

LJUDSKA MIKROBIOTA I MIKROBIOM

IVANA ANTAL, MARKO JELIĆ, SARA SILA¹, SANJA KOLAČEK¹ i ARJANA TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ

Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb i

¹Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Mikrobiotu čovjeka čine svi mikroorganizmi koji žive u simbiozi s ljudskim tijelom, a humani mikrobiom sadrži i do stotinu puta veći broj gena negoli ljudski genom. Iako mikroorganizme možemo naći u raznim nišama ljudskog tijela, najbrojnija je mikrobiota probavnog sustava. Mikrobiota je varijabilna među zdravim ljudima i jedinstvena za pojedinca te na nju utječe mnoštvo različitih čimbenika. I dalje je nepoznanica što je točno zdrava mikrobiota, ali poznate su neke od njenih uloga u odvijanju fizioloških procesa u stanju zdravlja. S druge strane, u slučaju narušene ravnoteže, disbioze, može doći do razvoja bolesti. Disbioza se često povezuje s nastankom brojnih patoloških stanja od kojih su najviše istražena pretilost, kronične upalne bolesti crijeva, sindrom iritabilnog kolona, kolorektalni karcinom, alergijske bolesti djece te bolesti usne šupljine. Razvoj metoda koje ne ovise o kultivaciji mikroorganizama značajno je unaprijedio proučavanje mikrobiote i doprinjeo boljem razumijevanju interakcije populacija nepatogenih mikroorganizama međusobno i sa svojim domaćinom. Time je otvoren put proučavanju utjecaja mikrobiote na razvoj bolesti i primjene modifikacije mikrobiote u preventivne i terapijske svrhe.

Ključne riječi: mikrobiota, mikrobiom, disbioza, metode proučavanja mikrobiote

Adresa za dopisivanje: Ivana Antal, dr. med.
Mirogojska 8
10 000 Zagreb, Hrvatska
Tel: 091 4012 014
E-pošta: iantal@bfm.hr

UVOD

U ljudskom tijelu živi oko 10^{14} bakterija koje čine fiziološku mikrobiotu čovjeka. To je zajednica od više bakterija u svakom čovjeku negoli je ikada ljudi živjelo na svijetu. Primjenom molekularne dijagnostike među ljudskom mikrobiotom otkriveno je više od 1000 različitih bakterijskih vrsta od kojih se mnoge ne mogu kultivirati (1). Ta obilna mikrobiota izvor je još izdašnjeg metagenoma koji brojem gena premašuje ljudski genom i do 100 puta (1-3). Svi mikroorganizmi jedne zajednice, zajedno sa svojim genima i molekulama koje proizvode, čine kompleksni mikrobiom te zajednice. Prvi katalog bakterijskih gena koji pripadaju ljudskom mikrobiomu proizašao je iz rezultata američkog projekta “*The Human Microbiom Project*” (HMP) (4) i europskog projekta “*Metagenomics of the Human Intestinal Tract*” (MetaHIT). Ovi projekti su opisali 15 po bakterijskom sastavu različitih niša u tijelu muškarca i 18 niša u tijelu žene (4). Iako ne postoje dva čovjeka s istim sastavom mikrobiote, postoje veće sličnosti u sastavu mikrobiote među pripadnici-

ma istih rasa, etničkih skupina i srodnih osoba (5).

Tijekom porođaja i nakon rođenja tijelo novorođenčeta brzo naseljavaju mikroorganizmi s kojima dolazi u kontakt. Fiziološka mikrobiota pojedinca se intenzivno formira tijekom prvih mjeseci života i do kraja druge godine postiže sastav koji ostaje stabilan tijekom cijelog života (3), ako ne dođe do većih poremećaja u prehrani ili se poremećaj ne izazove unosom antibiotika. S obzirom da smo većinu primarnih bakterijskih patogena uspješno stavili pod kontrolu cijepljenjem ili poboljšanim uvjetima života, danas nastanak bakterijske infektivne bolesti više povezujemo s narušavanjem složenog humanog ekosistema negoli s patogenim potencijalom samo jednog mikroorganizma.

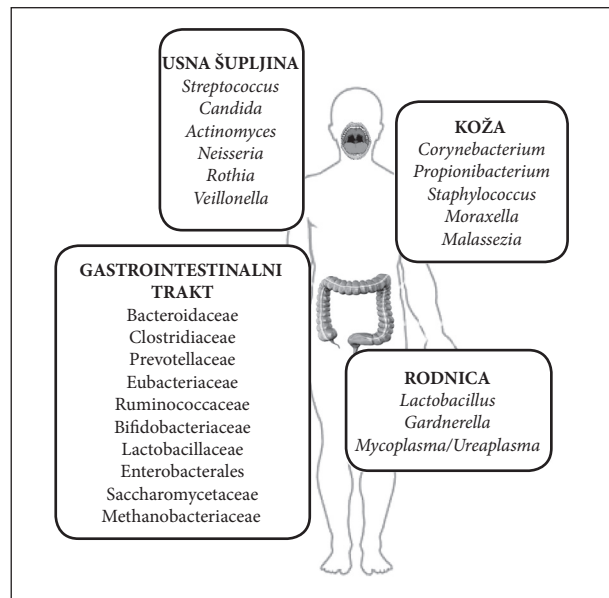
S obzirom na veliku varijabilnost mikrobioma među ljudima teško je odrediti što je zdrava mikrobiota. Mogućnost liječenja ili sprječavanja bolesti modulacijom mikrobioma pojedinca veliki je izazov u mnogim područjima medicine.

ZDRAVI MIKROBIOM

Zadnjih pedesetak godina pokušava se definirati pojam tzv. zdravog mikrobioma (mikrobioma u eubiozi), ali i dalje nije definirano što to točno podrazumijeva i što obuhvaća pojam zdravi mikrobiom u pogledu temporalno-spacijalnog te kvalitativnog i kvantitativnog udjela mikrobiota. Više se naglašava sama uloga mikroorganizama koji čine mikrobiotu, takozvanu funkcionalnu jezgru (engl. *functional core*), negoli sama vrsta mikroorganizama koji su sastavni dio humanog ekosustava. Neki autori smatraju da su važnije metabolička uloga mikrobiote i funkcije mikrobiote na molekularnoj razini nego sam sastav zajednice mikroorganizama. Stoga ta funkcionalna jezgra nisu nužno isti mikroorganizmi u različitim pojedincima. Ono što karakterizira zdravi mikrobiom je njegov potencijal da se odupre štetnim događajima i da se oporavi nakon izloženosti smetnjama koje bi mogle dovesti do narušavanja zdravlja i stanja (ne)ravnoteže (5). Mikrobiota se razlikuje među zdravim ljudima, a isto se tako i kod pojedinca razlikuju vrste koje su nastanjene u pojedinim područjima tijela. Istraživanja HMP-a su pokazala da je zapravo svaki čovjek koloniziran jedinstvenom mikrobiotom i posjeduje jedinstveni mikrobiom (4,6). Vjerojatnu ulogu u toj raznovrsnosti imaju prehrana, okoliš, genetika domaćina i utjecaj rane izloženosti mikroorganizmima. Na samu varijabilnost mikrobioma utjecaj bi mogle imati i geografske razlike podneblja te stil života (5). Istraživanja mikrobiote se uvelike zasnivaju na metodama metatranskriptomike, metaproteomike i metabolomike (3).

Bakterije su glavna sastavnica zdrave ljudske mikrobiote, ali osim njih prisutni su i neki virusi (primarno bakteriofagi), gljivice, neki članovi iz domene arheja (uglavnom roda *Methanobrevibacter*) i drugi eukarioti. O njihovoj funkciji u sklopu ljudskog mikrobioma nije do sada još otkriveno toliko koliko o ulozi bakterija, jer metode detekcije nisu tako razvijene kao što je razvijena tehnologija za uzgoj bakterija (1). Smatra se da oko 99 % mikrobioma čine bakterijski geni (7).

Iako je debelo crijevo najviše ispitivano stanište ljudske mikrobiote, jasno da je ona prisutna i u/na nekim drugim organskim sustavima čovjeka, uključujući usnu šupljinu, rodnicu, kožu, ostatak gastrointestinalnog trakta (sl. 1). U usnoj šupljini najviše su zastupljene vrste iz roda *Streptococcus* spp. (4), na koži *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp. i *Staphylococcus* spp. (8), dok fiziološku mikrobiotu zdrave rodnice najviše čine vrste iz roda *Lactobacillus* spp. (4). Bakterije koje većinom prevladavaju u debelome crijevu koljena su *Bacteroidetes* i *Firmicutes* (4) U manjem broju prisutne su *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* i *Fusobacteria* (3).



Sl. 1. Mikrobiota čovjeka u raznim anatomskim nišama. [prilagođeno prema Lloyd-Price i suradnici (5)]

Čovjek živi skupa sa svojom mikrobiotom čineći složeni simbiotski sustav u kojem vlada sklad i ravnoteža (eubioza), a poremećaj mikrobiote (disbioza) može utjecati na razvoj nekih bolesti (npr. alergijske bolesti, šećerna bolest, maligne bolesti, upalne bolesti crijeva, adipoznost). Do disbioze može doći zbog brojnih vanjskih i unutarnjih promjena, a neke od njih su promjene u prehrani, primjena antibiotika, starenje, utjecaj egzogenih faktora iz okoliša i slično (3). No, još uvijek nije razjašnjeno je li disbioza uzrok ili posljedica bolesti, odnosno utire li disbioza put kroničnoj bolesti ili kronična bolest dovodi do promjena u crijevnoj mikrobioti (9). Kako je sastav mikrobiote individualna karakteristika pojedinca i ne postoji univerzalna formula sastava zdrave mikrobiote, ne može se točno ni razumjeti koji sastav je povezan s razvojem pojedinih bolesti što otežava prevenciju i liječenje bolesti povezanih s disbiozom (5). Mikrobiota čovjeka ima značajnu metaboličku, imunološku i zaštitnu ulogu te se zbog te svoje velike uloge može izdvojiti gotovo kao poseban organ, često nazvan i zaboravljeni organ (3,10).

MIKROBIOTA GASTROINTESTINALNOG SUSTAVA

Najveći broj mikroorganizama ljudske mikrobiote našao je svoje skrovište u humanim crijevima s velikim utjecajem na održavanje ljudskog zdravlja (3). Anaerobnih bakterija ima oko 1000 puta više nego fakultativnih anaeroba (11). Crijevna mikrobiota ima ulogu u održavanju homeostaze svog domaćina, ima utjecaj na metaboličke procese, fiziološke funkcije, imunološki

sustav, probavu hrane i štiti od patogena, a remećenje te ravnoteže i nastanak disbioze povezuje se s nekim bolestima gastrointestinalnog trakta (3).

Nedavno je dokazano da mekonij novorođenčeta nije sterilan, odnosno da naseljavanje probavnog sustava počinje već intrauterino (12). Nakon porođaja, prvi mikroorganizmi koji koloniziraju crijevo podrijetlom su s epitela vagine majke, ali i iz okoline (13) i uključuju enterobakterije i enterokoke, a potom slijedi kolonizacija anaerobnim organizmima poput roda *Bifidobacteria*, *Clostridia*, *Bacteroides* te anaerobnim streptokokima (3,14). Crijevna mikrobiota novorođenčadi nije tako složena i raznovrsna kao kod odraslih osoba (3). U njenom razvoju i sastavu imaju ulogu raznoliki čimbenici poput načina porođaja (vaginalno ili carskim rezom), vrste prehrane (majčino mlijeko ili dojenačke formule) te primjena antibiotika (15). Smatra se da u dobi od dvije godine struktura crijevne mikrobiote djeteta nalikuje sastavu crijevne mikrobiote odraslog čovjeka (3). S druge strane, starenjem se mikrobiota također mijenja te je u ljudi starijih od 65 godina uočena smanjena raznolikost. Koljeno *Bacteroidetes* prevladava u onih koji su smješteni na trajnu skrb, dok je kod ostalih izraženije koljeno *Firmicutes*. Primijećeno je kako se javljaju upalne promjene koje su povezane s disbiozom te posljedično s pogoršanjem bolesti i slabosti u starijih ljudi (3).

Metabolička uloga. Mikrobiota sudjeluje u regulaciji metabolizma ugljikohidrata, bjelančevina i lipida, primjerice, ekspresijom svojih enzima, utjecajem na domaćinove enzime, fermentacijom. Djelovanjem mikrobiote dolazi do sinteze kratkolančanih masnih kiselina (engl. *short chain fatty acid*, SCFA). Nadalje, mikrobiota ima svoje mjesto pri sintezi vitamina K i nekih vitamina B skupine, u metabolizmu žučnih kiselina i polifenola iz hrane. Također utječe na metabolizam ksenobiotika i lijekova (10).

Antimikrobna zaštitna uloga. Crijevni komenzali sprječavaju kolonizaciju i prevladavanje mikroorganizama ne samo zauzimanjem životnog prostora i kompeticijom za nutrijente, već i na brojne indirektno načine poput stimulacije lokalnog imunosnog odgovora ili proizvodnje raznih spojeva s antimikrobnim učinkom. Tako, na primjer, vrste roda *Lactobacillus* stvaraju metabolizmom mliječnu kiselinu koja sudjeluje u razaranju bakterijske stijenke (10), a sastav žučnih kiselina, koji je odraz ukupnog metabolizma mikrobiote, bitno utječe na germinaciju spora vrste *Clostridioides difficile*.

Utjecaj na imunološki sustav. Crijevna mikrobiota pridonosi modulaciji imunosnog sustava utječući na oblikovanje crijevima pridruženog limfoidnog tkiva (engl. *gut associated lymphoid tissues*, GALT), sudje-

lujući u razvoju i djelovanju regulacijskih limfocita T (engl. *T regulatory cells*, Treg) te regulirajući prirodene limfoidne stanice (engl. *innate lymphoid cells*, ILCs) (10). Isto tako vrlo je važna uloga razvoja mikrobiote u ranim razdobljima djeteta u sazrijevanju imunološkog sustava i razvoju alergijskih bolesti (2).

Očuvanje gastrointestinalnog sustava. Postoje dokazi da crijevna mikrobiota pozitivno utječe na održavanje strukturne barijere gastrointestinalnog sustava (npr. djelovanjem na međustanične veze - engl. *tight junctions*, održavanje dezmosoma). Također djeluje na transkripcijski faktor angiogenin-3 koji ima ulogu razvoju krvnih žila u crijevima (10).

MIKROBIOTA I GASTROINTESTINALNE BOLESTI

Promjene crijevne mikrobiote uočene su kod pretlosti, kroničnih upalnih bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD) - ulceroznog kolitisa (engl. *ulcerative colitis*, UC) i Crohnove bolesti (engl. *Crohn's disease*, CD), sindroma iritabilnog kolona (engl. *irritable bowel syndrome*, IBS), kolorektalnog karcinoma, nealkoholne masne jetre te u još nekim bolestima (3,16-18).

Sindrom iritabilnog kolona. Sindrom iritabilnog kolona je funkcionalni poremećaj crijeva obilježen boli i/ili nelagodnom u abdomenu, izmjenjivanjem crijevnog zatvora s proljevastim stolicama i meteorizmom te nekim drugim gastrointestinalnim tegobama. Glede crijevne flore, novije studije ne samo da potvrđuju razlike u sastavu u usporedbi sa „zdravim“ pojedincima, nego upućuju i na moguću etiopatogenetsku ulogu u razvoju ovog gastrointestinalnog poremećaja (3,16,17). Navodni mehanizmi koji objašnjavaju ulogu mikrobiote u patogenezi IBS-a uključuju promijenjeni sastav ili metaboličku aktivnost mikrobiote, aktivaciju odgovora imunosnog sustava, povećanu propusnost crijevne stijenke i oštećenu funkciju sluznične barijere, senzorno-motoričke poremećaje izazvane mikrobiotom te poremećenu os crijevo-mikrobiota-mozak (engl. *gut-microbiota-brain axis*) (19). U nekoliko studija nađen je porast bakterija iz koljena *Firmicutes*, kao i *Ruminococcus*, *Clostridium* i *Dorea*, te značajno smanjenje vrsta roda *Bifidobacterium* i *Faecalibacterium* u odnosu na zdravu populaciju (3). Nađen je i povećan omjer koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (3). S obzirom na navedeno modulacija crijevne mikrobiote promjenama u prehrani, upotrebom antibiotika, probiotika i protuupalnih lijekova spominje se u literaturi kao jedna od mogućih strategija u ublažavanju simptoma IBS-a (19) no za konačnu potvrdu potrebno je pričekati rezultate relevantnih prospektivnih randomiziranih studija.

Kronične upalne bolesti crijeva. Crohnova bolest i ulcerozni kolitis su kronične upalne bolesti gastrointestinalnog sustava koje karakteriziraju faze relapsa i remisije (3,20). Premda etiologija IBD-a nije u cijelosti razjašnjena, riječ je o neadekvatnom upalnom odgovoru na sadržaj crijeva koji se razvija u nasljedno predisponiranih pojedinaca (21). Povećanje incidencije IBD-a povezuje se s nizom okolišnih čimbenika kao što su način porođaja, rana prehrana, rana primjena antibiotika, pretjerana higijena i nedostatak parazitar- nih infekcija te s unosom određenih nutrijenata (maj- čino mlijeko vs. umjetna prehrana) (22). Pretpostavlja se da je uzrok upale smanjena bakterijska raznolikost, a između ostaloga i smanjena količina bakterija iz kol- jena koja inače dominiraju, *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, te su reducirani i *Clostridium leptum* i *Clostridium coc- coides* grupe (23). S druge strane, neki istraživači sma- traju da su u patogenezu IBD-a uključene specifične vrste, a ne općenita disbioza mikrobiote. Na primjer, povezanost *Enterobacterales* kod pacijenata s UC i ad- herentno-invazivne *E. coli* kod bolesnika s CD (3).

Kolorektalni karcinom. Kolorektalni karcinom (engl. *colorectal cancer*, CRC) je jedan od vodećih uzroka smrtnosti među malignim bolestima. Postoje studije koje pokazuju poveznicu između mikrobiote i razvoja CRC-a. Činjenica je da debelo crijevo sadržava najveću gustoću mikrobne populacije u gastroin- testinalnom traktu i stoga ne čudi moguća uloga mi- krobiote u razvoju CRC-a. Utvrđeno je da određena hrana i hranjive tvari utječu na rizik razvoja CRC-a (24), budući da utječu na sastav crijevne mikrobiote (25). Istraživanjima se utvrdilo da je izlaganje antibi- oticima rano u životu povezano s povećanim rizikom od CRC-a u dobi od 60 godina (26), što upućuje da stečena disbioza ostaje promijenjenom duže razdoblje (27). Smatra se da osim bakterija i njihovi metabolič- ki produkti utječu na karcinogenezu stanica debeloga crijeva. Crijevna mikrobiota i njeni metaboliti mogu dovesti do upalnih zbivanja, što je rizični čimbenik za pokretanje kaskade koja dovodi do oštećenja DNA stanice i mehanizama popravka, odnosno do maligne transformacije. Rezultati nekih istraživanja ukazuju da vrste roda *Fusobacterium*, *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, enterotoksični *B. fragilis* te adhe- rentno-invazivna *E. coli* imaju prokarcinogena svoj- stva (18). Uočena je veća prisutnost *Fusobacterium* spp. (28) i *Campylobacter* spp. u tkivu kolorektalnog karcinoma (18).

Pretilost. Broj pretilih osoba raste iz dana u dan, stoga pretilost predstavlja jedan od vodećih javnozdravstvenih problema kako u razvijenim, tako i u nerazvijenim zemljama. Govorimo o epidemiji pretilosti koja je po- primila globalni razmjer (1). Osim do sada već dobro poznatih čimbenika koji dovode do nastanka pretilo- sti, smatra se da i crijevna mikrobiota ima ulogu u eti-

ologiji debljine. Danas je velik broj istraživanja usmje- ren na ulogu prebiotika i probiotika u manipulaciji sastava crijevne mikrobiote, a sve se više pozornosti obraća učinku različitih restriktivnih dijeta i tjelesne aktivnosti na njezin sastav. Vjerojatno najpoznatiji ek- sperimenti koji ukazuju na ulogu crijevne mikrobiote u energetske ravnoteži su oni na „sterilnim“ i „nor- malnim“ laboratorijskim miševima, gdje se pokaza- lo da transplantacija mikrobiote izolirane iz debelog crijeva pretilih miševa u miševе sa sterilnim crijevima (uzgojenih bez prisutnosti mikroorganizama) dovodi do povećanja udjela masnog tkiva i pojave inzulinske rezistencije kod „sterilnih“ miševa (30). To upućuje da sastav crijevne mikrobiote pretilih miševa promo- vira porast tjelesne mase. Rezultati studija na ljudima u skladu su s rezultatima studija na životinjama te se pokazalo da pretile osobe imaju niži udio bakterija koljena *Bacteroidetes*, a viši udio bakterija koljena *Fir- micutes* u usporedbi s kontrolnom skupinom koja je imala adekvatnu tjelesnu masu (31). Nije još do kra- ja razjašnjeno kako mikrobiota utječe na homeosta- zu energije u čovjekovom organizmu, no nekoliko je pretpostavljenih mehanizama i ovdje će biti spomenu- ti samo neki od njih (32). Crijevna mikrobiota utje- če na regulaciju receptora vezanih za G-protein (npr. GPR41) prozvodnjom SCFA, liganda za ove receptore (33). Istraživanja su pokazala da je količina proizvede- nih SCFA veća kod osoba s prekomjernom tjelesnom masom i pretilih osoba (31). Bakterijski lipopolisaha- rid (LPS) iz stijenki gram-negativnih bakterija potiče lučenje proupalnih citokina poput interleukina 6 (IL- 6) i čimbenika nekroze tumora α (engl. *tumor necro- sis factor α* , TNF- α), a poznato je da je kronična upala nižeg stupnja povezana s pretilošću (34). Zasigurno će daljnje novije spoznaje o „skrivenom metaboličkom organu“, odnosno o crijevnoj mikrobioti pripomoći i pri liječenju navedenih gastrointestinalnih bolesti.

MIKROBIOTA I ALERGIJE

Slično pretilosti, posljednja su desetljeća obilježena i znatnim povećanjem pobola od alergijskih bolesti kod djece u razvijenim zemljama, a jedna od hipoteza poznata pod nazivom „hipoteza o pojačanoj higijeni“ pretpostavlja da je riječ o posljedici izostanka kontakta s velikim brojem raznorodnih bakterija i crijevnih pa- razita kojemu je u prethodnim tisućljećima bila izlo- žena svaka ljudska jedinka od samog rođenja nadalje (35). Ove najčešće kronične bolesti u djece razvijaju se u nasljedno predisponiranih pojedinaca (36), ali uz znatan utjecaj okolišnih čimbenika kakvi su prehrana, stres, onečišćenje okoliša, neki lijekovi te već spome- nuta reducirana izloženost bakterijama i parazitima (37,38). Koje su bakterijske vrste protektivne, a koje potiču alergiju nije, međutim, do kraja razjašnjeno (34).

Brojne su studije potvrdile da se crijevna mikrobiota u alergične djece razlikuje od crijevne flore u zdravih vršnjaka (34). Štoviše, utvrđene su i povezanosti pojedinih atopijskih bolesti (astme, atopijskog dermatitisa, alergijskih reakcija na hranu, alergijskog rinokonjunktivitisa) sa čimbenicima koji mogu trajno uvjetovati promjene u sastavu mikrobiote poput rane primjene antibiotika, carskog reza, dojenačke prehrane, stanja okoline, uvjeta stanovanja (npr. prašina), itd. (38). Već je dulje vrijeme poznato da crijevna mikrobiota uvjetuje na različite načine i putem različitih mehanizama na razvoj i sazrijevanje imunskog sustava te stoga ne čudi da promjena njezina sastava može biti povezana s alergijskim bolestima. Osim što prvi mjeseci života imaju važnu ulogu u stvaranju raznovrsne mikrobiote, bitni su i događaji tijekom trudnoće. Neke studije pokazuju protektivni učinak na razvoj alergija kod djece čije su majke bile u kontaktu sa stokom (38). Uočeno je da su djeca koja boluju od alergijskih bolesti manje kolonizirana bakterijama iz koljena *Bacteroides* i vrstama iz roda *Bifidobacterium*. Izloženost bakterijama iz koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes* u kućnoj prašini tijekom prve godine života može biti zaštitni čimbenik za pojavu otežanog disanja (38), dok je jača kolonizacija vrstama *Staphylococcus aureus* i *Clostridioides difficile* potencijalni čimbenik za nastanak alergije (38).

Osim važnosti crijevne mikrobiote, pokazalo se da i mikrobiota u dišnim putevima utječe na razvoj astme. Kolonizacija orofarinksa vrstama *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ili *Moraxella catarrhalis* u prvim mjesecima života rizični je čimbenik za razvoj astme (2). Prema nekim studijama mikrobiota dišnog sustava kod oboljelih od astme ima utjecaj i na odgovor na terapiju kortikosteroidima. Jednako kao što je bitan razvoj crijevne mikrobiote u ranom životu djeteta, tako su prvi mjeseci bitni i u razvoju mikrobiote dišnih puteva. S obzirom na ulogu mikrobiote u razvoju alergijskih bolesti, ne čudi interes za primjenom probiotika u cilju prevencije alergijskih bolesti kod djece. Velik broj randomiziranih kontroliranih studija istraživalo je ulogu probiotika u razvoju atopijskog dermatitisa. No, primjena različitih vrsta i sojeva bakterija, doza i trajanja terapije te vremena aplikacije otežavaju tumačenje rezultata istraživanja (39). Iako su najnovija istraživanja pokazala da uporaba probiotika smanjuje rizik od atopijskog dermatitisa ako se daju majci tijekom trudnoće i djetetu nakon rođenja, pokazalo se da oni ne sprječavaju kasniji nastanak alergijske astme i alergijskog rinitisa, odnosno da čak povećavaju rizik od njihova nastanka (35).

MIKROBIOTA I PATOLOŠKE PROMJENE U USNOJ ŠUPLJINI

Mikrobiota usne šupljine je nakon crijevne mikrobiote druga po raznolikosti mikroorganizama u tijelu te je i u ovom prostoru nađeno oko 700 vrsta bakterija od kojih dominiraju rodovi *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *Actinomyces*, *Neisseria*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* i *Kingella* (40,41). Baza podataka *The human oral microbiome database* (HOMD) pruža detaljan uvid u sekvence bakterijskog genoma oralne mikrobiote. Osim bakterija mikrobiotu usne šupljine čine i neki virusi, protozoe (*Entamoeba gingivalis* i *Trichomonas tenax*), gljive (*Candida* spp. i ostale vrste) i neke vrste arheje (*Methanobrevibacter oralis*). Teško je točno precizirati koji sve mikroorganizmi koloniziraju usnu šupljinu, jer bakterije iz okoliša (iz vode, hrane, zraka) lako dospjevaju u usta, a na kolonizaciju utječe i kontakt među ljudima (npr. ljubljenje). Osim toga većina ovih mikroorganizama se teško kultivira u laboratorijskim uvjetima (6,41). Održavanje oralne higijene bitno je za zdravlje usne šupljine, jer u suprotnom u interakciji domaćina i bakterija dolazi do stvaranja biofilma na površini zuba i olakšanog razvoja karijesa i parodontalne bolesti (parodontitis) koji se ubrajaju u najčešće bolesti čovjeka. Ako uđe u krvotok, mikrobiota usne šupljine može izazvati i sistemnu bolest poput infektivnog endokarditisa ili apscesa u mozgu i jetri (6).

Kod ljudi koji kontinuirano konzumiraju veće količine namirnica bogate ugljikohidratima, razgradnjom šećera stvara se okoliš s nižim pH koji sprječava rast na kiselinu osjetljivih mikroorganizama, a pogoduje rastu vrsta kojima kiseli okoliš odgovara, poput vrste *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* spp. te dolazi do disbioze oralne mikrobiote i predispozicije za nastanak karijesa (6). Kariogene vrste su i same proizvođači kiselina što doprinosi oštećenju cakline i dodatno pridonosi stvaranju karijesa. Ako se karijes ne liječi, oštećenje može napredovati sve do pulpe zuba i anaerobne proteolitičke bakterije mogu dovesti do endodontičkih infekcija. Na površini zubiju stvara se dentalni plak (biofilm) čiji su prvi kolonizatori gram-pozitivni aerobni i fakultativni anaerobni uzročnici (*Streptococcus* spp. i *Actinomyces* spp.). Sve dok se redovito i pravilno održava higijene usne šupljine taj plak je u stadiju koji nije opasnost za zdravlje. Kada se oralna higijena ne održava, plak se mijenja i dominiraju gram-negativne (*Fusobacterium*, *Treponema*) i anaerobne vrste koje svojim djelovanjem izazivaju upalne promjene i nastanak gingivitisa. Kod parodontitisa se stvaraju duboki džepovi zbog razdvajanja gingive i zuba te anaerobni uzročnici stvaraju infekciju koja dovodi do razgradnje kosti. Zub se rasklimava, a u uznapredovaloj fazi može doći i do njegovog ispadanja (6,40).

UPORABA U FORENZICI

Fierer i sur. (42) su izveli nekoliko studija kojima su pokazali kako bi se različit individualni bakterijski sastav na koži mogao iskoristiti u forenzičke svrhe. Uspoređivali su bakterije (odnosno bakterijsku DNA) na koži jagodica s bakterijama koje su nađene na predmetima koje su dirali pojedinci i uočili da sastav bakterija na predmetu koji je dirala određena osoba odgovara sastavu bakterija na koži te osobe čak i ako je predmet stajao na sobnoj temperaturi 2 tjedna. Istraživani predmet bili su tipkovnica i računalni miš te su uvidjeli da je sličnost sastava bakterija na koži vlasnika tipkovnice i nađenih bakterija na tipkovnici veća nego s drugim osobama. Bakterije su s prstiju prenesene na predmete i većina tamo i opstaje zbog svoje otpornosti na uvjete okoliša. Tako bismo mogli reći da je kožna mikrobiota poput otiska prsta karakteristična za svaku osobu (42). Bit će zanimljivo pratiti mogućnost nove uloge mikrobiote u forenzičkom svijetu u budućnosti.

METODE ZA PROUČAVANJE MIKROBIOTE

Otkako je Robert Koch 1881. godine implementirao tehniku uzgoja na krutim hranjivim podlogama, dugo je vremena pozornost mikrobiologa bila usmjerena isključivo na interakciju ljudskog organizma i patogenih mikroorganizama (43). Zbog ograničenja metoda kultivacije i prevladavajućeg mišljenja koje je u značajnoj mjeri marginaliziralo utjecaj nepatogenih mikroorganizama, istraživanja utjecaja kolonizirajućih i nepatogenih populacija mikroorganizama na ljudski organizam bila su ostavljena po strani (44).

Razvoj metoda koje se temelje na kultivaciji, ali i metoda koje ne ovise o kultivaciji mikroorganizama unaprijedilo je proučavanje mikrobiote i doprinijelo je boljem razumijevanju važnosti interakcije populacija nepatogenih mikroorganizama koje nastanjuju različite niše ljudskog organizma.

Općenita pretpostavka je da se 10–50 % različitih bakterijskih vrsta ljudske mikrobiote može izolirati i uzgojiti klasičnim mikrobiološkim metodama *in vitro* (45,46), no uzgoj mikroorganizama ovisi o velikom broju različitih parametara koji uvelike ograničavaju detaljno istraživanje mikrobiote. Slabo zastupljene, oligotrofne, spororastuće mikroorganizme često pre-rastu zastupljenije vrste i vrste koje karakterizira brži rast. Sastav konvencionalnih hranjivih medija, pH, temperatura i esencijalne hranjive tvari bitni su faktori koje treba prilagoditi svakom mikroorganizmu (3,44). Iako su nedostaci ovakvih metoda očiti, kultivacija mikroorganizama koji sačinjavaju mikrobiotu nužna je zbog detaljne analize pojedinih vrsta i sojeva

u svrhu pobližeg razumijevanja fiziološkog odnosa s domaćinom i mogućnosti njihove primjene u terapijske svrhe (44).

Veliki napredak u istraživanju mikrobiote postignut je 1980-ih godina implementacijom molekularno-bioloških metoda. Ovakvim se metodama analizira ukupna DNA izolirana iz uzorka bez potrebe za kultivacijom mikroorganizama *in vitro* čime se dobiva neposredan uvid u sastav mikrobiote. Molekularno biološke metode su, za razliku od metoda ovisnih o uzgoju, pouzdanije i brže, temelje se na analizi nukleinskih kiselina (uglavnom DNA) i ne ovise o varijabilnim morfološkim karakteristikama mikroorganizama koje često variraju ovisno o uvjetima uzgoja (44,47).

Među prvim molekularno-biološkim metodama korištenima u istraživanjima mikrobioma je fluorescentna hibridizacija *in situ* (engl. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) te Sangerovo sekvenciranje (44,48). Zbog svojih ograničenja i tehnički zahtjevne izvedbe ove metode se ne ubrajaju u tzv. visokoprotočne metode (engl. *high-throughput*) analize mikrobioma i ne pružaju detaljan uvid u raznolikost mikrobioloških populacija mikrobiote (44,49).

Molekularno-biološke metode neovisne o uzgoju koje mogu obraditi veću količinu uzoraka uključuju polimorfizam dužine terminalnih restrikcijskih fragmenata (engl. *terminal restriction fragment length polymorphism*, T-RFLP) i denaturirajuću gradijentnu gel elektroforezu (engl. *denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE) (2). T-RFLP je zbog relativne jednostavnosti jedna od najčešće korištenih tzv. „fingerprinting“ metoda koja se redovito koristi u analizi ribosomskih gena gljiva (18S rDNA), bakterija i arheja (16S rDNA). Intenzivna analiza mikrobioma u suštini započnje 2005. godine primjenom metoda sekvenciranja DNA sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) (44). Za razliku od Sangerovog sekvenciranja DNA, NGS-om je moguće sekvencirati kompletni bakterijski genom za nekoliko sati ili dana uz drastično smanjenje troškova i kompleksnosti izvođenja. Primjena NGS-a omogućuje detaljnu analizu sastava mikrobioma i istovremenu identifikaciju pojedinih bakterijskih vrsta, a zbog uspješne detekcije i najmanje zastupljenih mikroorganizama pogodno je za praćenje minimalnih promjena i fluktuacija populacija mikroorganizama (44,47). Primjena NGS metoda uključuje zahtjevnju bioinformatičku analizu i kontrolu kvalitete te dostupnost opsežne referentne baze podataka.

Unatoč primjeni sve naprednijih metoda sekvenciranja DNA i bioinformatičke obrade velike količine podatka vjerni prikaz sastava mikrobiote i dalje ovisi o često previđenom problemu kvalitetne izolacije ukupne DNA i amplifikaciji gena lančanom reakcijom po-

limerazom (3). Različiti protokoli izolacije DNA istih uzoraka često rezultiraju drugačijim rezultatima. Ovo se pogotovo odnosi na problem nejednako učinkovite izolacije DNA gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (40). Prisutnost kompleksnih polisaharida, žučnih soli, lipida i ostalih inhibitora lančane reakcije polimerazom često narušavaju učinkovitost amplifikacije DNA.

Trenutno se razvijaju platforme sekvenciranja „treće generacije“ kojima je moguće sekvencirati samo jednu molekulu DNA. Najznačajnije platforme takvog tipa su PacBio RS II (*Pacific Biosciences*) i MinION nanopore device (*Oxford Nanopore Technologies*) koje ne zahtijevaju amplifikaciju DNA lančanom reakcijom polimerazom. Iako obećavajuće, ovakve platforme i dalje karakterizira određena nestabilnost i velik postotak pogreške te njihova primjena trenutno nema veliko značenje u analizi mikrobioma i sekvenciranju općenito (44).

Sama prisutnost i fluktuacija populacija mikroorganizama koji čine mikrobiotu nije jedini čimbenik koji utječe na interakciju s ljudskim organizmom. Istraživanja mikrobiote na razini transkriptoma, proteoma i metaboloma nadopunjuju ranije opisane metode analize DNA i pružaju sveobuhvatniji uvid u prirodu interakcije mikrobiote i organizma domaćina (47). Metatranskriptomski pristup omogućuje praćenje ekspresije detektiranih gena i rasvjetljava mehanizme kojima mikrobiota reagira na promjene u okolišu (44). Metaproteomskim pristupom analiziraju se proteini koje proizvode mikroorganizmi mikrobiote, no u isto vrijeme detektiraju se i identificiraju proteini domaćina koji nastaju kao posljedica interakcije domaćina s mikrobiotom ili se javljaju kao posljedica upalnih procesa (47). Metametabolomska istraživanja obuhvaćaju analizu svih produkata metabolizma koji se javljaju zbog interakcija između mikroorganizama mikrobiote, odnosno mikrobiote i domaćina (43). Zbog navedenog u obzir treba uzeti sve navedene pristupe u istraživanju mikrobiote kako bi se vjerodostojno utvrdila prava priroda odnosa mikrobiote i domaćina te uloga koju taj odnos ima u razvoju bolesti.

ZAKLJUČAK

Humani mikrobiom je složeni ekosistem koji uključuje razna područja i niše humanog organizma naseljena bakterijama, arhejama i eukarijama sastava (kvalitativnog i kvantitativnog) specifičnog za pojedinca i anatomske cjeline. Ubrzana istraživanja ljudskog mikrobioma dovode sve više do mijenjanja tradicionalnog mišljenja da je za bolest u čovjeka odgovoran jedan, dobro definirani patogen, a sve je više indikacija

da nastanku raznih, pa i neinfektivnih, bolesti doprinosi poremećaj ravnoteže autohtonog mikrobioma (tj. disbioza mikrobioma). Razvoj metoda u bakteriologiji, posebno onih koje ne ovise o kultivaciji mikroorganizama, unaprijedio je proučavanje mikrobiote, metagenoma, transkriptoma, proteoma i metaboloma što doprinosi sve boljem razumijevanju brojnih interakcija između raznih populacija bakterija te bakterija i domaćina. Uz sve naprednija tehnološka rješenja analize mikrobioma postaju sve brže, sve detaljnije i sve pristupačnije za rutinsku primjenu, no veliku količinu podataka i uz napredne bioinformatičke programe postaje sve zahtjevnije smisleno tumačiti. Podatci o ulozi sastava mikrobiote pri nastanku određenih bolesti čovjeka su, ipak, još oskudni te se još uvijek više govori o povezanosti i istovremenom pojavljivanju mikrobiote određenog sastava s određenim bolestima negoli o jasnoj uzročno-posljedičnoj povezanosti. Primjeri gdje manipulacija mikrobiotom dovodi do terapijskih uspjeha već postoje te je sigurno da detaljnije proučavanje međusobnog odnosa čovjeka i njegovog mikrobioma otvara puteve pronalaženja uspješnih preventivnih i terapijskih intervencija za mnoge bolesti.

ZAHVALA

Ovaj je rad dio istraživanja koji pod nazivom „Kronične upalne bolesti crijeva u djece: incidencija, tijek bolesti te uloga prehrane i crijevne mikroflore u etiopatogenezi“ i brojem IP-2014-09-3788 financira Hrvatska zaklada za znanost.

L I T E R A T U R A

1. Baohong W, Mingfei Y, Longxian L, Zongxin L, Lanjuan L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* 2017; 3 (1): 71-82.
2. Fujimura KE, Lynch SV. Microbiota in Allergy and Asthma and the Emerging Relationship with the Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* 2015; 17(5): 592-602.
3. Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol* 2013; 6(4): 295-308.
4. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486: 207-14.
5. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med* 2016; 8 (1):51.
6. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res* 2013; 69(1): 137-43.

7. Qin J, Li R, Raes J i sur. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464(7285): 59-65.
8. Grice EA, Kong HH, Conlan S i sur. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science* 2009; 324(5931): 1190-2.
9. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 2012; 489: 231-41.
10. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015; 21(29): 8787-803.
11. Plečko V. Normalna flora u čovjeka. U: Kalenić S, ur. *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2013, 312-5.
12. Jimenez E, Marin ML, Martin R i sur. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 2008; 159: 187-93.
13. Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days – intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25: 428-38.
14. Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr* 2009; 98(2): 229-38.
15. Meropol SB, Edwards A. Development of the infant intestinal microbiome: A bird's eye view of a complex process. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2015; 105: 228-39.
16. Mättö J, Maunukela L, Kajander K i sur. Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome - a longitudinal study in IBS and control subjects. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43(2): 213-22.
17. Bennet SM, Ohman L, Simren M. Gut microbiota as potential orchestrators of irritable bowel syndrome. *Gut Liver* 2015; 9(3): 318-31.
18. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol* 2014; 12(10): 661-72.
19. Lee KN, Lee OY. Intestinal microbiota in pathophysiology and management of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2014; 20(27): 8886-97.
20. Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J Gastroenterol* 2011; 17(5): 557-66.
21. Spooren CEGM, Pierik MJ, Zeegers MP, Feskens EJM, Masclee AAM, Jonkers DMAE. Review article: the association of diet with onset and relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38(10): 1172-87.
22. Legaki E, Gazouli M. Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2016; 7: 112-25.
23. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E i sur. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006; 55(2): 205-11.
24. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology* 2015; 148, 1244-60.
25. Shanahan F, van Sinderen D, O'Toole PW, Stanton C. Feeding the microbiota: transducer of nutrient signals for the host. *Gut* 2017; 66(9): 1709-17.
26. Cao Y, Wu K, Mehta R i sur. Long-term use of antibiotics and risk of colorectal adenoma. *Gut* 2017; ;0: 1-7.
27. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 2016; 352: 539-44.
28. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS i sur. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22(2): 292-8.
29. Narayanaswami V, Dvoskin LP. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets. *Pharmacol Ther* 2017; 170: 116-47.
30. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(3): 979-84.
31. Schwartz A, Taras D, Schäfer K i sur. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18(1): 190-5.
32. Krznarić Ž. Debljina i mikrobiota. *Plivamed.net* [internetska stranica] 2017. Dostupno na URL adresi: <http://www.plivamed.net/aktualno/clanak/12881/Debljina-i-mikrobiota.html>. Datum pristupa informaciji: 18. prosinca 2018.
33. Samuel BS, Shaito A, Motoike T i sur. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain-fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(43): 16767-72.
34. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(4): 460-9.
35. Gupta RS, Singh AM, Walkner M i sur. Hygiene factors associated with childhood food allergy and asthma. *Allergy Asthma Proc* 2016; 37: 140-6.
36. Aberg N. Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 59-63.
37. Prescott SL. Early-life environmental determinants of allergic diseases and the wider pandemic of inflammatory noncommunicable diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131(1): 23-30.
38. Abrahamsson TR, Wu RY, Jenmalm MC. Gut microbiota and allergy: the importance of the pregnancy period. *Pediatr Res* 2015; 77(1-2): 214-9.
39. Hojsak I, Fabiano V, Pop TL i sur. European guidance on paediatric use of probiotics states that benefits are limited to several conditions and urges caution with specific vulnerable groups. *Acta Paediatr* 2018; 107(6): 927-37.
40. Duran-Pinedo AE, Frias-Lopez J. Beyond microbial community composition: functional activities of oral microbiome in health and disease. *Microbes Infect* 2015; 17(7): 505-16.

41. Liu B, Faller LL, Klitgord N i sur. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS One* 2012; 7(6): e37919.
42. Fierer N, Lauber CL, Zhou N, McDonald D, Costello EK, Knight R. Forensic identification using skin bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(14): 6477-81.
43. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e744-51.
44. Hiergeist A, Glasner J, Reischl U, Gessner A. Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR J* 2015; 56: 228-40.
45. Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 1990; 345: 63-5.
46. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN i sur. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635-8.
47. van den Elsen LW, Poyntz HC, Weyrich LS, Young W, Forbes-Blom EE. Embracing the gut microbiota: the new frontier for inflammatory and infectious diseases. *Clin Transl Immunol* 2017; 6: e125.
48. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995; 59: 143-69.
49. Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 312-22.
50. Schutte UM, Abdo Z, Bent SJ i sur. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 80: 365-80.
51. Lim MY, Song EJ, Kim SH, Lee J, Nam YD. Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling. *Syst Appl Microbiol* 2018; 41: 151-7.

SUMMARY

HUMAN MICROBIOTA AND MICROBIOME

I. ANTAL, M. JELIĆ, S. SILA¹, S. KOLAČEK¹ and A. TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ

*Dr. Fran Mihaljević University Hospital for Infectious Diseases, Zagreb and
¹Zagreb Children's Hospital, Zagreb, Croatia*

Human microbiota consists of all microorganisms living in symbiosis with the human body, and human microbiome contains 100-fold more genes than the human genome. Although microorganisms can be found in various niches of the human body, the most numerous is the gut microbiota. The microbiota is variable among healthy people and unique for an individual, and it is influenced by many different factors. It is still unclear what exactly a healthy microbiota is, but some of its roles in physiological processes in health are known. On the other hand, in case of imbalance of the microbiota, or dysbiosis, diseases may develop. Dysbiosis is often associated with the emergence of many pathological conditions, of which the most studied are obesity, chronic inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, colorectal cancer, allergic diseases of children, and oral cavity diseases. Development of methods that do not depend on the cultivation of microorganisms has significantly improved the study of microbiota and contributed to better understanding of the interaction of nonpathogenic microorganism populations with each other and with their host. This is paving the way for studying the influence of microbiota on the development of diseases, as well as applying microbiota modification for preventive and therapeutic purpose.

Key words: microbiota, microbiome, dysbiosis, methods for studying microbiota