nm ($E_2:E_3$). S povečanjem molekulske mase se razmerje zmanjša, saj molekule z večjo molekulsko maso boljše absorbirajo svetlobo pri višjih valovnih dolžinah (Helms in sod., 2008). Spektralni nagib (S) je parameter, ki so ga uporabljali za dodatno opisovanje parametrov raztopljenih organskih spojin. Pridobili so ga iz enačbe (1) kjer je

$a(\lambda)$ Naipierijski absorpcijski koeficient pri določeni valovni dolžini, A je amplituda oz. približek koncentracije organskih spojin (Twardowski in sod., 2004).

$$a(\lambda) = A * e^{(-S * \lambda)} \quad \dots(1)$$

Spektralni nagib S je parameter, ki zagotavlja dodatne informacije o KCTOO (Helms in sod., 2008). Carder in sod. (1989) so pokazali, da lahko S uporabimo za semikvantitativen opis razmerja med fulvičnimi in huminskimi kislinami v vzorcu in merjenje molekulske mase fulvičnih, ne pa tudi huminskih kislin.

Objavljeni izmerjeni spektralni nagibi različnih raziskovalnih skupin so zelo variabilni in protislovni. Ugotovili so, da je za to več razlogov. Eden od teh je ta, da se pridobljeni spektralni nagibi razlikujejo, če se v meritvah uporabljajo različni deli absorpcijskega spektra. Uporaba različnega spektralnega razpona za ugotavljanje S vpliva tudi na pridobitev variabilnega končnega rezultata (Twardowski in sod., 2004).

Brown (1977) je dokazal, da se pri uporabi ožjega intervala valovnih dolžin zmanjšajo razlike pridobljene z redčenjem. Prav tako so opazili, da se spektralni nagibi razlikujejo pri uporabi eksponencialnega modela za linearno prilagajanje logaritmiranih absorpcijskih spektrov in nelinearnega eksponencialnega modela (Twardowski in sod., 2004).

Helms in sod. (2008) so določili še en parameter za opisovanje kromogenega raztopljenega ogljika, in sicer naklon razmerja (S_r), ki je enak razmerju spektrov med 275 in 295 nm $S_{(275nm-295nm)}$ ter 350 in 400 nm $S_{(350nm-400nm)}$.

Molekulsko maso v vodi topnih organskih spojin smo merili s spektrofotometričnimi meritvami in izračuni po Helms in sod. (2008), Twardowski in sod. (2004) in Green in Blough (1994). Večino raziskav, pri katerih so uporabili le-te, so naredili na okoljskih vzorcih iz naravnih vodnih teles. V naši raziskavi smo želeli preveriti uporabnost metode na fekalnih vzorcih.

Za merjenje absorbance smo v UV transparentno mikrotitrsko ploščo dodali 200 μ l 10 krat razredčenega supernatanta. Izmerili smo absorpcijski spekter od 200 do 800 nm v korakih po 5 nm. Uporabili smo čitalec mikrotitrskih plošč Multiskan[®] Spectrum Model #1500 (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA).

Najprej smo absorbance spremenili v absorpcijske koeficiente po formuli (2), kjer je α naipierijski absorpcijski koeficient, A je absorbanca in l je dolžina prepotovanega žarka, ki je v mikrotitrski plošči, napolnjeni z 200 μ l, enako 2/3 cm (Helms in sod., 2008).

$$\alpha(\lambda) = 2,303 A(\lambda)/l \text{ (m}^{-1}\text{)} \quad \dots(2)$$

Po tem smo izračunali spektralni nagib v območju od 300 do 700 nm, $S_{(300nm-700nm)}$, z enačbo (1), ki smo jo prilagodili podatkom po metodi najmanjših kvadratov (Twardowski in sod., 2004). $S_{(275nm-295nm)}$ in $S_{(350nm-400nm)}$ smo izračunali z linearno regresijo naravnega logaritma absorpcijskih koeficientov. Iz njihovih razmerij smo izračunali S_r . Izračunali smo tudi razmerje ($E_2:E_3$).

Pri merjenju absorpcijskih koeficientov smo pri posameznih valovnih dolžinah odšteli povprečje absorbanc MiliQ vode pri istih. Povprečje absorbanc od 700 nm do 800 nm posameznega vzorca smo odšteli pri izračunu absorpcijskih koeficientov le-teh, saj smo s tem zmanjšali napako, ki nastane zaradi omejitev inštrumenta, temperature ter sipanja svetlobe na koloidnih delcih in refrakcije svetlobe (Green in Blough, 1994).

3.3.3 Merjenje celokupnega topnega organskega ogljika

Kemijska potreba po kisiku (KPK) je metoda, ki je zelo razširjena za merjenje dostopnosti ogljika (Hu in Grasso, 2005). Največkrat je uporabljena za merjenje količine organskih onesnaževalcev oz. ugotavljanju obremenitev čistilnih naprav z odpadki in pri ugotavljanju učinkovitosti čistilnega procesa. Obstajajo 3 metode za ugotavljanje potrebe po kisiku: biokemijska potreba po kisiku (BOK), kemijska potreba po kisiku in celokupni organski ogljik (COO) (Wayne, 1997). V primerjavi z BOD je KPK metoda krajša, saj traja le nekaj ur (Hu in Grasso, 2005). Pri merjenju KPK uporabljamo močne oksidante za oksidacijo organskih spojin, ki jih mikroorganizmi oksidirajo samo delno ali jih sploh ne oksidirajo (Hu in Grasso, 2005). Z metodo KPK merimo redukcijo močnega oksidanta (kot je kalijev dikromat KCr_2O_7) v kislem okolju in pri visoki temperaturi s titrimetrično ali kolorimetrično metodo (LaPara in sod., 2000; Wayne, 1997; Clescerl in sod., 1999). Ker močni oksidanti sami niso dovolj, da oksidirajo karboksilne kisline z ravnimi verigami, moramo reakciji dodati tudi srebrov sulfat kot katalizator (Hu in Grasso, 2005). Koncentracijo organske snovi vzorca izračunamo iz razlik začetne in končne koncentracije oksidanta v vzorcu (Hu in Grasso, 2005; Clescerl in sod., 1999). Končni KPK vzorca izračunamo s pomočjo standardov, kot sta oksalat ali glukoza (Hu in Grasso, 2005).

V naši raziskavi smo metodo KPK uporabili za merjenje celokupnega topnega organskega ogljika v vzorcih blata. Pri ugotavljanju kemijske potrebe po kisiku smo uporabili standardno metodo 5220D, vendar smo jo priredili in miniaturizirali.

Princip metode 5220D:

Ko vzorec dodamo reagentu, začne močni oksidant oz. dikromatni ion oksidirati organski material v vzorcu do CO_2 in vode. Hkrati se dikromatni ion (oranžne barve) reducira do Cr^{3+} (zelene barve) z reakcijo (3) (Clescerl in sod., 1999; Hu in Grasso, 2005).



To povzroči spremembo kroma iz heksavalentnega (VI) v trivalentno stanje (III). Krom v obeh stanjih je obarvan in absorbira v vidnem delu spektra. Dikromatni ion ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) močno absorbira svetlobo pri 400 nm, kromov ion (Cr^{3+}) najboljše absorbira svetlobo pri 600 nm (Clescerl in sod., 1999). Reakcija poteka v prisotnosti katalizatorjev pri visoki temperaturi. Intenziteta nastale zelene barve vzorca je sorazmerna s koncentracijo porabljenega kisika za oksidacijo organske snovi v vzorcu (LaPara in sod., 2000; Hu in Grasso, 2005).

Pri merjenju KPK smo najprej dodali 500 μl reagenta KPK v 2 ml- steklene vial, ki so bile na posebno pripravljenem jeklenem stojalu. Po tem smo reagentu dodali 150 μl 50-krat redčenega supernatanta. Vial smo zaprli in preverili, da tesnijo ter jih dali segrevati v pečico na 130 °C za 40 minut. Nato smo po 200 μl mešanice vzorca in reagenta prenesli v mikrotitresko ploščico in odmerili absorbanco pri 405, 540 in 630 nm s spektrofotometrom BIOTEK ELx808. Kemično potrebo po kisiku oz. koncentracijo organskih spojin smo izračunali iz umeritvene krivulje z glukozo. Za izračun koncentracije organskih snovi smo uporabili meritve pri 405 nm. Pri tej valovni dolžini merimo koncentracijo heksavalentnih (VI) kromovih ionov.

Umeritveno krivuljo smo naredili iz znanih koncentracij glukoze (1 g/l, 0,8 g/l, 0,6 g/l, 0,4 g/l, 0,2 g/l, 0,1 g/l in 0,05 g/l) in destilirane vode (0 g/l) v treh ponovitvah. Pri izdelavi umeritvene krivulje smo uporabili isto količino reagenta in umeritvenega vzorca ter delali v istih razmerah.

Priprava reagenta KPK:

Reagent KPK je sestavljen iz reagenta R1 («digestion solution») in reagenta R2 («sulphuric acid reagent») v razmerju 3:7.

R1 : v 500 ml destilirane vode smo raztopili 10,216 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, ki smo ga predhodno sušili dve uri pri 150 °C. Dodali smo še 167 ml koncentrirane H_2SO_4 in destilirano vodo do 1000 ml.

R2: raztopili smo Ag_2SO_4 v koncentrirani H_2SO_4 tako, da je bila končna koncentracija Ag_2SO_4 enaka 10 g/l (Clescerl in sod., 1999).

3.3.4 Ugotavljanje redukcijskih sladkorjev z uporabo reagenta PAHBAH

Merjenje redukcijskih sladkorjev je pomembno pri nadzoru živinskih proizvodov, ker lahko vplivajo na okus in teksturo produkta. Za njihovo dokazovanje uporabimo enostavne in robustne kolorimetrične metode (Başkan in sod., 2016; Hartmann in sod., 1994).

Za merjenje koncentracije redukcijskih sladkorjev smo uporabili metodo, ki jo je opisal Lever (1977). Pri le-tej se sladkorji v vroči alkalni raztopini razgradijo in reagirajo s

hidrazidi benzojeve kisline, pri čemer nastane anionska oblika bisbenzoil hidrazon mono ali dimetilglioksala. Nastali produkti so intenzivne rumene barve, ki jo lahko izmerimo spektrofotometrično pri valovni dolžini okrog 400 nm. Eden od najpogosteje uporabljenih reagentov je hidrazid parahidroksi benzojeva kislina (PAHBAH), ki ima absorpcijski maksimum pri 410 nm. Reakcija mora potekati pri višjih temperaturah (>70 °C) in v srednje ali močni alkalni raztopini, saj to omogoči hidrolizo saharoze in drugih nereducirajočih OH do glukoze in drugih reducirajočih monosaharidov (Hartmann in sod., 1994).

Za merjenje redukcijskih sladkorjev smo uporabili plastične 1200 uL Greiner bloke z 96 luknjicami, v katere smo dodali 1 ml reagenta PAHBAH in 10 µl 10-krat rečenega supernatanta. Po tem smo bloke zaprli, jih 10 minut segrevali v vroči kopeli pri temperaturi 100 °C ter nato ohladili v hladni vodi. Po 200 µl reagenta smo prenesli v mikrotitrsko ploščo in izmerili intenziteto rumene barve pri 405 nm s čitalcem mikrotitrskih plošč (BIOTEK Elx808).

Koncentracijo redukcijskih sladkorjev smo izračunali iz umeritvene krivulje z glukozo. To smo naredili iz znanih koncentracij glukoze (6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM in 0,5 mM) in destilirane vode (0 mM) v treh ponovitvah. Pri izdelavi umeritvene krivulje smo uporabili isto količino reagenta in umeritvenega vzorca ter delali v istih razmerah.

Priprava reagenta:

Zmešali smo 5 ml Na₂SO₃, 5 ml 0,5 M natrijevega citrata, 5 ml 5 M NaOH in 75 ml dH₂O. Temu smo med mešanjem počasi dodali še 5 ml 0,2 M CaCl₂ in 1 g PAHBAH (Sigma). Na koncu smo dodali dH₂O do skupnega volumna 100 ml. Reagent je obstojen 60 min.

3.3.5 Ugotavljanje HMK

Pri določanju hlapnih kratko verižnih maščobnih kislin smo uporabili metodo eterske ekstrakcije po Kolbl (2014).

Najprej smo pripravili in ustrezno označili 15 ml-falkonke in jim v sledečem zaporedju v digestoriju dodajali:

- 0,4 g NaCl
- 2 ml vzorca
- 200 µl internega standarda (krotonska kislina koncentracije 10 g/l)
- 400 µl H₂SO₄
- 2 ml etra.

Sledilo je ekstrahiranje HMK z obračanjem falkonk gor in dol 30- krat. Falkonke smo nato centrifugirali 1 minuto pri 2000 obratov na minuto, zato da sta se ločili eterska in vodna

faza. Zgornjo etersko fazo smo s pipeto prenesli v steklene vialo. Viale Agilent smo zaprli z zamaški s teflonsko membrano.

Po vsakem zgoraj opisanem koraku smo falkonke zaprli s pokrovčkom. Do analize na plinskem kromatografu smo vse vialo shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za ugotavljanje HMK smo uporabili plinski kromatograf Agilent 6890A, opremljen z avtosamplerjem in kapilarno kolono Agilent JinW GC Columns DB-FFAP, s $30\text{ m} \times 0,53\text{ mm} \times 1\text{ }\mu\text{m}$ slojem stacionarne faze. Temperatura injektorja je bila $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura plamensko ionizirajočega detektorja pa $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. Začetna temperatura kolone je bila $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zadrževalni čas je bil 1 min, po tem se je temperatura dvigovala za $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Končna temperatura kolone je bila $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, zadrževalni čas je bil 3 min. Nosilna plina sta bila Helij (He) $5\text{ ml}/\text{min}$ in dušik (N_2) $25\text{ ml}/\text{min}$. Detektorska plina sta bila vodik (H_2) $30\text{ ml}/\text{min}$ in zrak $400\text{ ml}/\text{min}$. Volumen vzorca je bil $1\text{ }\mu\text{l}$.

Za kalibracijo plinskega kromatografa smo uporabili mešanico KR1 (Kolbl, 2012). V vzorcih smo določali koncentracijo etanojske ($\text{C}_2:0$), propanojske ($\text{C}_3:0$), butanojske ($\text{C}_4:0$) in izobutanojske (izo- $\text{C}_4:0$), pentanojske ($\text{C}_5:0$) in izopentanojske (izo- $\text{C}_5:0$) ter hesanojske ($\text{C}_6:0$) kisline.

3.3.6 Ugotavljanje vodnega deleža

Za ugotavljanje deleža vode smo vzorce sušili 5 dni pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4 DELO Z DNK IN LH-PCR

3.4.1 Ekstrakcija, kvantifikacija in pomnoževanje DNK

Iz vzorcev blata smo izolirali DNK s komercialnim kitom "PowerFecal DNK isolation Kit" (MO BIO Laboratories, Inc.) po navodilih proizvajalca. Za izolacijo smo uporabili $0,2\text{ g}$ blata vsakega vzorca. Uspešnost izolacije smo preverili z $0,8$ -odstotno gelsko elektroforezo. Vzorce smo do nadaljnjih analiz hranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Med postopkom izolacije se je odprla mikrocentrifugirka vzorca osebe S5 dan 18 C, zato rezultatov analiz tega vzorca nismo upoštevali. Po izolaciji DNK smo na aparatu NanoVueTM izmerili njeno koncentracijo. Ko smo imeli izolirano DNK, smo pomnožili bakterijske gene za 16S rRNK. Uporabili smo široko specifična začetna oligonukleotida, od katerih je bil prednji na 5' koncu označen s fluorescenčnim barvilom:

27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (označen z Joe barvilom) (Marchesi in sod., 1998)

518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' (Muyzer in sod., 1993).

Reakcija PCR je potekala po postopku, opisanem v Preglednici 3. Za pomnoževanje genov smo uporabili aparat MyCycler® thermal cycler (BIO RAD, ZDA).

Preglednica 3: Protokol pomnoževanja gena 16S rDNK z reakcijo PCR.

Vrsta cikla	Čas	Temperatura	Število ciklov
Pred cikel	5 min	94 °C	1
Denaturacija DNK	30 s	94 °C	30
Prileganje zač. oligonukleotidov	30 s	57 °C	
Podaljševanje verig	1 min	52 °C	
Podaljšana polimerizacija	7 min	72 °C	1
Zaustavitev, ohranjanje	∞	4 °C	/

Vsakemu vzorcu smo pred pomnoževanjem genov dodali naslednje reagente:

- 1x PCR pufer brez MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)
- 2,5 mM MgCl₂,
- 0,2 mM dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)
- 0,2mg/l BSA (Bovine Serum Albumin) (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)
- 0,2 μM začetnih oligonukleotidov B27f (Microsynth AG, Švica) in 0,2 μM začetnih oligonukleotidov B518r (MWG Biotech AG, Nemčija),
- 0,04 U/μl Taq DNK polimeraze (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA)
- deionizirano vodo brez prisotnih nukleaz (Sigma-Aldrich, Nemčija) do 24μl
- 1μl matrične DNK.

Uspešnost reakcije smo preverili z 1,1-odstotno gelsko elektroforezo. Vzorce smo do nadaljnje uporabe hranili pri -20 °C.

Preglednica 4: Protokol za LH-PCR.

Protokol za PCR mešanico z uporabo Fermentas Taq polimeraze		Volumen ene mikrocentrifugirke (µl)		25
		Št. vzorčkov		62
		Matrica DNK (µl)		1
Sestavine	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Mešanica za eno epico (µl)	»Master mix« (µl)
Voda (µl)	/	/	16,30	1057,1
Pufer (x)	10	1	2,5	155
MgCl ₂ (mM)	25	2,5	2,5	155
BSA (mg/l)	20	0,2	0,25	15,5
dNTPs (mM)	10	0,2	0,5	31
Začetni oligonukleotid 1 (µM)	10	0,2	0,5	31
Začetni oligonukleotid 2 (µM)	10	0,2	0,5	31
Polimeraza (µl)	Polimeraza Fermentas Taq DNK		0,20	12,40
Matrica DNK (µl)	/	/	1	62
Skupni volumen (µl)			25	1550
Polimeraza Fermentas Taq DNK	Založna koncentracija	Končna koncentracija		Volumen v reakcijski mešanici
	U/µl	U/ 25 µl	U/ µl	µl
	5	1	0,04	12,4

Pomnožke, dobljene z LH-PCR, smo analizirali na kapilarni elektroforezi ABI 3130XL Genetic Analyzer (Astrlied Biosystems Inc., ZDA).

Postopek priprave pomnožkov za kapilarno elektroforezo:

- Naredili smo mešanico, ki je za vsak vzorec vsebovala po 10 µl formamida UltraPure™ (Astrlied Biosystems Inc., ZDA) in 0,3 µl internega standarda GeneScan 500 ROX (Astrlied Biosystems Inc., ZDA), ki smo ga uporabili za ugotavljanje dolžine fragmentov (+10 %)
- Mešanico smo vorteksirali in nanegli v mikrotitersko ploščo (v vsako luknjico smo dodali 10,3 µl mešanice)
- V vsako luknjico smo dodali po 2 µl vsakega vzorca
- Mikrotitersko ploščo smo denaturirali 3 minute na 93 °C v MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., ZDA)
- Na koncu smo vzorce ohladili na ledu.
- Do nadaljnjih analiz smo vzorce hranili pri 4 °C.

3.5 STATISTIČNE ANALIZE

3.5.1 Analiza in normalizacija podatkov LH-PCR

Za analizo in normalizacijo podatkov, pridobljenih s kapilarno elektroforezo, smo uporabili postopek, opisan po Abdo in sod. (2006), napisan v programu R, verzija 3.3.0 (<http://www.r-project.org/>). Ta temelji na razlikovanju “pravih” vrhov (ki predstavljajo velikost pomnožka) od šuma (vrhovi, ki nastanejo zaradi občutljivosti aparata) na podlagi variabilnosti podatkov. Postopek je v primerjavi z večino drugih bolj objektiven, saj zmanjša človeško napako pri ločevanju šuma od pravih vzorcev. Program po ločevanju primerja elektroferograme in razvrsti fragmente v skupine (Abdo in sod., 2006).

3.5.1.1 Ugotavljanje “pravih” vrhov

Kot kompenzacijo zaradi dejavnikov, kot je razlika v koncentraciji DNK med vzorci, je program najprej normaliziral podatke z ugotavljanjem relativnih površin vrhov. To je naredil z deljenjem površine posameznega vrha s površino vseh vrhov v vzorcu. Za tem je identificiral “prave” vrhe oz. ločil šum od signalov fluorescenčno označenih fragmentov DNK. Ta proces poteka po algoritmu (Abdo in sod., 2006):

1. Standardna deviacija se izračuna po formuli (4) iz normaliziranih podatkov (relativna površina vrhov) s predpostavko, da je povprečna površina enaka nič.

$$\left(\sqrt{\frac{\sum x^2}{n-1}} \right) \quad \dots(4)$$

[x]: Relativna površina vrhov

[n]: Število vrhov

2. Identificirajo se podatki, katerih vrednost je 3-krat večja od določene standardne deviacije.
3. Ti podatki so identificirani kot signali in so izločeni. Nato se ponovno izračuna standardna deviacija s predpostavko, da je povprečna površina enaka nič.
4. Točke 1 do 3 se ponavljajo tako dolgo, dokler ne izločimo vseh podatkov, ki so večji od določene limitne standardne deviacije.
5. Rezultat predstavljajo samo tisti vrhovi, ki so bili identificirani kot signal. Ostali podatki so izločeni, saj predstavljajo šum.

3.5.1.2 Primerjava elektroferogramov

Velikosti fragmentov vzorcev določimo s primerjavo premikanja le-teh v kapilarni elektroforezi s fragmenti internega standarda znane velikosti. Vsaka dolžina fragmenta predstavlja en bakterijski filotip. Da lahko primerjamo združbe, moramo vse fragmente DNK podobnih velikosti uvrstiti v isto skupino (s tem kompenziramo analitične napake

prisotne pri merjenju). Vsi fragmenti znotraj iste skupine so filotipi, ki so skupni vsem vzorcem. Uvrščanje se izvaja na način, da se zberejo vsi podatki (dolžine fragmentov) vseh vzorcev ter se velikosti fragmentov razvrstijo tako, da se dvojni fragmenti identificirajo in odstranijo iz nadaljnjih analiz. Temu sledi grupiranje, s čimer se identificirajo fragmenti podobnih velikosti, ki se lahko uvrstijo v isto skupino. Fragmente iste skupine predstavimo z njihovo povprečno dolžino. Na koncu rezultate podamo bodisi kot relativno številčnost fragmenta (z deljenjem vrha s površino vseh vrhov posameznega vzorca) ali kvalitativno (ali je fragment prisoten ali ne) (Abdo in sod., 2006). V našem primeru smo pri izračunih upoštevali samo fragmente velikosti med 400 in 510 baznih parov in za odkrivanje vrhov izbrali dve standardni deviaciji (Robič, 2012; Lipovšek, 2013).

3.5.2 Ne metrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS)

Pred statistično analizo, ki smo jo opravili v programu PAST, verzija 3.12, smo normalizirali tudi rezultate fizikalno-kemijskih parametrov, in sicer tako, da smo rezultatom prištelili 1 in jih logaritmirali z desetiškim logaritmom. Rezultatov pH nismo spreminjali, saj je vrednost pH že desetiški logaritem vodikovih ionov.

Multivariantne statistične analize se med drugim uporabljajo za proučevanje odnosov med številnimi seti spremenljivk. V literaturi je bil NM-MDS uporabljen za primerjavo T-RFLP in LH-PCR profilov iz različnih okolij (Robič, 2012; Lipovšek, 2013; Zavec, 2014).

NM-MDS uporabljamo za posredne analize, s katerimi pridobimo ordinacijo. Ordinacija je urejanje enot po nekem vrstnem redu. (Legendre in Legendre, 1998). Pri ordinacijskih analizah je želja, da se večdimenzionalni podatki obravnavajo v prostoru s čim manj dimenzij (večinoma v dveh dimenzijah). NM-MDS je ena od najboljših izbir za ohranjanje točnih odnosov med vzorci v nizko dimenzionalnem prostoru (Clarke, 1993). NM-MDS uporablja range kot mero za podobnost oz. razliko med podatki. To pomeni, da je razlika med rezultati zamenjana z rangi. Recimo, če je dejanska razlika med podatkom A in B enaka 1,5, razlika med A in C enaka 2,5 bomo z NM-MDS analizo rangirali B kot prvi, najbližji podatek in C kot drugi po vrsti. NM-MDS analize so lahko kvalitativne, kvantitativne ali semikvantitativne (Clarke, 1993; Legendre in Legendre, 1998).

Rezultati NM-MSD analize so pridobljeni z naključnimi procesi. Zato bo rezultat vsakič malo drugačen in je analizo potrebno ponoviti nekajkrat, dokler ne dobimo rezultatov z najmanjšo napetostjo (»stress«). Napetost je mera za to, kako dobro pridobljeni rezultati opisujejo razlike med vzorci. Manjša je napetost, boljša je NM-MDS ordinacija. Napetost naj bi bila pod 0,1. Če je napetost večja kot 0,2, je kakovost analize vprašljiva (Kindt in Coe, 2005; Clarke, 1993; Legendre in Legendre, 1998). V naših analizah smo za primerjavo fizikalno-kemijskih parametrov med osebami uporabili Euclidijev indeks. Zaradi boljšega izračuna razdalj s tem indeksom smo podatke najprej normalizirali.

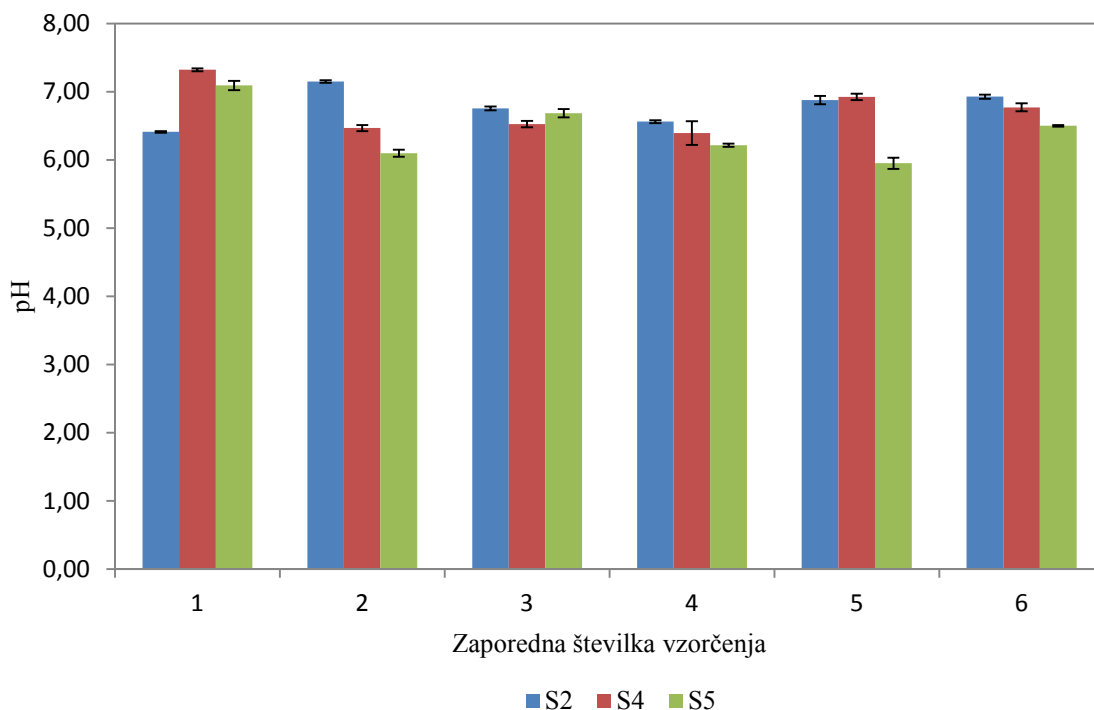
Euclidijeva razdalja se izračuna na način, da se vsak parameter (v našem primeru so to fizikalno-kemijski parametri) postavi v svojo os in se po tem rezultati teh parametrov vsake osebe postavijo v nastali večdimenzionalni prostor. Za analizo mikrobnih združb smo uporabili Bray-Curtis indeks.

4 REZULTATI

4.1 FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI

4.1.1 pH

Blato vseh oseb ima normalne vrednosti pH, ki so med 6 in 7,2 (izjema je oseba S4, dan -5, $\text{pH}=7,32\pm 0,02$ in oseba S5, dan 18, $\text{pH}=5,95\pm 0,08$). Razlike med osebami ter razlike pH vsakega posameznika po času so zelo majhne. Pri vseh osebah pH po času minimalno variira. (Slika 5).



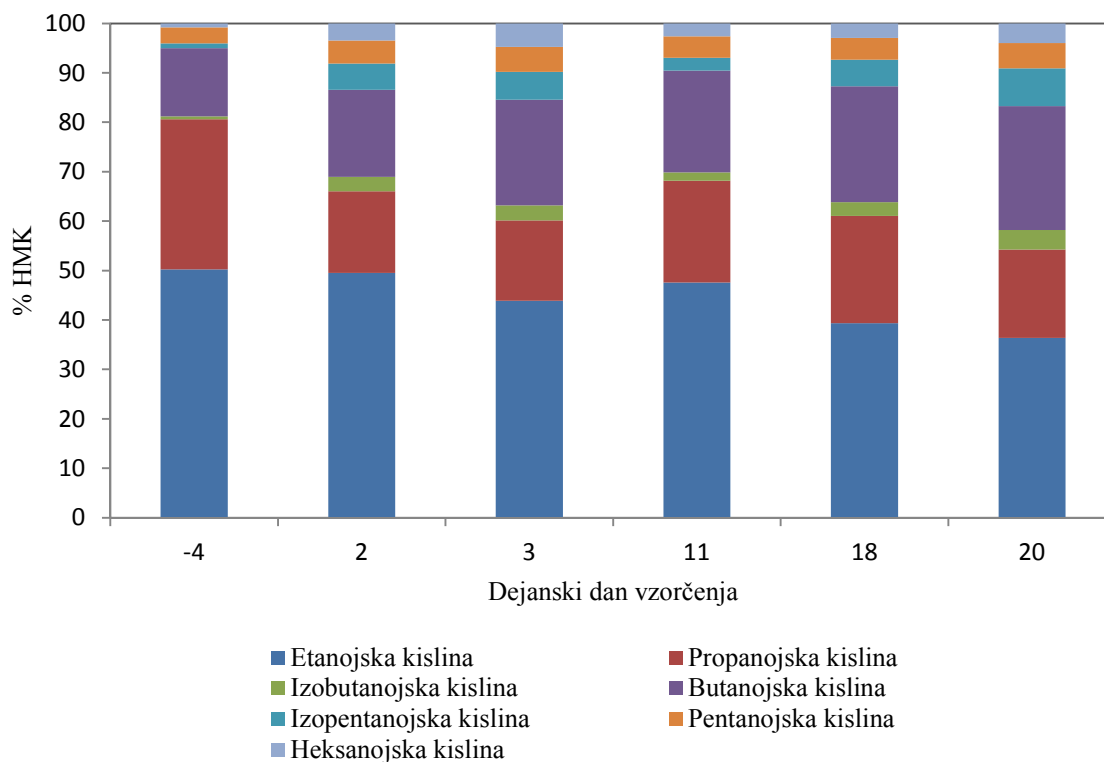
Slika 5: Sprememba pH blata oseb S2, S4 in S5 po času. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh meritev in standardne napake.

4.1.2 Koncentracija HMK

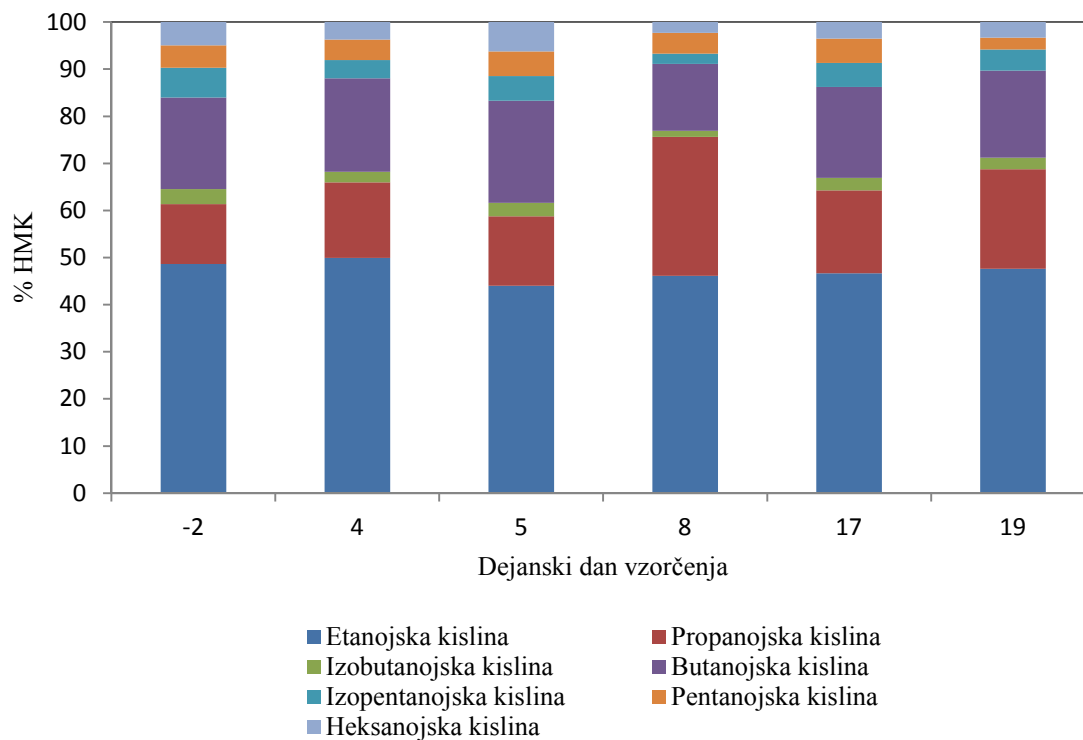
Pri osebah S2 in S4 je ves čas trajanja raziskave prisotne največ etanojske kisline v primerjavi z ostalimi izmerjenimi HMK. Druga najbolj zastopana HMK pri osebah S2 in S4 je propanojska oz. butanojska kislina (odvisno od dneva). Ostale HMK predstavljajo manjši delež (10-20 % vseh HMK), ki se spreminja iz dneva v dan. Pri osebi S2 je v dnevni -5 ostalih HMK zelo malo in se s časom njihov delež poveča. Pri osebi S4 je ravno obratno. Oseba S5 ima v iztrebkih največ etanojske ali pa butanojske kisline, odvisno od dneva. Na tretjem mestu je propanojska kislina. Ostale HMK predstavljajo med 10 % in 20 % celotnih HMK. Pri osebi S5 je posebnost ta, da ni prisotne heksanojske kisline (izjema je dan 20) (Slika 6,7,8).

Oseba S2 ima na koncu, v primerjavi z deleži HMK po začetku mirovanja (dan 2 pri osebah S2 in S4, ter dan 4 pri osebi S4), manj etanojske kisline in več butanojske ter izopentanojske kisline. Vrednosti ostalih kislin so približno enake. Pri osebi S4 je delež propanojske kisline nekoliko narastel, medtem ko je delež pentanojske kisline padel. Ostale vrednosti so ostale podobne. Pri osebi S5 so razlike v sestavi HMK med dnevi višje kot pri osebi S2 in osebi S4. Na koncu se pri le-tej povečajo odstotki izobutanojske, izopentanojske, pentanojske in heksanojske kisline, zmanjša pa se delež etanojske in butanojske kisline (Slika 6,7,8).

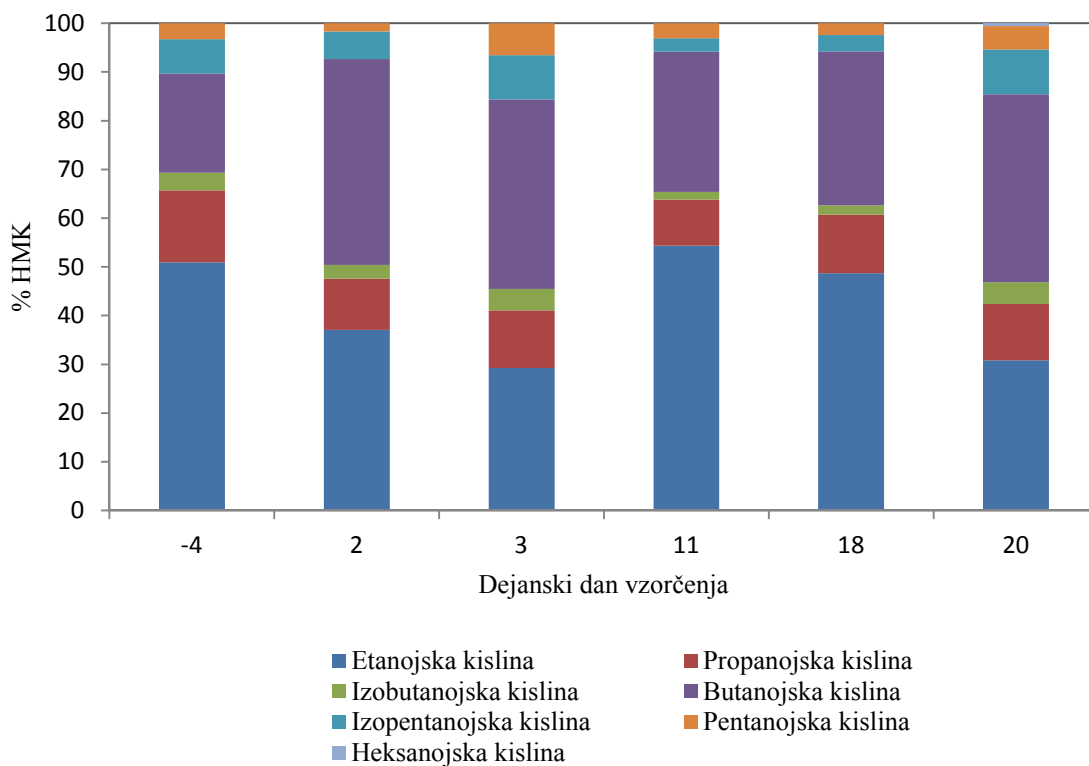
Pri osebi S2 se koncentracija skupnih HMK po času zmanjša (izjema je dan 3), medtem ko pri osebi S4 količina HMK najprej narašča in se po osmem dnevni začne zmanjševati. V primeru osebe S5 po začetku mirovanja proizvodnja HMK naglo upade in nato narašča ter na koncu zopet začne padati (Slika 9).



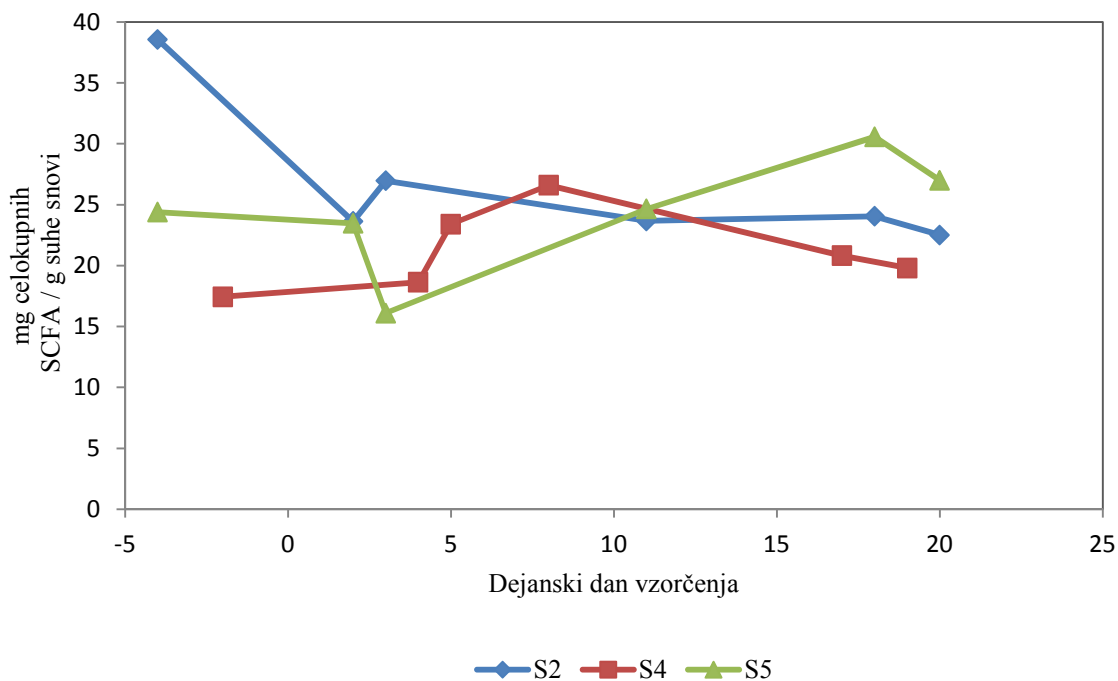
Slika 6: Relativni delež HMK osebe S2 po času.



Slika 7: Relativni delež HMK osebe S4 po času.



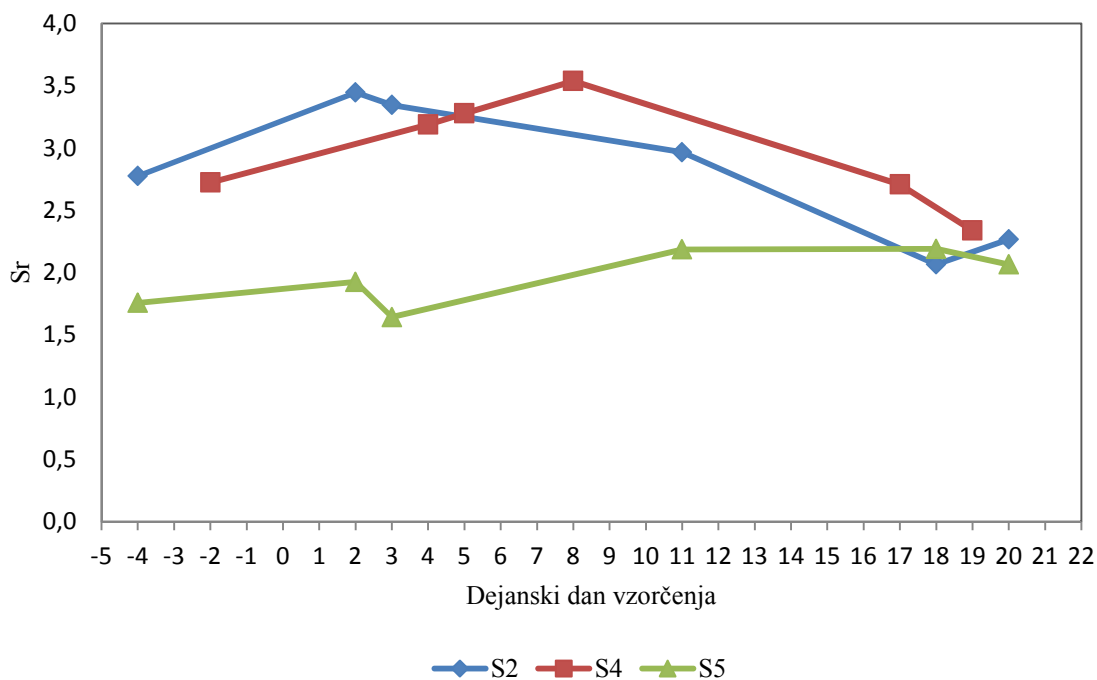
Slika 8: Relativni delež HMK osebe S5 po času.



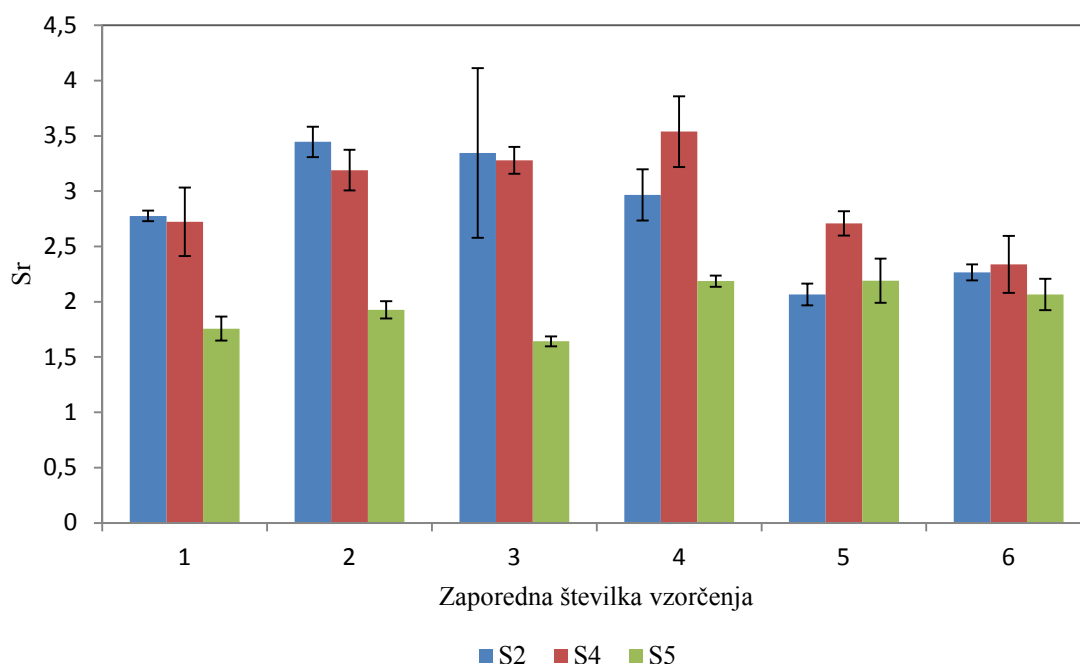
Slika 9: Koncentracija celokupnih HMK oseb S2, S4 in S5 podana kot miligram celokupnih HMK na gram suhe snovi vzorca po času.

4.1.3 Velikost topnih organskih spojin

Iz Slik 10 in 11 je razvidno, da se v kratkem času poskusa molekulska masa malo spremeni. S_r se pri osebah S2 in S4 pred mirovanjem povečuje (molekulska masa se zniža). Temu sledi znižanje S_r oz. povečanje molekulske mase. Pri teh osebah je na koncu vrednost S_r manjša kot na začetku – organske spojine so na koncu poskusa večje kot na začetku. Pri osebi S5 so razlike v molekulski masi skozi čas najmanjše. S_r vrednost se na začetku povečuje, za tem pade in se od tretjega dneva spet počasi povečuje (za razliko od oseb S2 in S4). Končna vrednost S_r je pri osebi S5 večja kot na začetku kar pomeni, da je molekulska masa organskih spojin manjša kot pred začetkom mirovanja. Vrednosti na zadnji dan vzorčenja vseh treh oseb so zelo podobne ($2,27 \pm 0,07$ pri osebi S2; $2,34 \pm 0,26$ pri osebi S4 in $2,06 \pm 0,14$ pri osebi S5). Vse izmerjene S_r vrednosti so višje kot 1,6.



Slika 10: Sprememba velikosti topnih organskih spojin oseb S2, S4 in S5 po času. Rezultati so prikazani kot povprečne S_r vrednosti treh meritev oseb S2, S4 in S5.



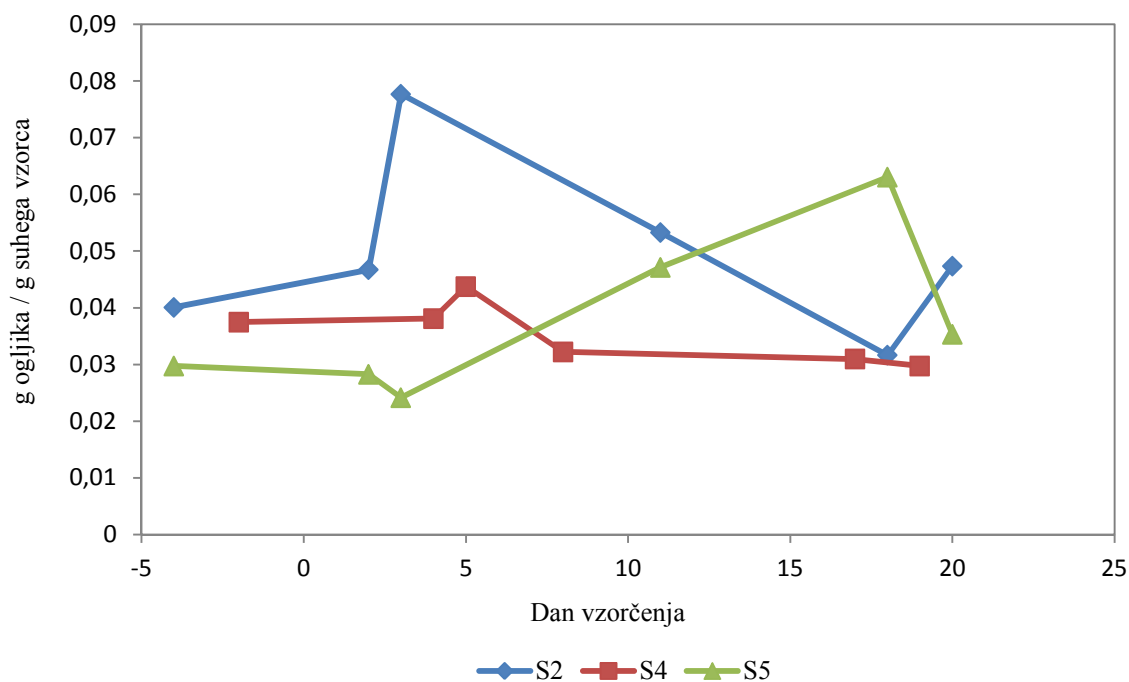
Slika 11: Sprememba velikosti topnih organskih spojin oseb S2, S4 in S5 po času. Rezultati so prikazani kot povprečne S_r vrednosti treh meritev S_r oseb S2, S4 in S5 in standardne napake. Grafikon v obliki stolpcev, ki vsebuje iste podatke kot grafikon s krivuljo, smo dodali z namenom prikaza standardnih napak, ki bi bile na grafikonu s krivuljo nepregledne.

4.1.4 Koncentracija celokupnega topnega organskega ogljika

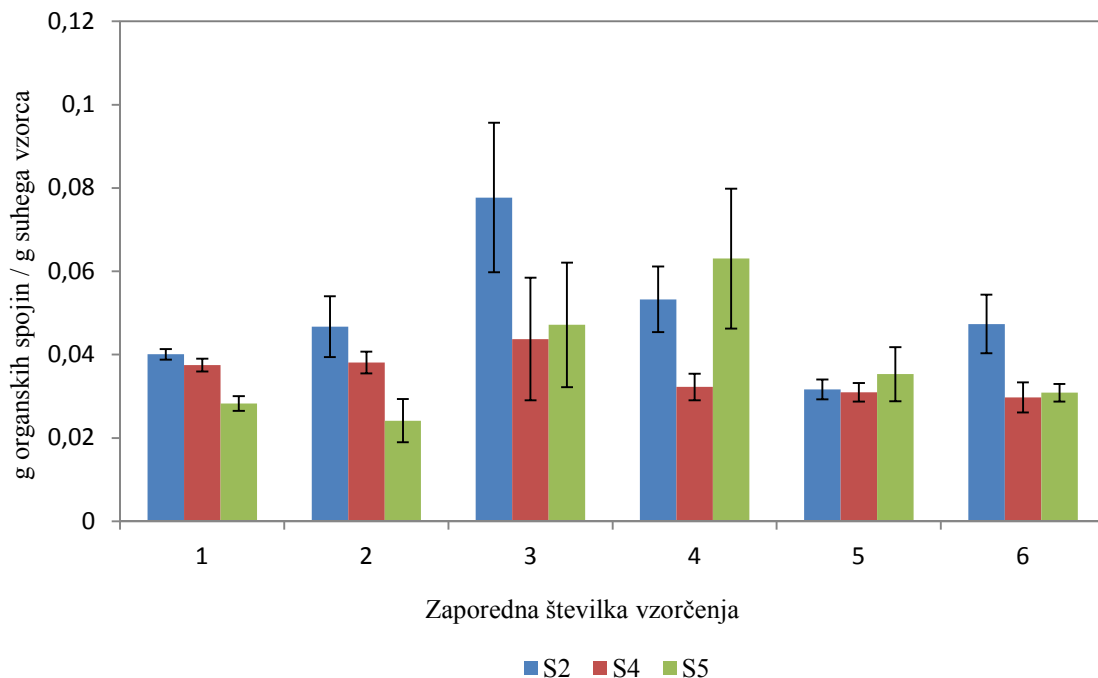
Iz slik 12 in 13 je razvidno, da so razlike v koncentraciji raztopljenega organskega ogljika med osebami in pri isti osebi v različnih časovnih intervalih zelo majhne.

Pri osebi S2 začne koncentracija ogljika po začetku mirovanja naraščati. Potem naglo pade in na koncu spet narašča. Pri osebi S4 koncentracija po mirovanju prav tako narašča, vendar manj očitno kot pri osebi S2 ter se pri le-tej koncentracija ogljika najmanj spreminja. Pri osebi S5 vrednosti najprej padajo in nekaj dni po začetku mirovanja začnejo naraščati. Na koncu vrednosti hitro padejo.

Iz rezultatov je razvidno, da se izmerjene vrednosti v tako kratkem časovnem obdobju ne spreminjajo veliko, kar pomeni, da je koncentracija skupnega topnega organskega ogljika v vseh vzorcih približno enaka ne glede na aktivnost posameznika.



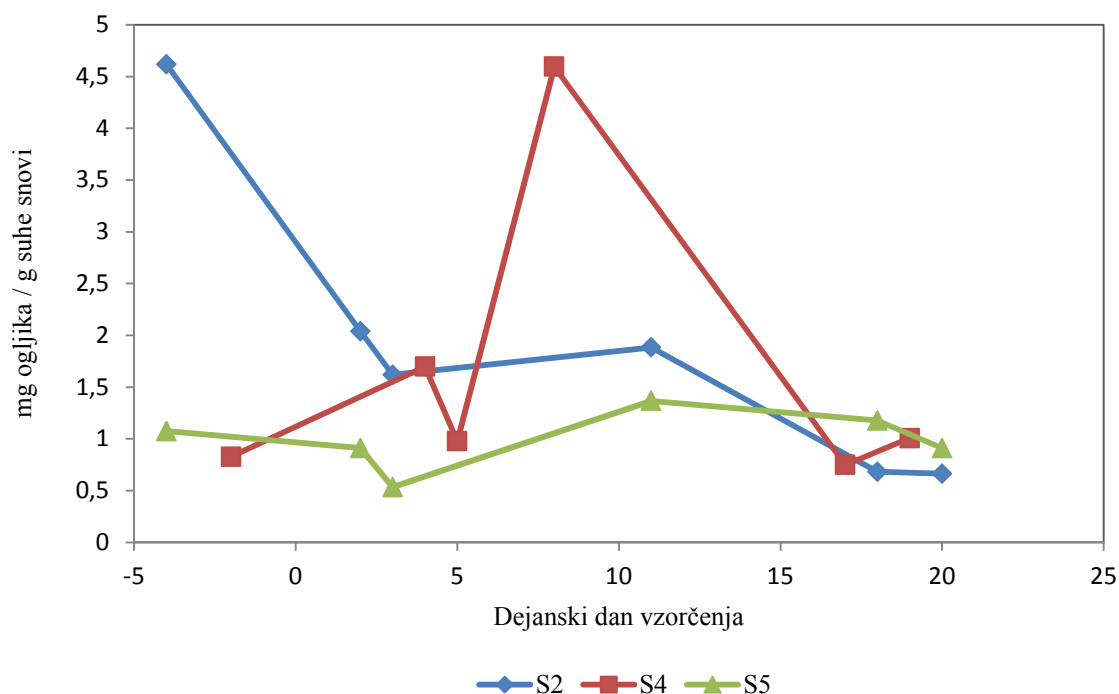
Slika 12: Sprememba koncentracije celokupnega topnega organskega ogljika oseb S2, S4 in S5 po času. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh meritev.



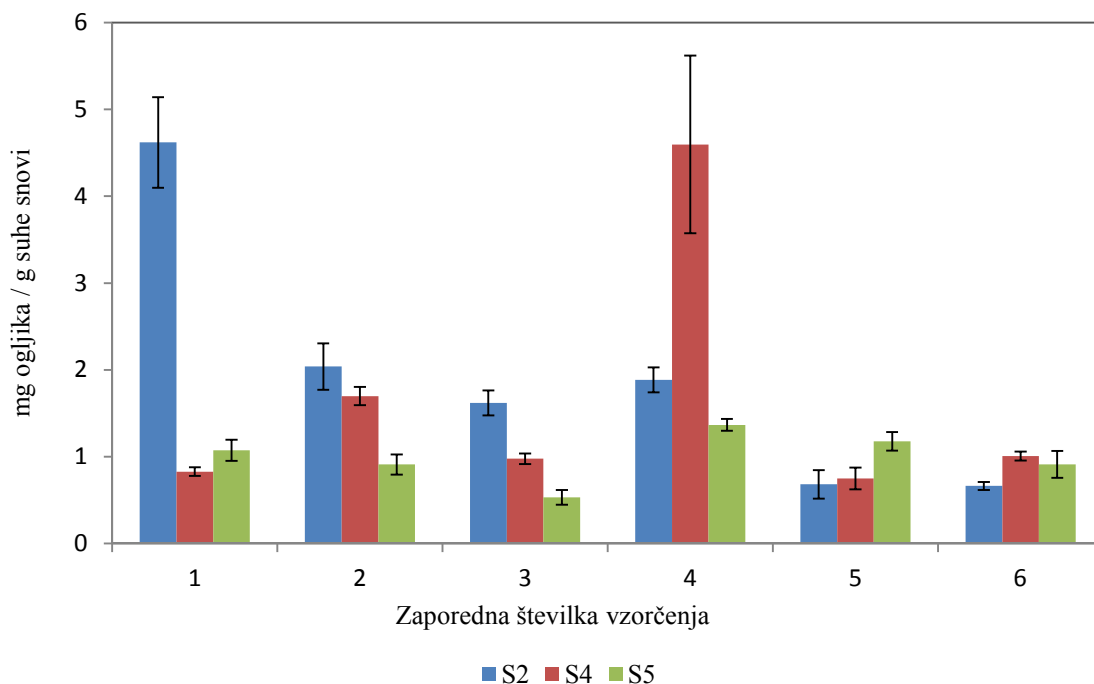
Slika 13: Sprememba koncentracije celokupnega topnega organskega ogljika oseb S2, S4 in S5 po času. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh meritev in standardne napake. Grafikon v obliki stolpcov, ki vsebuje iste podatke kot grafikon s krivuljo, smo dodali z namenom prikaza standardnih napak, ki bi bile na grafikonu s krivuljo nepregledne.

4.1.5 Koncentracija redukcijskih sladkorjev

Iz Slik 14 in 15 vidimo, da so koncentracije redukcijskih sladkorjev pri vseh preiskovancih nizke in se le-te po času minimalno spreminjajo (izjemi sta dan -5 oz. -4 pri osebi S2 in dan 10 oz. dan 8 pri osebi S4). Predvidevamo, da je razlog za odstopanja povečani vnos OH na dan -6 pri osebi S2 in na dan 7 pri osebi S4 (en dan prej) (Priloga B). Pri osebi S2 se koncentracija čez čas zmanjšuje. Pri osebah S4 in S5 koncentracije variirajo (naraščajo in padajo). Koncentracije redukcijskih sladkorjev na koncu raziskave so v primerjavi z koncentracijami po začetku mirovanja in skozi trajanje raziskave med osebami bolj podobne.



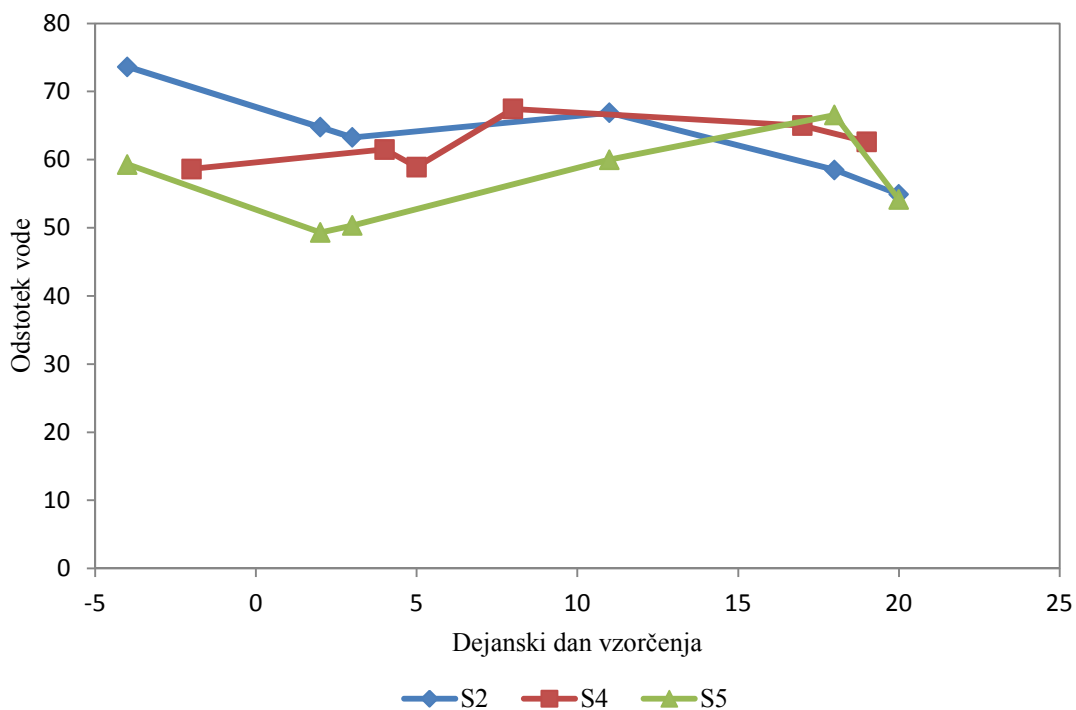
Slika 14: Sprememba koncentracije redukcijskih sladkorjev oseb S2, S4 in S5 po času. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh meritev in standardne napake.



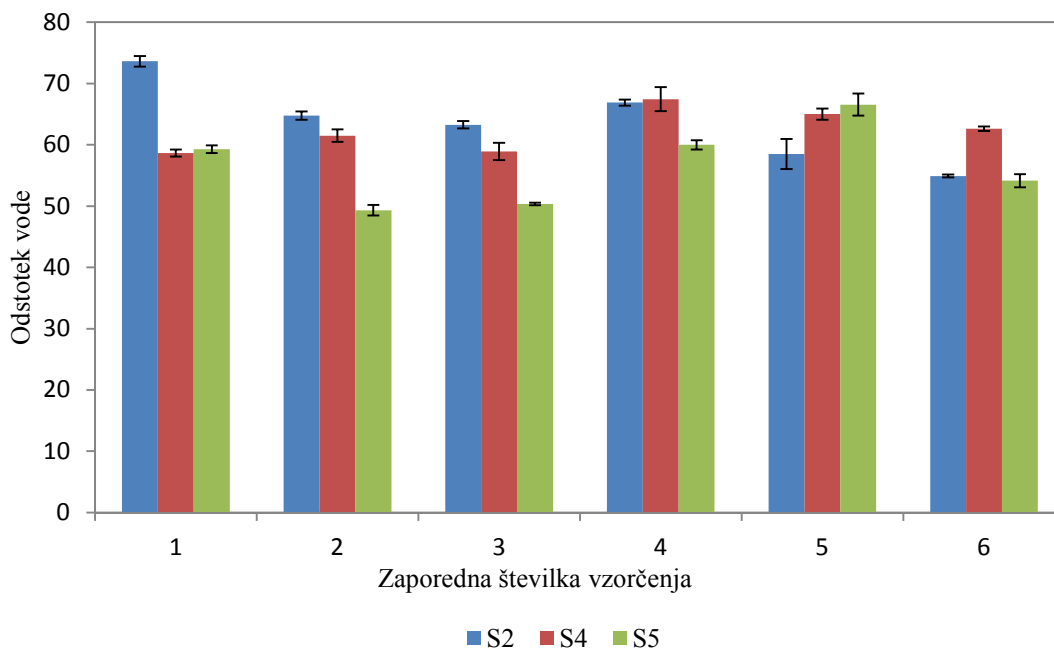
Slika 15: Sprememba koncentracije redukcijskih sladkorjev oseb S2, S4 in S5 po času. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh meritev in standardne napake. Grafikon v obliki stolpcev, ki vsebuje iste podatke kot grafikon s krivuljo, smo dodali z namenom prikaza standardnih napak, ki bi bile na grafikonu s krivuljo nepregledne.

4.1.6 Vodni delež

Iz Slik 16 in 17 je razvidno, da so vodni deleži v blatu pri vseh osebah nizki. Oseba S2 je edina, pri kateri vodni delež konstatno pada. Pri osebah S4 in S5 ta variira. Vrednosti vodnega deleža so od $54,90 \pm 0,23$ % do $73,62 \pm 0,88$ % pri osebi S2, od $58,64 \pm 0,57$ % do $65,00 \pm 0,91$ % pri osebi S4 in od $49,31 \pm 0,87$ % do $66,56$ % pri osebi S5. Oseba S4 je edina, ki ima končne rezultate višje od začetni in ima najmanjšo razliko v deležu vode skozi čas – ta je med maksimalno in minimalno izmerjeno vrednostjo enaka 8,8 %. Pri osebah S2 in S5 je razlika precej višja in sicer znaša 18,72 % in 17,2 %.



Slika 16: Sprememba vodnega deleža oseb S2, S4 in S5 po času. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh meritev in standardne napake.



Slika 17: Sprememba vodnega deleža oseb S2, S4 in S5 po času. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti treh meritev in standardne napake. Grafikon v obliki stolpcev, ki vsebuje iste podatke kot grafikon s krivuljo, smo dodali z namenom prikaza standardnih napak, ki bi bile na grafikonu s krivuljo nepregledne.

4.2 KONCENTRACIJA DNK

Vse koncentracije, z izjemo vzorcev osebe S5 na dan 3, so med 10 µg/ml in 20 µg/ml.

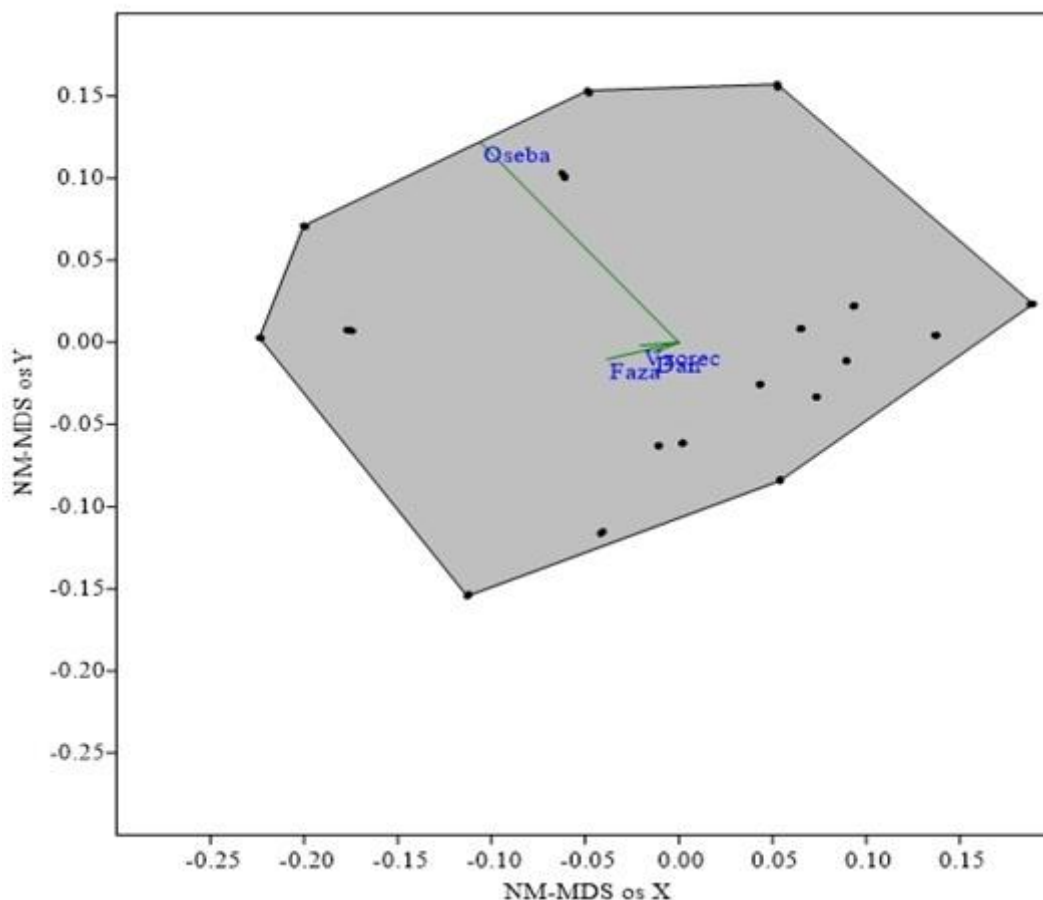
Preglednica 5: Koncentracija DNK.

Oseba	Dan vzorčenja	Koncentracija DNK µg/ml	Standardna napaka µg/ml
S2	-5	10,9	0,39
S2	-1	12,8	0,45
S2	3	16,8	0,53
S2	10	14,0	0,65
S2	18	13,9	0,54
S2	21	13,6	0,52
S4	-5	10,7	0,45
S4	-1	11,5	0,55
S4	3	13,1	0,60
S4	10	10,3	0,77
S4	18	10,4	0,49
S4	21	12,1	0,42
S5	-5	15,4	0,57
S5	-1	14,9	0,43
S5	3	8,6	0,55
S5	10	13,4	0,41
S5	18	10,7	0,63
S5	21	10,3	0,58

4.3 ORDINACIJSKA ANALIZA

4.3.1 Fizikalno-kemijski parametri

Slika 18 prikazuje ordinacijsko analizo fizikalno-kemijskih parametrov. Kot faktorje smo uporabili Osebo, Vzorec, Dan in Faza (pomen posameznega faktorja je razložen pod sliko). Površina grafa je relativno velika, kar pomeni, da so fizikalno-kemijski parametri med osebami raznoliki. Za ta raztros podatkov je najbolj pomemben faktor Oseba, po tem pa faktor Faza. Najmanjša povezava med fizikalno-kemijskimi parametri je s faktorji Dan in Vzorec. Faktorji Vzorec, Dan in Faza pozitivno korelirajo.



Slika 18: Ordinacijska analiza fizikalno-kemijskih parametrov vseh oseb v vseh časih s tehniko NM-MDS.

Parametri, vključeni v analizo: pH, CTOO, Redukcijski sladkorji, Vodni delež, *Sr*, Faza***, Vzorec*, Oseba, Dan**, Etanojska kis., Propanojska kis., Butanojska kis., Izobutanojska kis., Pentanojska kis., Izopentanojska kis., Heksanojska kis., Celokupne HMK. Uporabljen Indeks je Euclidijski. Shepard plot: napetost=0,083 R^2 os1: 0,639 in os2: 0,239.

*Parameter Vzorec predstavlja dan vzorčenja ne glede na razliko med dnevi odvzetega blata (označili smo jih z 1,2,3,4,5,6).

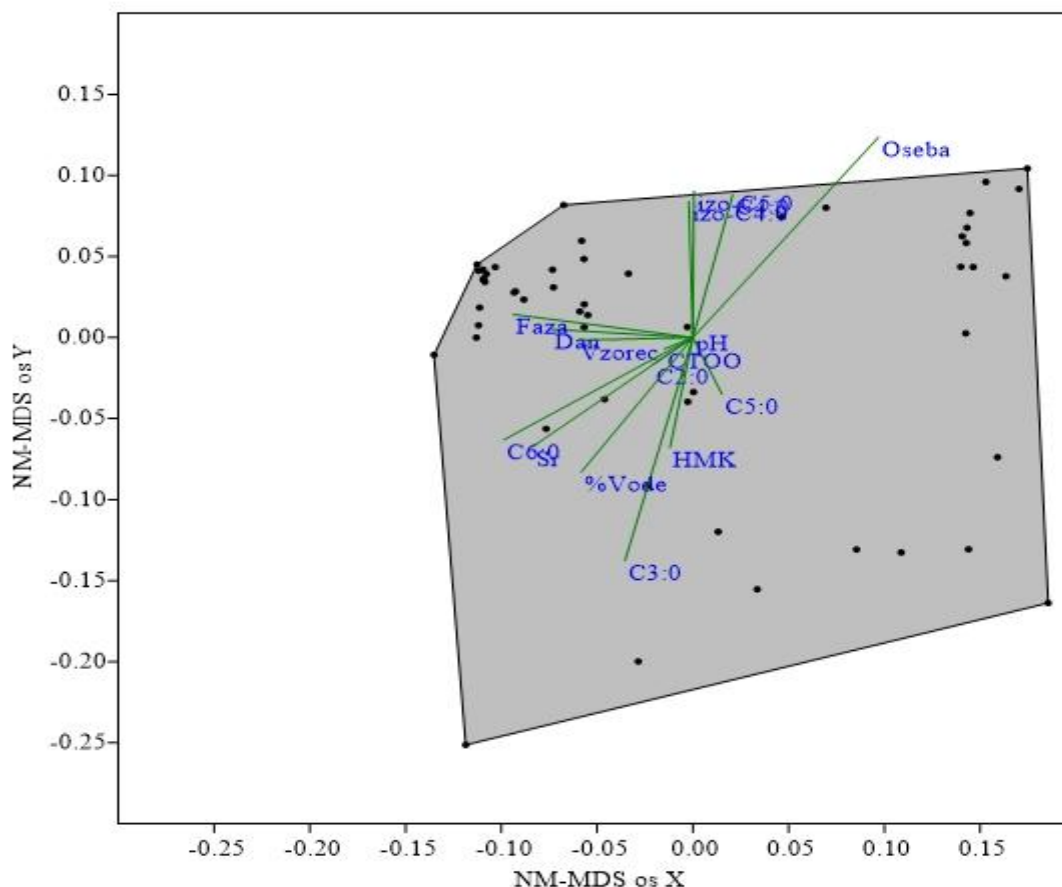
**Parameter Dan je dejanski dan vzorčenja v celotni raziskavi, ki traja 28 dni (če je vzorec odvzet na dan -5 je to dejansko tretji dan raziskave, če je odvzet na dan 1 je to 8 dan raziskave ipd.)

***Parameter Faza opisuje razlike v vseh razmerah med prvo in drugi fazo raziskave. Fazo I smo označili z 0, Fazo II smo označili z 1.

4.3.2 Mikrobna združba

Kot vidimo na Sliki 19, je površina grafa relativno velika, kar pomeni, da je raztros mikrobne združbe velik. Kljub temu vidimo, da se večina mikrobnih združb nahaja v eni od dveh večjih gruč (na Sliki 19 levo in desno zgoraj). Največjo povezavo vidimo med mikrobno združbo in faktorjem Oseba. Temu sledi propanojska kislina. Nekoliko manjša povezava je med raznolikostjo mikrobne združbe in deležem vode, *Sr* ni heksanojsko

kislino. Ti trije faktorji pozitivno korelirajo. Tudi Faza, butanojska kislina, izobutanojska kislina in izopentanojska kislina kažejo povezavo z raznolikostjo mikrobne združbe. Od teh zadnje tri pozitivno korelirajo. Ostali faktorji imajo manjši pomen oz. je povezava med njimi in mikrobno združbo manjša.



Slika 19: Ordinacijska analiza mikrobne združbe vseh oseb v vseh časih s tehniko NM-MDS.

Parametri vključeni v analizo: pH, CTOO, Redukcijski sladkorji, Vodni delež, *Sr*, Faza***, Vzorec*, Oseba, Dan**, Etanojska kis., Propanojska kis., Butanojska kis., Izobutanojska kis., Pentanojska kis., Izopentanojska kis., Heksanojska kis., Celokupne HMK. Uporabljen Indeks je Bray-Curtis. Shepard plot: napetost=0,161 R^2 os1: 0,570 in os2: 0,309.

*, **, *** parametri so opisani pod sliko 18.

5 RAZPRAVA

Vrednosti pH, ki odstopajo od normalnih, so lahko pokazatelj bolezni. Višji pH je pokazatelj nepravilnega delovanja prebavil in proizvodnje kislin. Kisel pH je lahko posledica malabsorpcije OH. Ugotovili so, da pri kritično bolnih pacientih relativno majhna sprememba pH za eno vrednost drastično poveča možnosti bakteriemije in smrti (Osuka in sod., 2012).

V naši raziskavi so vsi preiskovanci imeli normalne vrednosti pH v blatu, ki so med 6 in 7,2 kar je normalno, saj so bili ob začetku raziskave vsi zdravi. Predvidevali smo, da se bo pH med raziskavo pri vsaki osebi znižal, saj se kot posledica mirovanja poveča produkcija HMK, ki vpliva na nižanje pH (Balamurugan in sod., 2014) vendar do tega ni prišlo.

Schwartz in sod. (2014) so izmerili, da imajo osebe brez problemov s telesno težo $59,1 \pm 14,2$ % etanojske kisline, $16,1 \pm 6,1$ % propanojske kisline, $16,7 \pm 8,9$ % butanojske kisline, $2,1 \pm 1,1$ % izobutanojske kisline, $3,2 \pm 2,5$ % izopentanojske kisline in $2,2 \pm 0,8$ % pentanojske kisline. Rezultati naših analiz so zelo podobni njihovim rezultatom, vendar obstajajo manjše razlike (predvidevamo, da je razlog ta, da v analizo celokupnih HMK v njihovi študiji niso vključili heksanojske kisline). Izrazita razlika je vidna le pri osebi S5, ki ima zelo visoke koncentracije butanojske kisline. Ta rezultat ni presenetljiv, saj je bila v drugih raziskava ugotovljena povečana koncentracija butanojske kisline pri osebah, ki imajo probleme s telesno težo (razvijejo se kot posledica stacionarnega življenja – stanje v katerem so bili naši preiskovanci skozi trajanje raziskave) (Rosenbaum in sod., 2015; Schwartz in sod., 2010).

Pričakovali smo, da se bodo med raziskavo povečevale koncentracije celokupnih HMK, etanojske, propanojske in izopentanojske kisline, saj je tudi to značilno za osebe s prekomerno telesno težo oz. za zaprte osebe (v primeru izopentanojske kisline) (Rosenbaum in sod., 2015; Schwartz in sod., 2010; Kang in sod., 2015). Pri osebi S2 pride do povečanja etanojske in izopentanojske kisline, pri osebi S4 propanojske kisline, pri osebi S5 pa izobutanojske kisline. To je dokaz, da mirovanje vpliva na spremembo v produkciji nekaterih HMK, katerih povečana proizvodnja je značilna za osebe, ki imajo probleme s telesno težo.

Pri osebi S2 koncentracija celokupnih HMK po času pada, kar je nasprotno od pričakovanj. Pri osebah S4 in S5 je koncentracija celokupnih HMK na koncu raziskave nekoliko višja kot na začetku. Razlogov za take rezultate je lahko veliko, saj na proizvodnjo HMK vplivajo prehrana, mikrobná združba in tranzicijski čas (Wong in Jenkins, 2007) ter mnogi drugi parametri. Pomemben je tudi način določanja HMK. Direktno merjenje koncentracije HMK v blatu ni najbolj zanesljiv pokazatelj dejanske produkcije HMK v črevesju saj le-te zelo hitro porabijo celice črevesne sluznice (Remely in sod., 2014), vendar pa, sodeč po

literaturi, validirane *in vitro* tehnike za meritve produkcijskega potenciala kislin v človeškem blatu še niso bilo razvite.

V našem primeru so imele vse osebe enake jedilnike, enako okolje, bile v stiku z istim osebjem, v istem času, pod medicinskim nadzorom. Razlika je bila le v različni dnevni količini vnesenih OH, maščobnih kislin ter proteinov (Priloga B), kar je bila izbira vsakega posameznika individualno, kar je lahko vplivalo na spremembo v koncentraciji HMK. Posledično sta prehrana ter gibanje glavna faktorja, zaradi katerih je prišlo do razlik v HMK med osebami.

Pri preučevanju koncentracije HMK oseb z in brez problemov s telesno težo so Rahat-Rozenbloom in sod. (2014) prišli do zanimivega odkritja. Ugotovili so, da se pri debelih osebah koncentracija etanojske kisline povečuje z večjim vnosom energije, dietnih vlaknin in maščob, medtem ko se pri osebah brez problemov s telesno težo koncentracija HMK v teh situacijah zmanjšuje. Razlog povečane koncentracije HMK pri debelih osebah ni zmanjšana absorpcija HMK (ne produkcija), saj so pokazali, da ta ostane ista pri eni in drugi skupini ljudi. Pokazali so tudi, da razlike v prehrani niso značilno vplivale na spremembo HMK. Predvidevajo, da je razlog za razliko v koncentraciji HMK med osebami z in brez problemov s telesno težo, večja vsebnost bakterij iz debla Firmicutes, ki bolj učinkovito fermentirajo substrate. Pri ugotavljanju koncentracij HMK so Rahat-Rozenbloom in sod. (2014) prilagodili izmerjene koncentracije glede na starost, saj obstaja izrazita negativna korelacija med starostjo in koncentracijo HMK. V naši raziskavi nismo opazili negativne korelacije med starostjo in koncentracijami HMK, saj so le-te med preiskovanci zelo podobne - ob začetku raziskave je oseba S2 imela 41 let, oseba S4 26 let in oseba S5 31 let.

Prostovoljci naše raziskave so bili izbrani in medicinsko pregledani ter predstavljajo tipizirano subpopulacijo z bolj enakomernimi lastnostmi od naključno izbrane skupine ljudi. Ker so v času poteka raziskave živeli v strogo kontroliranih razmerah in imeli po meri narejene in standardizirane jedilnike, smo pričakovali, da bodo velikosti topnih organskih spojin pri vseh preiskovancev podobne. Za ugotavljanje le-teh smo uporabili faktor S_r , saj so pri spektrih, uporabljenih za ugotavljanje le-tega, opazili največjo variacijo med različnimi vzorci. $S_{(275nm-295nm)}$ in S_r korelirata z molekulsko maso in naraščata s povečanjem frakcije z nizko molekulsko maso (<1000 Da). S_r ni odvisen od koncentracije organskih spojin v vzorcu.

Metoda določanja S_r je hitra, ponovljiva in enostavna (Helms in sod., 2008). Naše vrednosti S_r so pod 1,6. To pomeni, da so v blatu prisotne organske spojine z nizko molekulsko maso (<1.000 Da) to pa je v skladu s pričakovanji, saj mikroorganizmi prebavi razgrajujejo hrano na nizkomolekularne spojine, kot so folat, butirrat, acetat in biotin (Paul in sod., 2015). Med raziskavo so se S_r vrednosti minimalno spremenile.

Osebe, ki imajo problem s telesno težo, proizvajajo več encimov, ki razgrajujejo hrano na nizkomolekularne spojine in jim omogočajo boljši energetski izkoristek (Musso in sod., 2010), zato smo pričakovali, da bodo vrednosti *Sr* po času naraščale. Končne vrednosti *Sr* vseh oseb so zelo podobne. To je lahko posledica navajanja in spremembe črevesne mikrobiote na stacionarni način življenja. Razlogi za pridobljene rezultate, ki so podobni ves čas raziskave, so verjetno razlika v humani fiziologiji, tranzicijskem času in zauživanje različne količine hrane pri posameznikih.

Koncentracije raztopljenega celokupnega organskega ogljika so med posamezniki ter v različnih časovnih točkah zelo podobne. To pomeni, da mirovanje ni imelo velikega vpliva na le-te. Pri interpretaciji rezultatov pa moramo upoštevati standard, ki smo ga uporabili za končne izračune. V našem primeru je to glukoza. Za umeritveno krivuljo smo v manjšem ločenem eksperimentu (podatki niso prikazani) določili signal za huminske kisline v istih koncentracijah kot pri glukozi, z namenom ugotoviti, kakšna je razlika v umeritveni krivulji, če se uporabi standard v bolj oksidirani obliki od glukoze. Z uporabo drugega bistveno bolj oksidirane standarda smo dobili 20 % nižje vrednosti od vrednosti, izračunanih iz umeritvene krivulje z glukozo. To kaže, da se odčitki koncentracije raztopljenega skupnega organskega ogljika lahko razlikujejo zaradi spreminjanja sestave tega ogljika, kar kaže, da bi bilo bolj smiselno uporabljati bolj kompleksno sestavljen standard, ki bi odražal raznovrstnost organskih spojin v preiskovanem vzorcu (standardna sestava SCFA, sladkorji, lipidi, topni polimeri, polifenoli, steroli), in ki bi bolje odražal njihovo kemijsko interakcijo v črevesju.

Podobne rezultate kot pri določanju organskih spojin smo pridobili pri določanju redukcijskih sladkorjev, kjer smo opazili minimalno spremembo v njihovi koncentraciji tako med osebami, kot tudi med različnimi dnevi pri isti osebi. Koncentracije redukcijskih sladkorjev so nizke, kar je v skladu s pričakovanji, saj se monosaharidi in disaharidi absorbirajo že v tankem črevesu, polisaharide in oligosaharide pa uporabijo bakterije debelega črevesa za fermentacijo (Cummings, 1997).

Pričakovali smo, da bodo koncentracije sladkorjev in organskih spojin s časom padale, saj imajo osebe s povečano telesno težo manj energetskih spojin v blatu, ker imajo boljši energetski izkoristek. To je posledica povečanega prepisovanja genov, ki omogočajo razgradnjo kompleksnih polisaharidov (Tremaroli in Bäckhed, 2012). Pri njih narašča koncentracija glikozidnih hidrolaz, ki razgrajujejo drugače nerazgradljive ogljikove hidrate, transportnih proteinov in encimov, ki so vpleteni v vnos in fermentacijo enostavnih sladkorjev in gostiteljevih glikanov. To gostiteljem omogoča večji izkoristek energije iz zaužite hrane (Musso in sod., 2010).

Pri določanju deleža vode v blatu smo dobili rezultate, ki so nižji od splošno privzetega povprečja 72 %. To ni presenetljivo, saj je bilo že pred tem ugotovljeno, da mirovanje

povzroči podaljšane tranzicijske čase (Iovino in sod., 2013). Posledično je zaradi tega prisotno manj vode v blatu. Pričakovali smo, da naj bi vrednosti s časom padale pri vseh osebah, vendar smo konstanten padec opazili samo pri osebi S2. Zaradi istih jedilnikov lahko hrano izključimo kot vzrok variacije v odstotku vode v blatu. Razlog za le-to je verjetno razlika v humani fiziologiji posameznika, ter njenem odzivu na mirovanje.

Vsi zgoraj naštetih fizikalno-kemijski parametri so povezani v metabolni splet s številnimi drugimi dejavniki, kot so črevesna mikrobiota, gibanje, prehrana, stres, genetika, fenotip, zato ne preseneča, da tudi tranzicijski čas igra pomembno vlogo. Ne glede na dejstvo, da so v nekaterih raziskavah izmerili, da je tranzicijski čas oz. čas potreben, da hrana prepotuje iz ust do zadnjika lahko tudi do tri dni (Wagener in sod., 2004; Cummings, 1997; Stephen in sod., 1987), se raziskovalci še vedno (in že 30 let) trudijo odgovoriti na vprašanje, kateri je dejansko "normalni" tranzicijski čas. Pri večini raziskav je prišlo do statističnih težav, zaradi katerih ni bilo možno določiti ene vrednosti oz. enega časa (Wilson, 2010) iz različnih razlogov: oblika hrane, vrsta priprave hrane, vrsta škroba, prisotnost antinutrientov (npr. α -amilazni inhibitor), količina vlaknin, maščob in proteinov (Wong in Jenkins, 2007).

S pomočjo ordinacijskih analiz smo ugotavljali hierarhijo dejavnikov, ki so povezani s preiskovanimi spremenljivkami. Pokazali smo, da se fizikalno-kemijski parametri spreminjajo skozi čas in da so lastnosti posameznika (humana fiziologija) najmočnejše povezane z razpršenostjo mikrobne združbe in fizikalno-kemijskih parametrov. Pri NM-MDS analizi fizikalno-kemijskih parametrov smo poleg faktorja Oseba uporabili še faktorje Faza, Dan in Vzorec, ki so povezani s strukturo eksperimenta. Pokazali smo, da ti parametri proporcionalno razložijo sicer čedalje manjši del opažene variabilnosti v fizikalno-kemijskih parametrih, a glede na pravokotno usmeritev vektorjev lahko sklepamo, da so povezani z drugim, od parametra Oseba neodvisnim, delom variabilnosti.

Poleg individualnih karakteristik posameznika je raznolikost mikrobne združbe zelo močno povezana s propanojsko kislino. To ni presenetljivo, saj je propanojska kislina pomembna za človeka, ker zagotavlja energijo za jetra. Drugi razlog je mogoče ta, da se koncentracija te kisline povečano proizvaja pri osebah s prekomerno telesno težo in zato tudi njena proizvodnja vpliva na raznolikost mikrobne združbe pri dolgotrajnem mirovanju (kot že omenjeno, nismo izmerili povečane koncentracije propanojske kisline saj merjenje HMK v blatu ni najboljši pokazatelj dejanske proizvodnje HMK). Naši rezultati kažejo, da propanojska kislina negativno korelira z butanojsko, izobutanojsko in izopentanojsko kislino, kar pomeni, da se s povečanjem njene koncentracije zmanjša koncentracija ostalih treh. Te tri kisline so nekoliko manj povezane z mikrobno združbo, vendar je korelacija še vedno značilna. Pridobljeni rezultati se delno ujemajo z rezultati, ki so jih pridobili Siigur in sod. (1994). Oni so namreč pokazali pozitivno korelacijo med etanojsko, propanojsko in butanojsko kislino, ter pozitivno korelacijo med izobutanojsko in izopentanojsko kislino.

Pokazali so tudi, da izopentanojska in izobutanojska kislina ne korelirata s celokupnimi HMK ter imata izrazito negativno korelacijo z vodnim deležem. Mi smo potrdili vse rezultate razen tega, da butanojska kislina pozitivno korelira z propanojsko in etanojsko. Razlika med našo in njihovo raziskavo je v tem, da so naši preiskovanci samo moški, ki so 21 dni mirovali, medtem ko je v njihovi raziskavi sodelovalo veliko več ljudi (93), moških in žensk, ki so se normalno gibali.

Pomembno povezavo smo opazili tudi med heksanojsko kislino, faktorjem *Sr*, vodnim deležem in faktorjem Faza ter raznolikostjo mikrobne združbe. To pomeni, da imajo prehrana oz. velikost organskih molekul, ki so dostopne MO kot vir hrane, koncentracija heksanojske kisline, voda, ki je nujno potrebna za razmnoževanje mikroorganizmov kot tudi pogoji življenja - mirovanje/zmanjšani parcialni tlak O₂, pomembno vlogo pri razpršenosti mikrobne združbe naših preiskovancev.

Pričakovali bi, da se bo proti koncu eksperimentalne faze struktura mikrobne združbe spremenila in bo drugačna od začetnega stanja, saj imajo aktivne osebe praviloma večjo raznolikost mikrobne združbe v primerjavi z neaktivnimi osebami (Aron-Wisnewsky in Clément, 2015; Clarke in sod., 2014; Zhao, 2013). V naših analizah se struktura mikrobnih združb, določena s hitrimi tipizacijskimi tehnikami pred in po eksperimentalni fazi razlikovala vendar ne signifikantno ($p=0,33$, podatki niso prikazani). Če bi želeli ugotoviti, kateri MO so prisotni v blatu preiskovancev, bi morali uporabiti bolj sofisticirane metode kot je globinsko sekvenciranje filogenetskih markerjev 16S rRNA bakterij in arhej oziroma celotnih metagenomov.

V preteklih analizah oseb s prekomerno težo so raziskovalci opazili spremembe mikrobne združbe skozi čas, ki so bile posledica povečanja števila bakterij iz debela Firmicutes in *Proteobacteria* ter zmanjšanja števila bakterij iz debela Bacteroidetes (Musso in sod., 2010; Rahat-Rozenbloom in sod., 2014; Zhao, 2013). Do takih sprememb pride predvsem pri neaktivnih osebah in osebah, ki imajo probleme s telesno težo. V poskusih z mišmi so pokazali, da pri debelih miših ne pride do povečanja vseh pripadnikov debela Firmicutes. Signifikantno se poveča število bakterij iz razreda Mollicutes (Zhao, 2013). Bakterije iz družin *Enterobacteriaceae* in *Desulfovibrionaceae* (deblo *Proteobacteria*) so v večjih deležih prisotne pri osebah s prekomerno telesno težo. Te proizvajajo LPS in endotoksine, s čemer izzovejo vnetje v gostitelju in vplivajo na razvoj inzulinske rezistence (Zhao, 2013). Pri zdravih osebah brez problemov s telesno težo, se poveča število bakterij vrste *Akkermansia muciniphila*. Te se nahajajo v črevesni sluznici in imajo verjetno vlogo v zaščiti črevesja pred vdorom tujkov (Clarke in sod., 2014; Schneeberger in sod., 2015).

Zavedamo se, da je mirovanje preiskovancev trajalo samo 21 dni, kar je seveda neprimerljivo manj kot pri osebah, ki imajo probleme s telesno težo, pri katerih se je debelost razvijala in je prisotna več let ali celo desetletij. Nasprotno, naša študija omogoča

unikaten in kontroliran vpogled v začetno dogajanje ob prehodu v neaktivnost, to je v morebitne spremembe ključnih metabolitov (HMK, sladkorji, IMW, TSOC,...) ter mikrobnih združbah v fecesu pred in po izpostavljanju mirovanju.

V povezavi z zbranimi podatki o spremembah v sestavi humanega telesa, humani fiziologiji, sistemskem stresnem odzivu (podatkovna baza preiskovancev, IJS, konzorcij EU FP7 projekta PlanHab) na teh istih preiskovancih v istem eksperimentu, lahko izluščimo, da so spremembe na nivoju metabolitov in mikrobiote neprimerno manjše od opaženih sistemskih sprememb v človeškem telesu, ki so značilne za osebe s problemi s telesno težo, vendar so zaradi svojega relativno kratkega časa izpostavitve v tem eksperimentu še reverzibilne. Te spremembe vključujejo naslednje spremembe: mišična atrofija, zmanjšana mineralizacija kosti, izplavljanje Ca^{2+} , daljši tranzicijski časi fecesa, sprememba strukture oz. premera arterij, povečani krvni pritisk in koncentracija lipidov (holesterola, trigliceridov) v krvi, zmanjšana saturacija O_2 , depresija, razvoj inzulinske rezistence, povečana koncentracija glukoze v krvi, nizkointenzivno sistemski vnetni odziv, drastičen upad encimskih in ne-encimskih antioksidativnih obrambnih mehanizmov, povečanje vnetnih markerjev TNF α in IL6 (Debevec in sod., 2014a, 2014b; Biolo in sod., 2008; Agostini in sod., 2008; Berg in sod., 2007; Eiken in sod., 2008; Iovino in sod., 2013; Hamburg in sod., 2007; Ortiz in Kwo, 2015; Keramidas in sod., 2016; Simpson in sod., 2016; Rittweger in sod., 2016; Mekjavic in sod., 2016; Nektarios in sod., 2015).

Iz pridobljenih rezultatov lahko vidimo, da so humana fiziologija, mikrobnna združba ter metabolno stanje v prebavilih zelo kompleksni sistemi že vsak zase, njihove interakcije pa so še veliko bolj kompleksne, saj sistemi tudi medsebojno vplivajo en na drugega. Pri tem na vsakega od njih vplivajo številni parametri. Čeprav so v raziskavi sodelovale izbrane zdrave osebe, ki so predstavljale precej homogeno subpopulacijo in so živele pod istimi pogoji ter se prehranjevale z isto hrano, je vseeno prišlo do razlik tako med fizikalno-kemijskimi parametri kot tudi mikrobnno združbo med posamezniki. V času mirovanja namreč na fizikalno-kemijske parametre in mikrobnno združbo ni vplivalo le mirovanje, ampak tudi veliko drugih parametrov, kot so lastne karakteristike posameznega preiskovanca (genetika, fenotip), predhodno prisotna črevesna mikrobiota, količina vnesene hrane, tranzicijski čas, starost in morda še številni drugi parametri, ki bi jih v naslednjih raziskavah bilo tudi smiselno vključiti.

Pokazali smo, da je neaktiven način življenja poleg individualnih karakteristik posameznika pomemben dejavnik za razpršenost fizikalno-kemijskih parametrov, vendar pa nismo zaznali značilnih razlik med dvema definiranimi množicama, to je začetnim in končnim stanjem v eksperimentu, kjer vsaka množica vsebuje dva dneva. Neaktivnost je še nekoliko manj pomembna za razpršenost strukture bakterijske črevesne mikrobiote.

Predvidevamo, da bi z drugimi naprednejšimi tehnikami z večjo resolucijo, s katerimi raziskujejo metagenome, metatranskriptome in metabolome, pridobili bolj podrobne podatke tako o sestavi in funkcionalnih genih mikrobiote kot tudi o metabolitih in humanih markerjih v preiskovanih vzorcih (polifenoli, steroli, faktorji vnetja, celotni fekalni metabolomi).

Prav tako ni bilo možno spremljati vzorcev iz vsakega dneva raziskave, kar bi nedvomno ustrezno povečalo število vzorcev v analizah časovnega zaporedja in s tem resolucijo nihanj v opazovanih parametrih. Te možnosti nismo imeli zaradi naraščajoče zaprtosti preiskovancev v eksperimentu mirovanja in posledično čedalje manj pogostega odvajanja blata, kar po svoje odraža fiziološke spremembe v človeškem telesu. Zaradi velike heterogenosti obrokov v zadrževanem blatu se pojavlja problem heterogenosti vzorca pri ekstrakciji DNK.

Mikrobiota je za človeka izjemno pomembna, saj poleg tega, da oskrbuje človeka z energijo in pomembnimi spojinami, kot so recimo vitamini, vpliva na razvoj imunskega sistema, na vedenje oseb, fiziologijo (Sommer in Bäckhed, 2013; Collins in sod., 2012). Zato je znanje o črevesni mikrobioti in njenem vplivu na telo ključnega pomena in nam bo proučevanje le-te pomagalo razviti nove pristope pri zdravljenju bolezni, ki so povezane z disbiozo mikroorganizmov. Najverjetneje pa na disbiozo najbolj vplivajo začetne odločitve gostitelja in dolgoročni slog življenja.

6 SKLEPI

- Fizikalno-kemijski parametri in struktura bakterijske mikrobne združbe blata so se med eksperimentom spreminjali in so se med preiskovanci razlikovali.
- Variabilnosti fizikalno-kemijskih parametrov in strukture bakterijske mikrobne združbe blata sta vsaka zase najbolj povezani z individualnimi karakteristikami posameznika.
- Variabilnosti fizikalno-kemijskih parametrov in strukture bakterijske mikrobne združbe blata sta vsaka zase dodatno povezani z neaktivnostjo.
- Z variabilnostjo strukture mikrobnih združb blata je izrazito povezana tudi vsebnost hlapnih maščobnih kislin, predvsem propanojske.
- Statistično gledano v vrednosti fizikalno-kemijskih parametrov in strukturi mikrobnih združb blata ni signifikantnih razlik med začetnim stanjem pred mirovanjem ter stanjem po mirovanju.
- Spremembe v merjenih fizikalno-kemijskih parametrih blata pred in po 21 dnevih mirovanja niso signifikantne, vsaj ne v rezultatih, pridobljenih z uporabljenimi tehnikami in z merjenimi ključnimi parametri.
- Spremembe v strukturi bakterijske mikrobne združbe blata pred in po 21 dnevih mirovanja niso signifikantne, v obsegu, da bi to lahko zaznali z uporabljenimi tehnikami.
- Spremembe v humani fiziologiji pred in po 21 dnevih mirovanja so zaznali sodelavci projekta PlanHab in jih opisali v svojih objavah. Te spremembe so bile reverzibilne. Čas mirovanja 21 dni je kratek, vendar pa ravno to kaže, da se na ravni človeške fiziologije dogajajo razne spremembe na račun neaktivnosti, na strukturi mikrobiote in fizikalno-kemijskih parametrih fecesa pa ne.
- Za razvoj težko reverzibilne/ireverzibilne debelosti je potrebna daljša neaktivnost od 21 dni, pri čemer se negativne spremembe na humani fiziologiji zgodijo že bistveno prej, enaki simptomi večje jakosti pa so prisotni pri akutni debelosti in drugih boleznih prekomerne prehranjenosti.
- Sklepamo, da je za pojav debelosti namesto okužbe s patogenimi mikroorganizmi bolj pomembna začetna odločitev gostitelja, da miruje, kar povzroči spremembe v fiziologiji človeka, ki vodijo do sprememb razmer v GIT, te pa v spremenjene kompetitivne odnose med mikroorganizmi, spremembe v obnašanju komenzalnih mikroorganizmov, ter posledično v možnosti za infekcijo z alohtonimi mikroorganizmi, ki poženejo novo spiralo. Kar pomeni, da je za spremembe mikrobiote potrebnega več časa, da se le-te zgodijo, dočim na humani fiziologiji pride do odziva že bistveno prej. Torej najverjetneje ni okužba tista, ki povzroča debelost, ampak zaradi mirovanja spremenjena humana fiziologija, ki naredi prostor za delovanje patogenih mikroorganizmov v naslednjih ciklih neaktivnosti.

7 POVZETEK

Neaktivni način življenja je v današnjem času vse bolj prisoten zaradi razvoja tehnologije, povečanega števila služb, v katerih je potrebno večurno sedenje, prevoznih sredstev ipd.. Ta vpliva na spremembe v človeški fiziologiji, zaradi katerih pride do razvoja številnih zdravstvenih težav in obolenj. Iz tega razloga se iz leta v leto povečuje število oseb, ki imajo probleme s telesno težo, pri katerih se razvije metabolni sindrom ali diabetes tipa 2. Poleg spremenjenih fizioloških lastnosti se pri teh osebah spremeni tudi mikrobna združba prebavil. Osebe, ki imajo težave s telesno težo, imajo pogosto zmanjšano raznolikost mikrobne združbe, a povečano vsebnost bakterij iz debel Firmicutes in Proteobacteria ter zmanjšano vsebnost predstavnikov iz debla Bacteroidetes v primerjavi z osebami, ki teh težav nimajo. Zato smo se odločili, da v naši raziskavi preverimo vpliv mirovanja na spremembo mikrobne združbe in fizikalno-kemijskih parametrov, ki predstavljajo njihovo okolje. Uporabili smo vzorce blata treh zdravih moških v šestih različnih časovnih točkah. Ti so živeli v strogo kontroliranih in enakih razmerah. Vse dnevne aktivnosti (tudi npr. tuširanje) so opravljali horizontalno. Prehranjevali so se z enakimi, po meri narejenimi, standardiziranimi jedilniki.

V vzorcih smo od fizikalno-kemijskih parametrov ugotavljali pH, velikost topnih organskih spojin, koncentracijo celokupnega topnega organskega ogljika in redukcijskih sladkorjev, koncentracijo celokupnih in posameznih hlapnih maščobnih kislin (HMK) ter delež vode. Za ugotavljanje sestave mikrobne združbe smo najprej izolirali DNK in jo kvantificirali. Zatem smo gene za 16S rRNK namnožili z metodo LH-PCR. Podvojene gene smo analizirali z avtomatskim sekvenatorjem. Rezultate, ki smo jih pridobili, smo obdelali s programoma R in PAST. Za pridobitev končnih ordinacijskih analiz smo uporabili metodo NM-MDS.

Ugotovili smo, da se mikrobna združba in fizikalno-kemijski parametri med osebami in v različnih časovnih točkah razlikujejo. Pokazali smo tudi, da so sestava mikrobne združbe in fizikalno-kemijski parametri najbolj povezani z individualnimi karakteristikami posameznika. Pomembna korelacija je tudi med omenjenimi parametri in stacionarnim načinom življenja. Raznolikost mikrobne združbe je močno povezana še z HMK, zlasti s propanojsko kislino. Pokazali smo, da se v času kratkotrajnega mirovanja mikrobna združba in fizikalno-kemijski parametri ne spremenijo signifikantno, kar je dokaz njihove stabilnosti. Po drugi strani so številni raziskovalci zaznali različne spremembe v humani fiziologiji v kratkem času (nekaj dni do nekaj tednov) kot posledico stacionarnega življenja, vendar so te bile še vedno reverzibilne. Iz tega lahko sklepamo, da je razvoj metabolnega sindroma, povečane telesne teže ipd., posledica lastne izbire dolgotrajnega ne aktivnega življenja, ki povzroča spremembo v humani fiziologiji. Posledično pride tudi do sprememb mikrobne združbe in fizikalno-kemijskih parametrov.

8 VIRI

- Abdo Z., Schüette U. M. E., Bent S. J., Williams C. J., Forney L. J., Joyce, P. 2006. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environmental Microbiology*, 8, 5: 929–938
- Agostini F., Dalla Libera L., Rittweger J., Mazzucco S., Jurdana M., Mekjavic I.B., Pisot R., Gorza L., Narici M. V., Biolo G. 2010. Effects of inactivity on human muscle glutathione synthesis by a double-tracer and single-biopsy approach. *European Journal of Applied Physiology*, 588, 24: 5089-5104
- Allen H. 1976. Dissolved organic matter in lakewater: characteristics of molecular weight size-fractions and ecological implications. *Oikos*, 27, 1: 64–70
- Aron-Wisnewsky J., Clément K. 2015. The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. *Nature Reviews Nephrology*, 12, 3: 169–181
- Balamurugan R., Balachandar G.M., Dharmalingam T., Mortimer E.K., Gopalsamy G., Woodman R., Alpers D.H., Manary M., Binder H., Brown I., Young G.P., Ramakrishna B.S. 2014. Effect of native and acetylated high amylose maize starch on fecal pH and short chain fatty acid concentrations in a cohort of children in southern India. *Gastroenterology*, 146, 5: S-482- S-482
- Başkan K. S., Tütem E., Akyüz E., Özen S., Apak R. 2016. Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction. *Talanta*, 147: 162–168
- Berg H. E., Eiken O., Miklavcic L., Mekjavic I. B. 2007. Hip, thigh and calf muscle atrophy and bone loss after 5-week bedrest inactivity. *European Journal of Applied Physiology*, 99, 3: 283–289
- Biocompare. 2007. 3100 Genetic analyzer from applied biosystems. San Francisco, Biocompare: 1 str.
<http://www.biocompare.com/Product-Reviews/41105-3100-Genetic-Analyzer-From-Applied-Biosystems/> (junij 2016)
- Biolo G., Agostini F., Simunic B., Sturma M., Torelli L., Preiser J.C., Deby-Dupont G., Magni P., Strollo F., di Prampero P., Guarnieri G., Mekjavic I.B., Pišot R., Narici M. V. 2008. Positive energy balance is associated with accelerated muscle atrophy and increased erythrocyte glutathione turnover during 5 wk of bed rest. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 4: 950–958
- Brown M. 1977. Transmission spectroscopy examinations of natural waters: C. Ultraviolet spectral characteristics of the transition from terrestrial humus to marine yellow substance. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 5, 3: 309–317
- Carder K. L., Steward G. R. 1989. Marine humic and fulvic acids: their effects on remote sensing of ocean chlorophyll. *Limnology and Oceanography*, 34, 1: 68–76
- Clarke K. R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18, 1: 117–143

- Clarke S.F., Murphy E.F., O'Sullivan O., Lucey A.J., Humphreys M., Hogan A., Hayes P., O'Reilly M., Jeffery I.B., Wood-Martin R., Kerins D.M., Quigley E., Ross R.P., O'Toole P.W., Molloy M.G., Falvey E., Shanahan F., Cotter P.D. 2014. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*, 63, 12: 1913–1920
- Clescerl L. S., Greenberg A. E., Eaton A. D. 1999. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington, American Public Health Association: 1325 str.
- Codex Alimentarius Commission. 2015. Guidelines on nutrition labelling CAC/GL 2-1985: 1–9
- Collins S. M., Surette M., Bercik P. 2012. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 11: 735–742
- Conlon M., Bird A. 2014. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*, 7, 1: 17–44
- Cummings J. H. 1997. The large intestine in nutrition and disease. Bruxelles, Institute Danone: 149 str.
- Dao M. C., Everard A., Clément K., Cani P. D. 2015. Losing weight for a better health: role for the gut microbiota. *Clinical Nutrition Experimental*, 6: 39–58
- Debevec T., Bali T. C., Simpson E. J., Macdonald I. A., Eiken O., Mekjavic I. B. 2014a. Separate and combined effects of 21-day bed rest and hypoxic confinement on body composition. *European Journal of Applied Physiology*, 114, 11: 2411–2425
- Debevec T., Simpson E. J., Macdonald I. A., Eiken O., Mekjavic I. B. 2014b. PlanHab: Energy expenditure and appetite sensation during hypoxic bedrest. Proceedings from 35th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Waterloo, 16. - 20. junij 2014. Waterloo, University of Waterloo: 1-2
- De Haan H., De Boer T. 1987. Applicability of light absorbance and fluorescence as measures of concentration and molecular size of dissolved organic carbon in humic lake Tjeukemeer. *Water Research*, 21, 6: 731–734
- Donato-Capel L., Garcia-Rodenas C.L., Pouteau E., Lehmann U., Srichuwong S., Erkner A., Kolodziejczyk E., Hughes E., Wooster T.J., Sagalowicz L. 2014. Technological means to modulate food digestion and physiological response. V: Food structures, digestion and health. Bolan M., Golding M., Singh H. (ed.). Amsterdam, Academic Press: 389–422
- Eiken O., Kölegård R., Mekjavic I. B. 2008. Pressure-distension relationship in arteries and arterioles in response to 5 wk of horizontal bedrest. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 295, 3: H1296-H1302
- Eswaran S., Muir J., Chey W. D. 2013. Fiber and functional gastrointestinal disorders. *The American Journal of Gastroenterology*, 108, 5: 718–727
- European Commission. 2014. Planetary habitat simulation: Framework 7 project. Bruxelles, European Commission: 2str. <http://www.planhab.com/> (junij 2015)
- Gilbert, H. J. 2008. Sus out sugars in. *Structure*, 16, 7: 987–989

- Green S. A., Blough N. V. 1994. Optical absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. *Limnology and Oceanography*, 39, 8: 1903–1916
- Hamburg N.M., McMackin C.J., Huang A.L., Shenouda S.M., Widlansky M.E., Schulz E., Gokce N., Ruderman N.B., Keaney J.F., Vita J.A. 2007. Physical inactivity rapidly induces insulin resistance and microvascular dysfunction in healthy volunteers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 12: 2650–2656
- Hamilton M. T., Hamilton D. G., Zderic T. W. 2004. Exercise physiology versus inactivity physiology: an essential concept for understanding lipoprotein lipase regulation. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 32, 4:161-166
- Hamilton M. T., Hamilton D. G., Zderic T. W. 2007. Role of low energy expenditure and sitting in obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes*, 56, 11: 2655-2667
- Hartmann P., Haswell S. J., Grasserbauer M. 1994. Monitoring of reducing sugars by flow-injection analysis using p-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Analytica Chimica Acta*, 285, 1-2: 1–8
- Helms J. R., Stubbins A., Ritchie J. D., Minor E. C., Kieber D. J., Mopper K. 2008. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 53, 3: 955–969
- Hu Z., Grasso D. 2005. Water analysis: chemical oxygen demand. V: *Encyclopedia of analytical science*. 2nd ed. Worsfold P., Townshend, Poole C. (ed.). San Diego, Elsevier: 325–330
- Human Microbiome Project Consortium. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 7402: 2017-2014
- Huse S. M., Ye Y., Zhou Y., Fodor A. A. 2012. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS ONE*, 7, 6: e34242, doi: 10.1371/journal.pone.0034242: 12 str.
- Iovino P., Chiarioni G., Bilancio G., Cirillo M., Mekjavic I. B., Pisot R., Ciacci C. 2013. New onset of constipation during long-term physical inactivity: a proof-of concept study on the immobility induced bowel changes. *PLoS ONE*, 8, 8: e72608, doi: 10.1371/journal.pone.0072608: 8 str.
- Jensen R., Buffangeix D., Covi G. 1976. Measuring water content of feces by the Karl Fischer method. *Clinical Chemistry*, 22, 8: 1351–1354
- Kang D.W., DiBaise J.K., Ilhan Z.E., Crowell M.D., Rideout J.R., Caporaso J.G., Rittmann B.E., Krajmalnik-Brown R. 2015. Gut microbial and short-chain fatty acid profiles in adults with chronic constipation before and after treatment with lubiprostone. *Anaerobe*, 33: 33–41
- Keramidas M. E., Kölegård R., Mekjavic I. B., Eiken O. 2016. PlanHab: hypoxia exaggerates the bed-rest-induced reduction in peak oxygen uptake during upright cycle ergometry. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 311, 2: H453–H464

- Kettle H., Donnelly R., Flint H. J., Marion G. 2014. pH feedback and phenotypic diversity within bacterial functional groups of the human gut. *Journal of Theoretical Biology*, 342: 62–69
- Kindt R., Coe R. 2005. Tree diversity analysis: a manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. Nairobi, World Agroforestry Centre: 196 str.
- Kolbl S. 2014. Izboljšava anaerobne presnove blata iz komunalnih čistilnih naprav in lignocelulozih substratov pri pridobivanju bioplina. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo: 206 str.
- LaPara T. M., Alleman J. E., Pope P. G. 2000. Miniaturized closed reflux, colorimetric method for the determination of chemical oxygen demand. *Waste Management*, 20, 4: 295–298
- Lax S., Smith D.P., Hampton-Marcell J., Owens S.M., Handley K.M., Scott N.M., Gibbons S.M., Larsen P., Shogan B.D., Weiss S., Metcalf J.L., Ursell L.K., Vazquez-Baeza Y., Van Treuren W., Hasan N.A., Gibson M.K., Colwell R., Dantas G., Knight R., Gilbert J.A. 2014. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science*, 345, 6200: 1048–1052
- Lechtenfeld O. J., Hertkorn N., Shen Y., Witt M., Benner R. 2015. Marine sequestration of carbon in bacterial metabolites. *Nature communications*, 6: 6711, doi: 10.1038/ncomms7711: 8 str.
- Legendre P., Legendre L. 1998. Developments in environmental modelling, vol. 20: numerical ecology. 2nd ed. Amsterdam, Elsevier: 853 str.
- Lever, M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry*, 81, 1: 21-27
- Lin H. V., Frassetto A., Kowalik E.J., Nawrocki A.R., Lu M.M., Kosinski J.R., Hubert J.A., Szeto D., Yao X., Forrest G., Marsh D.J. 2012. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS ONE*, 7, 4: e35240, doi:10.1371/journal.pone.0035240: 9 str.
- Ling Z., Xiang C. 2011. Infectogenomics: aspect of host responses to microbes in digestive tract. V: *Metagenomics of the human body*. Nelson, K. E., (ed.). New York, Springer: 217-230
- Lipovšek I. 2013. Bioinformatika in molekularna analiza parametrov variabilnosti tehnik pri analizah strukture mikrobnih združb. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77 str.
- Macfarlane G. T., Mcbain A. J. 1999. The human colonic microbiota. V: *Colonic microbiota, nutrition and health*. Gibson G. R., Roberfroid M. B. (ed.). Dordrecht, Springer Netherlands: 1-25
- Marchesi J. R., Sato T., Weightman A. J., Martin T. A., Fry J. C., Hiom S. J., Wade W. G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2: 795-799

- Mårtensson O., Maite-Dueñas-Chasco, Irastorza A., Holst O., Rudling M., Norin E., Midtvedt T., Öste R. 2002. Effects of fermented, rosy, non-dairy, oat-based products on serum lipids and the faecal excretion of cholesterol and short chain fatty acids in germfree and conventional rats. *Nutrition Research*, 22, 12: 1461–1473
- Meier R. F. 2009. Basics in clinical nutrition: Fibre and short chain fatty acids. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 4, 2: e69–e71, doi: 10.1016/j.eclnm.2008.07.008: 3 str.
- Mekjavic I. B., Amon M., Kölegård R., Kounalakis S. N. 2016. The effect of normobaric hypoxic confinement on metabolism, gut hormones, and body composition. *Frontiers in Physiology*, 7, 202:1–13, doi: 10.3389/fphys.2016.00202: 13 str.
- Mills D. K., Entry J. A., Gillevet P. M., Mathee K. 2007. Assessing microbial community diversity using amplicon length heterogeneity polymerase chain reaction. *Soil Science Society of America Journal*, 71, 2: 572-578
- Moreno L. I., Mills D., Fetscher J., John-Williams K., Meadows-Jantz L., McCord B. 2011. The application of amplicon length heterogeneity PCR (LH-PCR) for monitoring the dynamics of soil microbial communities associated with cadaver decomposition. *Journal of Microbiological Methods*, 84, 3: 388-393
- Musso G., Gambino R., Cassader M. 2010. Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for metabolic disorders. *Current Opinion in Lipidology*, 21, 1: 76-83
- Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700
- Nektarios S., Debevec T., Mekjavic I. B. 2015. PlanHab : examining the effect of 21-day hypoxic bed rest and confinement on emotional state.V: Book of abstracts. International Society for Gravitational Physiology, 36th Annual Meeting, Ljubljana, 7. - 12. junij 2015. Igor B. Mekjavic (ed). Ljubljana, Jožef Stefan Institute: 48 str.
- Nelson D. L., Cox M. M. 2011. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. New York, W. H. Freeman: 1100 str.
- Netter H. F. 2016. *The netter collection of medical illustrations: digestive system: part II - lower digestive tract*. 2nd ed. Reynolds J. C. Reynolds, J. C, Ward P., Rose S. Solomon M. (ed.). Philadelphia, Elsevier: 300 str.
- Ortiz V. E., Kwo J. 2015. Obesity: physiologic changes and implications for preoperative management. *BMC Anesthesiology*, 15: 97, doi: 10.1186/s12871-015-0079-8: 12 str.
- Osuka A., Shimizu K., Ogura H., Tasaki O., Hamasaki T., Asahara T., Nomoto K., Morotomi M., Kuwagata Y., Shimazu T. 2012. Prognostic impact of fecal pH in critically ill patients. *Critical Care*, 16, 4: R119, doi: 10.1186/cc11413: 7 str.
- Paul B., Barnes S., Demark-Wahnefried W., Morrow C., Salvador C., Skibola C., Tollefsbol O. 2015. Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases. *Clinical Epigenetics*, 7: 12, doi: 10.1186/s13148-015-0144-7: 11 str.

- Rahat-Rozenbloom S., Fernandes J., Gloor G. B., Wolever T. M. S. 2014. Evidence for greater production of colonic short-chain fatty acids in overweight than lean humans. *International Journal of Obesity*, 38, 12: 1525-1531
- Remely M., Aumueller E., Merold C., Dworzak S., Hippe B., Zanner J., Pointner A., Brath H., Haslberger A. G. 2014. Effects of short chain fatty acid producing bacteria on epigenetic regulation of FFAR3 in type 2 diabetes and obesity. *Gene*, 537, 1: 85–92
- Richards L. B., Li M., van Esch B. C. A. M., Garssen J., Folkerts G. 2016. The effects of short-chain fatty acids on the cardiovascular system. *PharmaNutrition* 4, 2: 68-111
- Ritchie N. J., Schutter M. E., Dick R. P., Myrold D. D. 2000. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4: 1668–1675
- Rittweger J., Debevec T., Frings-Meuthen P., Lau P., Mittag U., Ganse B., Ferstl P. G., Simpson E. J., Macdonald I. A., Eiken O., Mekjavic I. B. 2016. On the combined effects of normobaric hypoxia and bed rest upon bone and mineral metabolism: results from the PlanHab study. *Bone*, 91: 130–138
- Robič N. 2012. Analiza bakterijske združbe in sedimentov štirih nepovezanih jamskih sistemov. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 88 str.
- Rochelle-Newall E., Fisher t. 2002. Chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in Chesapeake Bay. *Marine Chemistry* 77, 1: 23–41
- Rose C., Parker A., Jefferson B., Cartmell E. 2015. The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 45, 17: 1827–1879
- Rosenbaum M., Knight R., Leibel R. L. 2015. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26 9: 493–501
- Salazar N., Dewulf E.M., Neyrinck A.M., Bindels L.B., Cani P.D., Mahillon J., de Vos W. M., Thissen J.P., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilán C.G., Delzenne N.M. 2015. Inulin-type fructans modulate intestinal *Bifidobacterium* species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clinical Nutrition*, 34, 3: 501-507
- Schloss P. D., Iverson K. D., Petrosino J. F., Schloss S. J. 2014. The dynamics of a family's gut microbiota reveal variations on a theme. *Microbiome*, 2: 25, doi: 10.1186/2049-2618-2-25: 13 str.
- Schneeberger M., Everard A., Gómez-Valadés A. G., Matamoros S., Ramírez S., Delzenne N. M., Gomis R., Claret M., Cani P. D. 2015. *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports*, 5: 16643, doi: 10.1038/srep16643: 14 str.

- Schwartz A., Taras D., Schäfer K., Beijer S., Bos N. A., Donus C., Hardt P. D. 2010. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18, 1: 190–195
- Siigur U., Norins K. E., Allgood G., Schlagheckg T., Midtvedts T. 1994. Concentrations and correlations of faecal short-chain fatty acids and faecal water content in man. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 7, 6: 287–294
- Simpson E. J., Debevec T., Eiken O., Mekjavic I. B., Macdonald I. A. 2016. The combined and separate effects of 16 days bed rest and normobaric hypoxic confinement on circulating lipids and indices of insulin sensitivity in healthy men. *Journal of Applied Physiology*, 120, 8: 947-955
- Sommer F., Bäckhed F. 2013. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 4: 227-238
- Stephen A. M., Wiggins H. S., Cummings J. H. 1987. Effect of changing transit time on colonic microbial metabolism in man. *Gut*, 28, 5: 601–609
- Stres B. 2006. The first decade of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) in microbial ecology. *Acta Agriculturae Slovenica*, 88, 2: 65-73
- Stres B., Šket R., Treichel N., Debevec T., Eiken O., Mekjavic I. B., Schloter M. 2014. Planhab: insights into human intestinal microflora dynamics of normoxic and hypoxic bedrest studies. 1st Environmental Ergonomics and Physiology symposium, Ljubljana, 9. - 10. oktober 2014. Ljubljana, Inštitut Jožef Stefan: 1-2
- Thijssen D. H. J., Maiorana A. J., O'Driscoll G., Cable N. T., Hopman M. T. E., Green D. J. 2010. Impact of inactivity and exercise on the vasculature in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 108, 5: 845–875
- Tiirola M. A., Suvilampi J. E., Kulomaa M. S., Rintala J. A. 2003. Microbial diversity in a thermophilic aerobic biofilm process: analysis by length heterogeneity PCR (LH-PCR). *Water Research*, 37, 10: 2259-2268
- Tremaroli V., Bäckhed F. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489, 7415: 242–249
- Twardowski M. S., Boss E., Sullivan J. M., Donaghay P. L. 2004. Modeling the spectral shape of absorption by chromophoric dissolved organic matter. *Marine Chemistry*, 89, 1-4: 69–88
- Vital M., Chuang Howe A., Tiedje J. M. 2014. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *mBio*, 5, 2: e00889–14, doi: 10.1128/mBio.00889-14: 11 str.
- Wagener S., Shankar K. R., Turnock R. R., Lamont G. L., Baillie C. T. 2004. Colonic transit time--what is normal?. *Journal of Pediatric Surgery*, 39, 2: 166-169
- Walsh C. J., Guinane C. M., O'Toole P. W., Cotter P. D. 2014. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Letters*, 588, 22: 4120–4130
- Wayne B. 1997. The science of chemical oxygen demand. Technical Information Series, booklet no. 9. Loveland, Hach Company: 23 str.

- Weitkunat K., Schumann S., Petzke K. J., Blaut M., Loh G., Klaus S. 2015. Effects of dietary inulin on bacterial growth, short-chain fatty acid production and hepatic lipid metabolism in gnotobiotic mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26, 9: 929–937
- Wilson C. G. 2010. The transit of dosage forms through the colon. *International Journal of Pharmaceutics*, 395, 1-2: 17–25
- Wong J. M. W., Jenkins D. J. A. 2007. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *The Journal of Nutrition*, 137: 2539–2546
- Wright E. M., Martín M. G., Turk E. 2003. Intestinal absorption in health and disease--sugars. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 17, 6: 943-956
- Zavec Domen. 2014. Fizikalno-kemijski parametri in struktura mikrobnih združb ob zagonu industrijskih bioplinskih anaerobnih reaktorjev. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 73 str.
- Zhang H. 2013. Rapid determination of dissolved organic carbon by persulfate oxidation vial and UV/VIS spectrophotometer. Master's Thesis. Stillwater, Faculty of the Graduate College of the Oklahoma State University: 45 str.
- Zhao L. 2013. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nature Reviews Microbiology* 11, 9: 639–647

ZAHVALA

Najlepša hvala vsem zunanjim izvajalcem, ki so pomagali pri različnih meritvah, posredovali ključne informacije ter s tem olajšali potek magistrske naloge:

prof. dr. Davidu Stoparju in doc. dr. Tjaši Danevčič – pri merjenju absorpcijskih spektrov

dr. Sabini Kolbl, dr. Boštjanu Murovecu in MoSAIC <http://mosaic.fe.uni-lj.si/> - pri merjenju HMK

dr. Alenki Levart – za oskrbo z laboratorijskim materialom, ko je le-tega zmanjkalo

dr. Zali Prevoršek – za pomoč v začetnih fazah poskusa

prof. dr. Igor Mekjavič (IJS), dr. Tadej Debevec (IJS), Oli Eiken (Department of Environmental Physiology, Swedish Aerospace Physiology Centre, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden) – za vse informacije o projektu PlanHab

Marti in Fani – za vso tehnično pomoč in prijaznost kljub velikem številu vprašanj

Barbari Slemenik – za pomoč pri tehničnem urejanju, prijaznost ter korektnost

Sodelavce na Oddelku za zootehniko, Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo – za pomoč in dovoljenje za uporabo spektrofotometra in NanoVue

znan. svet. Bojani Bogovič Matijašič za izjemno hiter odziv in konstruktivne pripombe

Mentorju prof. dr. Blažu Stresu za super mentorstvo, za odgovore na vsa vprašanja, za potrpljenje in vso pomoč ter ideje in, ker mi je pokazal, da si lahko zelo uspešen, hkrati pa prijazen, dostopen in preprost človek ter super profesor

Delovnemu mentorju Robiju Šketu, ki je popestril delo, mi ogromno pomagal in me veliko naučil (kljub temu, da ni imel avtoriteto)

Vsem prijateljem, ki so se v času pisanja magistrske socializirali z mano in mi pomagali, da nisem znorela. Še posebej bi zahvalila Tadeju Markušku in Ani Turk za ves trud

Hvala fantu za vso potrpljenje in pomoč

Na koncu najlepša hvala, staršem in sestricama, ki so vedno verjeli vame in mi skozi življenje pomagali na vse možne načine in, ki so mi pomagali, da sem postala to kar sem

PRILOGE

Priloga A: Predvideni in dejanski dnevi vzorčenja.

Oseba	Predvideni dan vzorčenja	Dejanski dan vzorčenja
S2	-5	-4
S2	-1	2
S2	3	3
S2	10	11
S2	18	18
S2	21	20
S4	-5	-2
S4	-1	4
S4	3	5
S4	10	8
S4	18	17
S4	21	19
S5	-5	-4
S5	-1	2
S5	3	3
S5	10	11
S5	18	18
S5	21	20

Priloga B: Vnos gramov maščob, proteinov in OH na dan (PlanHab).

g maščob/dan				g proteinov/dan				g OH/dan			
Dan/Oseba	S2	S4	S5	Dan/Oseba	S2	S4	S5	Dan/Oseba	S2	S4	S5
-6	72,08	57,22	96,03	-6	102,2	98,0	122,7	-6	304,7	202,1	391
-5	104,9	64,58	117,3	-5	109,4	84,0	156,7	-5	376,4	297,3	504,5
-4	83,5	66,59	89,15	-4	99,0	100,9	104,3	-4	359,3	336	352,9
-3	83,56	70,2	68,73	-3	103,0	84,4	83,1	-3	337,5	295,5	359,2
-2	78,3	62,63	87,87	-2	90,7	73,0	110,2	-2	317,3	305,3	324,8
-1	66,66	60,83	87,51	-1	78,6	79,8	101,7	-1	306,2	303,9	322,9
1	69,97	52,87	87,02	1	92,4	63,8	103,9	1	288	253,1	346,1
2	75,27	54,98	74,7	2	80,6	67,1	92,5	2	292,7	250,8	258
3	61,6	50,96	75,84	3	70,7	59,2	84,6	3	264,2	235,9	267,5
4	75,01	49,35	71,22	4	80,9	69,2	83,7	4	266,7	231,7	271,6
5	63,38	60,6	58,95	5	80,8	79,9	88,0	5	239,5	263,6	290,9
6	60,95	46,27	83,6	6	82,1	69,8	117,4	6	254,5	230,2	401,4
7	66,01	75,28	60,67	7	78,6	106,7	91,8	7	260,8	371,5	315,6
8	79,6	36,34	84,12	8	108,7	45,2	98,8	8	385,2	225,4	316,3
9	53,4	50,71	77,49	9	77,5	69,9	86,0	9	272,2	246,5	327,7
10	70,07	47,61	77,48	10	81,9	59,5	94,3	10	271,6	230,3	327,6
11	92,83	45,35	73,26	11	100,1	66,5	80,2	11	337,9	218,3	294,3
12	58,71	50,76	70,84	12	82,2	61,8	74,9	12	306,4	239,7	282,9
13	54,1	34,4	50,23	13	53,4	49,3	87,8	13	258	232	248,9
14	59,56	66,26	86,6	14	60,7	86,6	85,5	14	285,6	250,3	244,6
15	47,94	41,31	71,2	15	76,3	69,1	80,7	15	233,1	190,7	290,8
16	70,16	57,23	69,85	16	70,6	69,8	91,1	16	228,7	255	288,2
17	89,62	78,32	104,3	17	83,4	88,7	135,0	17	355,9	273	409,9
18	54,94	41,98	79,01	18	75,2	70,8	97,7	18	245,4	262,1	255,6
19	70,52	54,41	81,91	19	85,7	85,2	87,7	19	268,3	200,4	279,5
20	68,32	46,55	86,96	20	91,8	65,7	117,5	20	222,5	202,6	411,6
21	72,21	76,93	50,21	21	66,0	108,7	97,4	21	233,6	369,6	290

Priloga C: Vpliv zauživanja vlaknin na zdravje (Meier, 2009).

Tanko črevo:
Redukcija holesterola in trigliceridov v plazmi
Zmanjšan glikemični odziv na hrano, ki vsebuje ogljikove hidrate
Zmanjšana razpoložljivost hranil
Zmanjšanje absorpcije železa, kalcija in magnezija
Debelo črevo:
Zmanjšanje črevesnega tranzicijskega časa
Bolj pogosto izločanje blata in povečana količina le-tega
Povečana vsebnost vode v blatu
Redčenje vsebine v črevesju
Zmanjšano delovanje toksinov in žolčnih kislin
Povečana fermentacija v črevesju
Povečanje količine H
Stimulacija rasti bifidobakterij (prebiotični učinek)
Povečana možnost napenjanja