



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01030

(22) Data de depozit: 18.10.2011

(41) Data publicării cererii:  
28.09.2012 BOPI nr. 9/2012

(71) Solicitant:  
• CENTRUL DE BIOCHIMIE APLICATĂ ȘI  
BIOTEHNOLOGIE -BIOTEHNOL-  
BUCUREȘTI, BD. MĂRĂȘTI NR.59,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• VAMANU EMANUEL,  
ALEEA VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR.3,  
BL.A10, SC.D, ET.2, AP.53, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO

### (54) GIS1 SISTEM UNICAMERAL DE SIMULARE IN VITRO A TRACTULUI GASTROINTESTINAL UMAN

#### (57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un sistem de testare *in vitro* a efectului tranzitului prin tractul gastrointestinal uman, în două faze, în cazul unor tulpini de bacterii lactice și a lactulozei. Sistemul asigură, într-o primă fază, determinarea viabilității bacteriilor lactice prin simularea separată a condițiilor din fiecare segment al sistemului digestiv constând din stomac și intestin subțire, și în a doua fază, din colon. În faza 1 se realizează sistemul de simulare *in vitro*, realizarea mediului la nivelul stomacului, simularea tranzitului dintre stomac și intestinul subțire, testarea efectului pancreatinei și a sărurilor biliare la nivel intestinal, simularea absorbției, determinarea viabilității microbiene, determinarea raportului tulpinilor utilizate. Faza 2 cuprinde simularea microflorei colonului printr-o fermentație continuă de 46 h, simularea condițiilor din colonul ascendent, transversal și descendent, și analiza microbiologică în vederea stabilirii raportului dintre diferitele grupe de microorganisme.

Revendicări: 1  
Figuri: 2

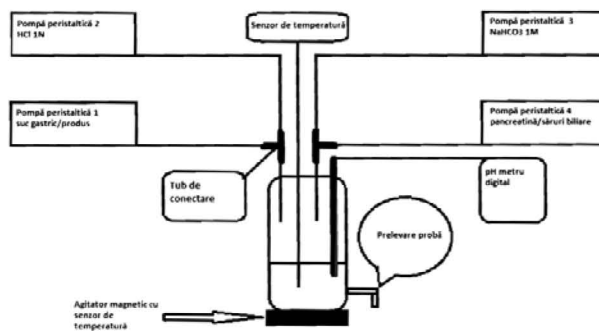


Fig. 1



## DESCRIEREA INVENȚIEI

### GIS1 - SISTEM UNICAMERAL DE SIMULARE *IN VITRO* A TRACTULUI GASTROINTESTINAL UMAN

Invenția se referă la un sistem *in vitro* de testare a efectului tranzitului unor tulpini de bacterii lactice prin tractul gastrointestinal uman în două faze. Scopul invenției este determinarea viabilității acestor tulpini microbiene la tranzitul prin stomac și intestinul subțire, precum și a efectului lor asupra microbiotei simulate a colonului în vederea utilizării acestora în produse funcționale și alimentare.

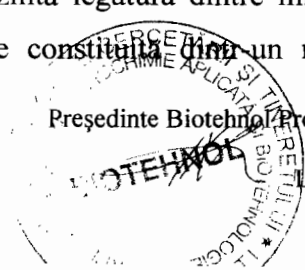
Faza 1 implică efectul tranzitului prin stomac și intestinul subțire. Faza a doua testează efectul tulpinilor asupra microbiotei simulate a colonului, prin determinarea raportului dintre diferite tulpini microbiene. Testele efectuate în prezenta invenției au fost efectuate pe o microfloră simulată a colonului unui bebeluș, la nivelul căruia există un echilibru fragil. O astfel de microfloră poate demonstra mult mai clar efectul exercitat de către tulpinile testate. De asemenea, s-a determinat efectul lactulozei, ca prebiotic, în timpul testelor din cadrul ambelor faze.

Utilizarea unor produse funcționale ca suplimente în corectarea disfuncțiilor microflorei intestinale normale reprezintă una dintre metodele actuale. O alternativă o reprezintă produsele fabricate prin fermentarea laptelui de către bacterii lactice probiotice specifice. Efectul lor este limitat de tulpinile utilizate la fabricarea produselor lactate. De multe ori acestea sunt utile la realizarea produsului, dar în momentul ingerării își pierd o mare parte din viabilitate datorită pH gastric și/sau prezenței pancreatinei și a acizilor biliari din intestinul subțire. Alegerea tulpinilor se face în principal pe baze economice, în detrimentul utilizării de tulpini ce pot supraviețui tranzitului gastrointestinal și a capacității de colonizare la nivel intestinal.

Prebioticele și bacteriile lactice probiotice au efecte semnificative asupra creșterii rezistenței organismului la boli. Viabilitatea la trecerea prin compartimentul gastric și intestinal uman reprezintă elementul esențial pentru desfășurarea activității lor *in vivo*. Produsele care combină pre- și probiotice sunt numite sinbiotice. Alegerea pre- și probioticelor trebuie să se bazeze pe cercetări științifice. Tulpinile utilizate trebuie să fie alese pe baza unor studii *in vitro*.

Cea mai importantă și mai numeroasă comunitate microbiană din corpul uman se află la nivelul intestinului. Un interes major îl reprezintă legătura dintre microbiota intestinală și starea de sănătate. Microbiota colonului este constituită dintr-un număr foarte mare și

Președinte Biotehnologiei Prof. dr. Câmpeanu Gheorghe  
Lector dr. Vamanu Emanuel



diversificat de tulpini microbiene. Relația dintre aceste microorganisme și sănătatea umană reprezintă o temă actuală de cercetare. Principalul rol pe care îl are și pe care trebuie să îl îndeplinească o reprezintă facilitarea absorbției de nutrienți și cel de protecție împotriva unor tulpini patogene. Colonizarea intestinului reprezintă un proces complex, care depinde de interacțiunea cu mediul, regimul alimentar și diferiți factori interni ai gazdei. Tulpinile care colonizează diferitele părți ale tractului gastrointestinal uman se caracterizează prin persistență.

Unul dintre cele mai interesante și mai utilizate modele pentru testarea influenței unui produs alimentar sau nutraceutic asupra microbiotei intestinale o reprezintă simularea colonului bebelușilor. Acesta este un ecosistem fragil, și direct influențat de către dietă sau alte produse ingerate ce conțin tulpini viabile de microorganisme. La acest nivel colonizarea începe imediat după naștere, cu tulpini care sunt comune microbiotei materne. Acestea provin din flora vaginală și cea intestinală. Primele grupe de microorganisme sunt cele strict anaerobe și facultativ anaerobe cum ar fi enterobacteriile, coliformii și lactobacilii. Deși este mai stabilă, microflora adultului este perturbată în principal de tratamentul cu antibiotice sau de către bolile infecțioase.

Lucrarea "Single bioreactor gastrointestinal tract simulator for study of survival of probiotic bacteria", autori I. Sumeri, L. Arike, K. Adamberg, T. Paalme, 2008 determină rezistența a patru tulpini de bacterii lactice probiotice (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *Lactobacillus johnsonii* NCC 533, *Lactobacillus casei* strain Shirota și *Lactobacillus rhamnosus* GG) la pH gastric și sărurile biliare într-un bioreactor, la ingerarea de alimente. Rezultatele depind de modelul alimentar utilizat, având un procent de supraviețuire cuprins între 10 și 100%.

Lucrarea " Immobilization of Infant Fecal Microbiota and Utilization in an in vitro Colonic Fermentation Model", autori C. Cinquin, G. Le Blay, I. Fliss, C. Lacroix, 2004 determină efectul imobilizării tulpinilor din fecalele bebelușilor în timpul simulării tranzitului prin cele trei segmente ale colonului, la nivelul unui singur bioreactor.

Prezenta inventivă dezvoltă un sistem *in vitro* de testare a viabilității tulpinilor probiotice de bacterii lactice la tranzitul prin stomac și intestinal subțire și a influenței asupra microbiotei simulate a colonului, prin utilizarea a două tulpini probiotice *Lactobacillus paracasei* YR and *Enterococcus faecium* VL47 și a unui prebiotic, lactuloză. Sistemul GIS1 simulează separat tranzitul prin stomac și intestinal subțire – Faza 1 și efectul asupra microbiotei colonului – Faza 2, ce cuprinde cele trei segmente ale colonului. Faza 1 simulează efectul exercitat de pH, sinteza de acid clorhidric și pepsină – stomac, efectul trecerii din

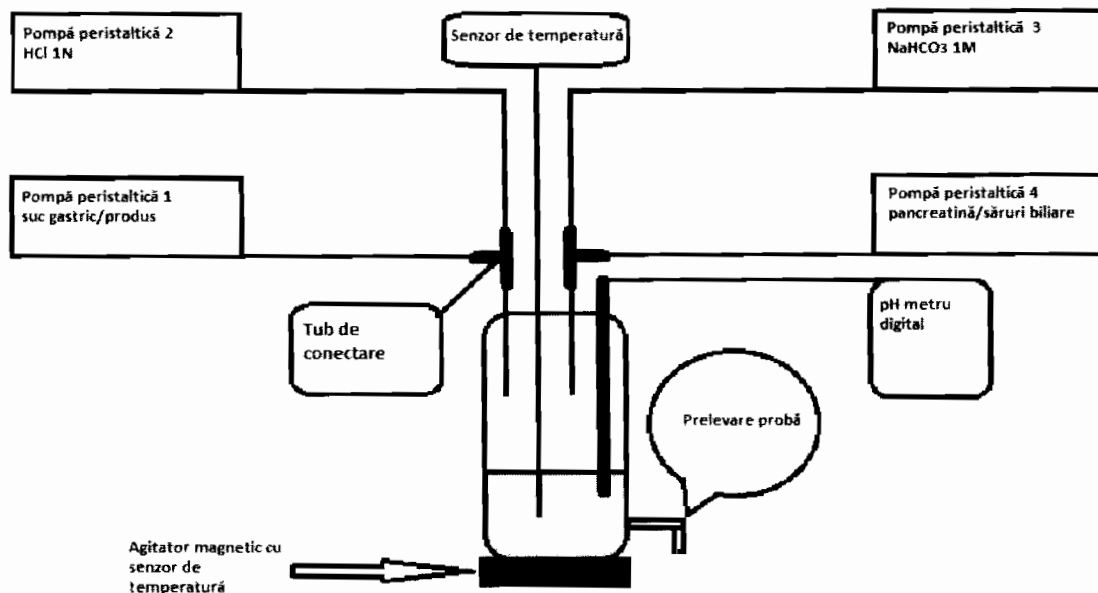
stomac în intestinal subțire și acțiunea pancreatinei și a sărurilor biliare. Faza 2 simulează colonul pe baza timpului de retentive și al pH fiecărui segment al acestuia (colon ascendant, colon transversal și colon descendent).

Structura de bază a sistemului GIS1 este compusă din:

- un vas Duran din sticlă borosilicată, capacitate 1000 mL, prevăzut cu un dop filetat cu patru intrări;
- un pH metru digital Hanna Benchtop HI 2211, cu un electrod de 4 mm grosime sterilizabil;
- 4 pompe peristaltice Behrotest, Type PLP 33, debit 0.4 - 2.0 L/h;
- un agitator magnetic cu plită ceramică încălzită IKA C-MAG HS 7 și senzor de temperatură.

GIS1 este conceput a funcționa în două etape distincte:

**Exemplu Etapa 1: Simularea tranzitului prin stomac și intestinul subțire – evaluarea viabilității unei tulpini microbiene.**

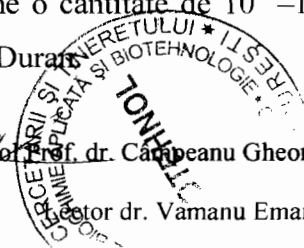


**FIGURA 1**

**Schema de simulare a tranzitului prin stomac și intestinul subțire prin sistemul GIS1**

Condițiile de operare sunt următoarele:

1. 100 ml HCl 0,01N și 40 ml suc gastric simulat – pompa 1 (pepsină 3g/L, mucină 3 g/L au fost dizolvate în NaCl 0,5%) se adaugă în vasul Duran pentru a simula condițiile din stomac, se ajustează pH la 2 cu HCl 1N.
2. 200 ml produs liofilizat (dizolvat în NaCl 0,5%) ce conține o cantitate de  $10^9 - 10^{10}$  UFC/ml de bacterii lactice se introduc cu pompa 1 în vasul Duran.



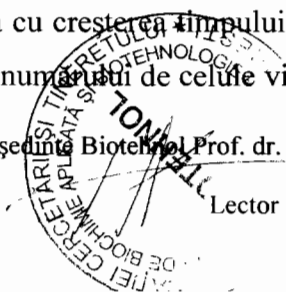
3. pH se aduce la valoarea 3 cu 1N HCl – pompa 2 într-o perioadă de maximum 1.5 ore.
4. conținutul se neutralizează la pH 6.0 prin adăugarea a 1 M NaHCO<sub>3</sub> – pompa 3 la o rată de 4.5 ml/min pentru a simula trecerea din stomac în duoden, într-o perioadă de maxim 10 min.
5. se adaugă 60 ml săruri biliare 7.5 g/L și 100 mL pancreatină 30 g/L – pompa 4 în sistem cu o rată de 4 ml/min, timp de 10 min.
6. pH culturii în vasul Duran a fost menținut la o valoare de 6 – 6.5 prin adăugarea a NaHCO<sub>3</sub> 1M, pe o perioadă de până la 7 ore. Rolul său este și acela de a simula absorbția de la nivelul intestinului subțire.

Toate soluțiile sunt preparate înainte de fiecare experiment. Se iau probe la fiecare oră pentru a determina viabilitatea microbiană prin însămânțare pe mediu agarizat specific tulpinii testate. Pentru analiza viabilității se realizează diluții în ser fiziologic steril, iar determinarea numărului de colonii se face în mod automat cu ajutorul ColonyQuant, printr-un soft specializat. Capacitatea de supraviețuire ( $C_S$ ) se calculează conform următoarei formule:

$$C_S = \text{Viabilitatea la } T_f / \text{Viabilitatea la } T_0.$$

Modelul descris de simulare gastrointestinală a fost validat pe baza unei serii de trei teste efectuate cu cele două tulpini microbiene cu și fără prezența prebioticului (lactuloză), dar și în prezența unei tulpini probiotice cunoscute (*Lactobacillus acidophilus* LA1). Timpul normal de tranzit al bolului alimentar prin stomac este de aproximativ 20 - 30 min. Nivelul acidității variază de la o persoană la alta. La nivel gastric pH scăzut este prima barieră împotriva microorganismelor ingerate. Pentru a obține o caracterizare cât mai exactă *in vitro*, pH nu este singura condiție care trebuie îndeplinită. Datorită acestor diferențe s-a ales ca valoare de întâlnită pentru teste pH 3 și prezența mucinei ca o componentă normală a conținutului gastric. Rolul său este interpretat și ca acela de a oferi o protecție pH scăzut atât mucoasei, cât și, în timpul tranzitului, tulpinilor microbiene probiotice.

Prezența lactulozei a oferit o protecție crescută asupra viabilității tulpinilor testate. Diferența dintre viabilitatea determinată la 1 și 2 ore de expunere gastrică simulată a fost de maximum 4%. Valoarea s-a păstrat constantă. După două ore tulpinile din produs au fost expuse la conținutul simulat al intestinului subțire. S-a observat o diferență relativ constantă între tulpini, la perioada de expunere în mediul intestinului subțire simulat. Prezența prebioticului a conferit o protecție suplimentară, prin mărirea valorii  $C_S$ . Scăderea mai mare a viabilității, în jur de 25%, a avut loc în primele 2 ore de expunere la conținutul intestinului subțire. Diferențele au fost de 15% și au scăzut odată cu creșterea timpului de staționare. La nivelul intestinului subțire o pierdere peste jumătate a numărului de celule viabile s-a observat



În lipsa lactulozei după 4 ore de testare în sistemul GIS1. Pentru prezența lactulozei tulpinile au prezentat o pierdere de cel puțin 50% a numărului de celule viabile după 5.5 ore de testare. În prezența prebioticului (lactulozei) viabilitatea celulară a crescut cu minimum 30% ( $P < 0.05$ ). Este de remarcat și faptul că mărirea Cs nu s-a realizat prin multiplicare celulară, atât la nivel gastric cât și al intestinului subțire simulat. Viabilitatea pentru ambele variante nu a scăzut sub  $10^7$ , indiferent de perioada de timp în care s-a realizat testarea. La o astfel de trecere viabilitatea unor tulpini probiotice *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus johnsonii* LA1 este în jur de 41%. Valorile obținute se încadrează în aceste limite pentru varianta în care este prezent prebioticul ( $P < 0.05$ ). Astfel, atât la nivel gastric cât și în la cel al intestinului subțire supraviețuirea poate fi îmbunătățită și prin prezența unui prebiotic (lactuloză), constatarea fiind susținută de studii care au utilizat xilooligozaharide și fructooligozaharide.

Pentru o mai bună caracterizare a viabilității și comportamentului celor două tulpini în sistemul GIS1 s-a stabilit procentul de viabilitate a fiecărei tulpini în comparație cu tulpina LA1. Acesta a prezentat diferențe mari, în prezența lactulozei. Tulpina YR este puternic inhibată de pH gastric, dar și de trecerea în intestin, exercitată prin adăugarea de săruri biliare și pepsină după 2 ore. Pierderea viabilității în mediul gastric simulat a fost de aproximativ 25%. Prezența sărurilor biliare a făcut ca viabilitatea să mai piardă 50%, în medie, în decursul unei ore. Tulpina YR a fost complet inhibată până la 4 ore. În schimb VL47 și LA1 s-au dovedit a fi mai rezistente. Cea mai rezistentă a fost VL47, care din punct de vedere a numărului de celule a prezentat o viabilitate medie de 5 log CFU/ml comparativ cu LA1, a cărei viabilitate a scăzut semnificativ, cu aproximativ 33%, în prezența conținutului gastric simulat, până la 7 log CFU/ml. După simularea tranzitului în conținutul intestinului subțire, LA1 s-a dovedit a fi foarte rezistentă, în comparație cu VL47. Chiar dacă viabilitatea a mai scăzut cu 30% pe parcursul a patru ore, ea a fost în final mai mare decât cea a VL47, cu aproximativ 1 – 2 log CFU/ml.

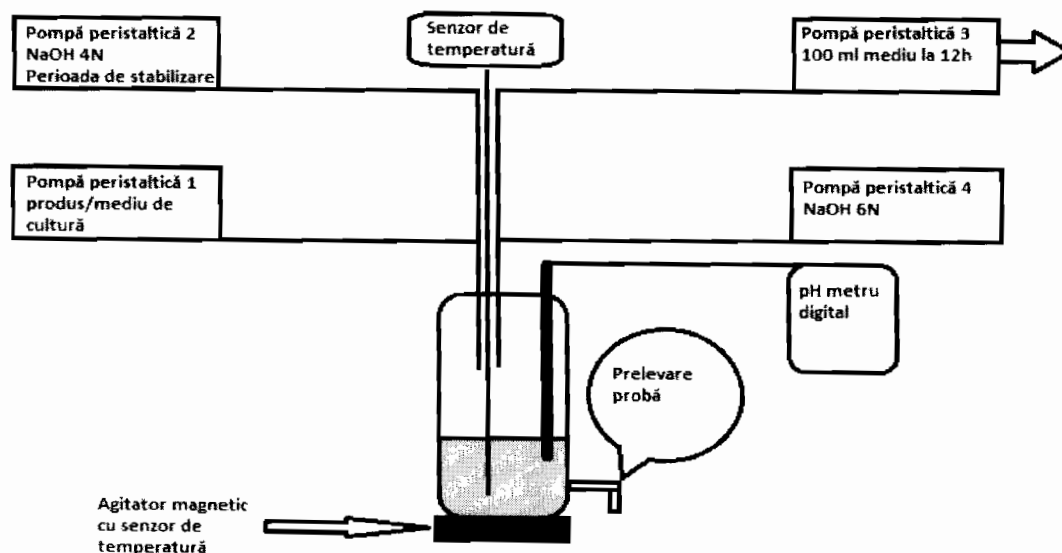
În lipsa lactulozei, pierderea viabilității a fost mai accentuată pentru tulpina YR, cât și pentru LA1. La nivel gastric, scăderea de viabilitate pentru YR a avut o medie de 10% față de prezența lactulozei în sistemul GIS1, pierzând în totalitate viabilitatea după 4 ore în sistemul GIS1. În schimb, pentru LA1, scăderea a fost mai mare cu peste 35%, ajungând la aproximativ 3 log CFU/ml. Ca și în determinările precedente, tulpina a fost mai rezistentă în mediul intestinului subțire simulat. La nivelul intestinului subțire, viabilitatea a scăzut cu câte 10%, pe parcursul unei ore. VL47 a prezentat o viabilitate mai mică, în absența lactulozei, cu 1 – 2 log CFU/ml. Astfel, aceste două tulpini s-au adaptat mai bine condițiilor din intestin

decât YR, care trebuie să fie într-o cantitate mai mare în momentul ingerării, pentru a supraviețui tranzitului.

Capacitatea de supraviețuire individuală a tulpinilor a fost de cel puțin 0.5 după cinci ore. O valoare similară a fost determinată și pentru LA1, după aproximativ 2.5 ore de la tranzitul dintre compartimentul gastric în cel al intestinului subțire. Dacă lipsește lactuloza, timpul în care LA1 și YR și VL47 ajung la o valoare de 0.5 a capacității de supraviețuire scade cu până la o oră.

Deoarece tulpinile probiotice sunt afectate în mod direct în momentul intrării în stomac de pH scăzut, rezultă că viabilitatea mai bună, obținută în prezența lactulozei s-a datorat exclusiv acesteia. Aceste diferențe au demonstrat că prezența lactulozei a avut un efect de protecție asupra celulelor bacteriene în timpul tranzitului gastrointestinal, dar poate fi interpretat ca și ca un efect de prelungire a viabilității în timpul depozitării. Acest efect s-a manifestat mai puțin sau nu a influențat deloc viabilitatea tulpinii VL47. În momentul trecerii treptate la pH alcalin, ce a ajuns până în jurul valorii 6, celulele ce au supraviețuit tranzitului au putut chiar să se și multiplice. Un alt moment semnificativ l-a reprezentat trecerea de la mediul gastric la cel intestinal, în care scăderea viabilității observată a fost în medie de 1.5 log CFU/ml. Întreg procesul a depins de caracteristicile fiziologice ale tulpinii, deoarece, pentru YR, această etapă a determinat anularea viabilității. Scăderea numărului de celule a fost influențată și de compoziția produsului.

**Exemplu Etapa 2: Simularea tranzitului prin colon – evaluarea efectului asupra raportului dintre speciile microbiene ce colonizează colonul uman.**



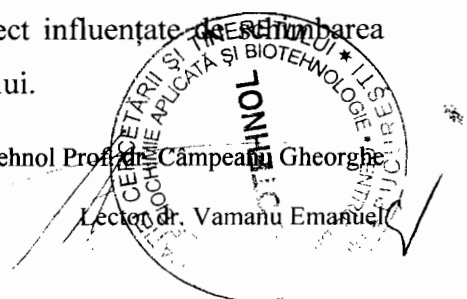
**FIGURA 2**  
**Schema de simulare a tranzitului prin colon**

Condițiile de operare sunt următoarele:

1. 500 mL mediu de cultură pentru simularea conținutului din colon inoculat cu 100 mL soluție fecale pregătite anterior sunt adăugate în vasul Duran pentru perioada de stabilizare, pH 5.7 – 7.5 corectat cu 4N NaOH;
2. se scot cu pompa 3 100 mL mediu fermentat. În același timp se reintroduc cu pompa 1 100 mL de mediu prospăt, la fiecare 12 ore;
3. 15 mL produs liofilizat (dizolvat în 0.5% NaCl) conținând o cantitate de  $10^9 - 10^{10}$  UFC/mL de produs probiotic sunt introduși cu pompa 1 în vasul Duran;
4. pH este ajustat la valoarea 5.6 – 5.9 cu 6 N NaOH – pompa 4, pentru o perioadă de 4 ore – colonul ascendent;
5. pH este ajustat la valoarea 6.2 – 6.5 cu 6 N NaOH – pompa 4, pentru o perioadă de 8 ore – colonul transvers;
6. pH este ajustat la valoarea 6.6 – 6.9 cu 6 N NaOH – pompa 4, pentru o perioadă de 12 ore – colonul descendent.

Toate soluțiile sunt preparate înainte de fiecare experiment. Se iau probe la fiecare oră pentru a determina viabilitatea microbiană. Pentru analiza viabilității se realizează diluții în ser fiziologic steril, iar determinarea numărului de colonii se face în mod automat cu ajutorul ColonyQuant, printr-un soft specializat. Numărul total de anaerobi este determinat prin utilizarea brain heart infusion agar; Mc. Conkey agar pentru coliformi; Azide blood agar base pentru enterococci; Mannitol salt agar pentru stafilococi; Tryptose sulfite cycloserine agar pentru clostridii; Beerens agar pentru bifidobacterii; Rogosa agar pentru lactobacili.

Analiza microbiană a probelor din sistemul GIS1 de simulare a colonului a arătat că prezența celor două tulpini are o influență directă asupra numărului și raportului dintre microorganisme. O creștere mai mare, față de raportul dintre grupele de microorganisme, o are administrarea tulpinilor în prezența a 1% lactuloză. Conform datelor prezentate numărul de lactobacilli și cel al bifidobacteriilor s-a menținut relativ constant. Aceeași tendință observându-se și în cazul enterococilor. Pentru aceste grupuri de microorganism numărul a variat în limita a 0.5 log CFU/mL. Deși numărul de lactobacilli nu depășește limita de 7 log CFU/mL, pe general numărul total de microorganisme anaerobe are o tendință de scădere, la nivelul colonului distal. Aceasta se datorează faptului că și numărul de bifidobacterii scade, deoarece aceste microorganisme sunt direct influențate de schimbarea pH, în timpul tranzitului prin cele trei compartimente ale colonului.



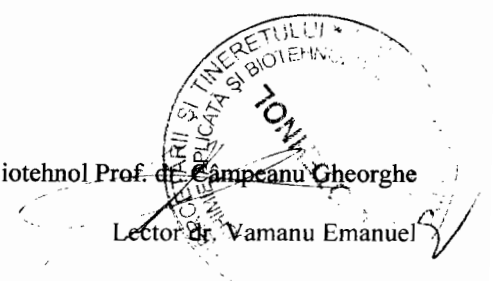


18-10-2011

Deși în general se consideră că și alte grupuri de microorganisme sunt influențate de către pH, în cazul prezenței YR și VL47, fără lactuloză, numărul de microorganisme (coliformii, clostridiile, stafilococi) variază tot în limita a 0.5 log CFU/mL. Scăderea semnificativă a valorii numărului de microorganisme din cele trei grupe menționate au loc în perioada simulării colonului transversal, odată cu creșterea pH până la 6.5. Odată cu trecerea la un pH de maxim 6.9 – 7 (colonul descendent), numărul acestor microorganisme are în general o tendință de scădere, în limita medie de 0.7 CFU/mL. Cel mai mult scade numărul de stafilococi, cu aproximativ 0.8 CFU/mL, iar cel mai puțin cel al clostridiilor cu maxim 0.2 CFU/mL. În schimb, numărul enterococilor se menține relative constant, cu o viabilitate medie de 6.86 CFU/mL. Se observă o tendință de scădere atunci când pH crește, scăderea observându-se, în principal, în timpul simulării ultimei secțiuni a colonului (colonul descendent). Valoarea maxima observându-se în partea colonului ascendent și a primei părți a celui transversal, cu un maxim de 7.1 CFU/mL.

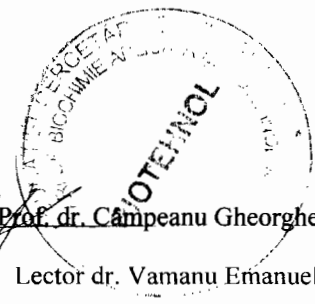
Prezența lactulozei, a determinat creșterea numărului de lactobacilli cu aproximativ 1.0 log UFC mai mare ( $p < 0,01$ ) decât atunci când lipsește. Această tendință se manifestă în principal în perioada de simulare a colonului transversal și descendent. Aceași tendință de creștere a fost observată și pentru bifidobacterii. Pentru enterococi, prezența lactulozei nu are ca efect o creștere a numărului lor, care nu a depășit 7 log CFU/mL. În schimb, se observă o scădere moderată a numărului clostridiilor, în principal în perioada de simulare a colonului ascendent și descendent. Pentru coliformi, se observă o scădere în timpul simulării colonului descendent ( $p < 0,05$ ). Scăderea observată a numărului de microorganisme are ca efect un consum al lactulozei în timpul simulării primelor două secțiuni ale colonului. Numărul de stafilococi, crește ușor, cu un maxim de aproximativ 0.5 log CFU/mL, față de situația în care lactuloza lipsește.

Studiul prezentat a demonstrat efectul pozitiv asupra microbiotei colonului al celor două tulpini, prin studii *in vitro* utilizând sistemul GIS1. Consumul de produse probiotice, în combinație cu prebiotice determină o echilibrare mai rapidă și mai bună a microflorei colonului uman. S-a observat o creștere a numărului tulpinilor anaerobe benefice, ce favorizează o digestie mai bună, necesară persoanelor cu diferite dezechilibre.



**Documente din stadiul tehnicii:**

1. I. Sumeri, L. Arike, K. Adamberg, T. Paalme, Single bioreactor gastrointestinal tract simulator for study of survival of probiotic bacteria, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 80, 317–324.
2. C. Cinquin, G. Le Blay, I. Fliss, C. Lacroix, Immobilization of Infant Fecal Microbiota and Utilization in an in vitro Colonic Fermentation Model, Microbial Ecology, 2004, 48, 128–138.



## REVENDICARE

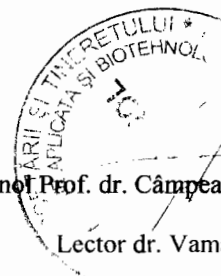
Sistemul de testare *in vitro* GIS1 a efectului tranzitului prin stomac și intestinal subțire – **Faza 1** și efectul asupra microbiotei simulate a colonului – **Faza 2** cuprinde următoarele aspecte descrise mai sus:

### Faza 1:

1. Realizarea sistemului GIS1 de simulare *in vitro*.
2. Realizarea mediului de la nivelul stomacului.
3. Simularea tranzitului dintre stomac și intestinal subțire.
4. Testarea efectului pancreatinei și sărurilor biliare de la nivel intestinal (intestinul subțire).
5. Simularea absorbției de la nivelul intestinului subțire.
6. Determinarea viabilității microbiene.
7. Determinarea raportului între tulpinile.

### Faza 2:

1. Simularea microflorei colonului printr-o fermentație continuă timp de 48 de ore.
2. Simularea condițiilor din colonul ascendent.
3. Simularea condițiilor din colonul transversal.
4. Simularea condițiilor din colonul descendent.
5. Analiza microbiologică în vederea stabilirii raportului dintre diferitele grupe de microorganism.



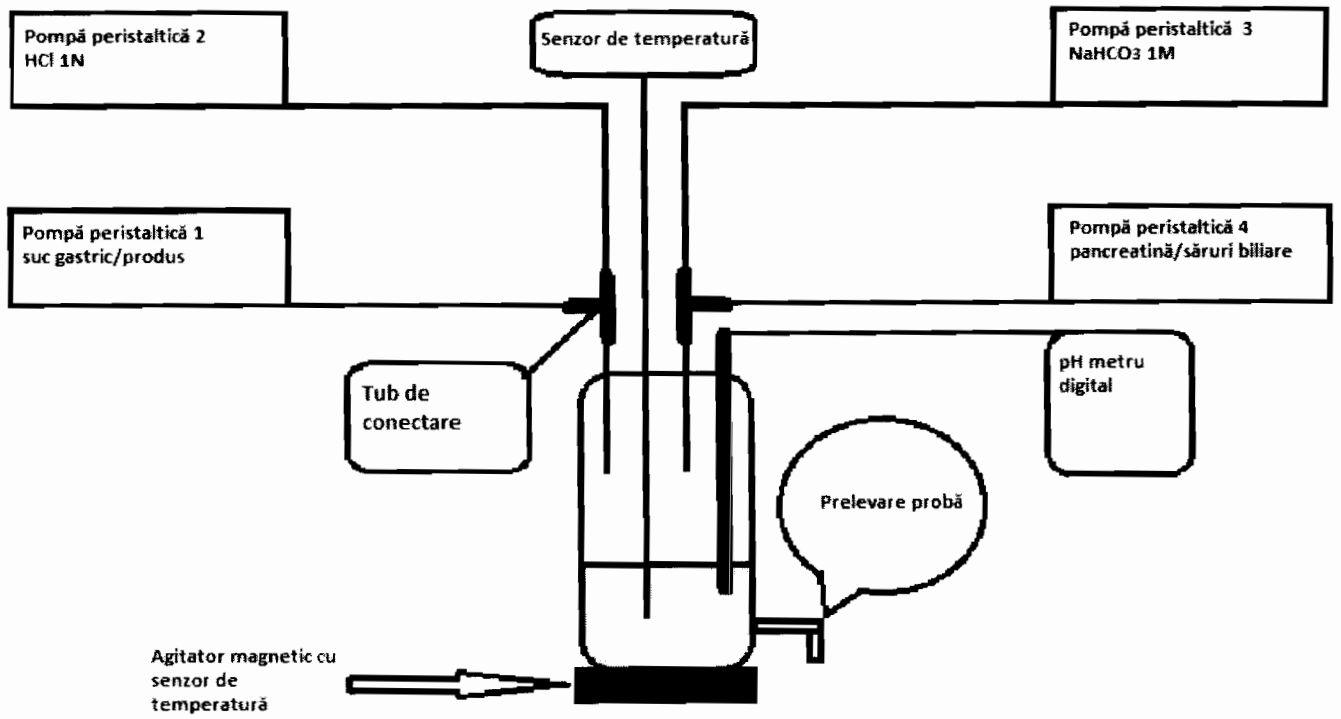
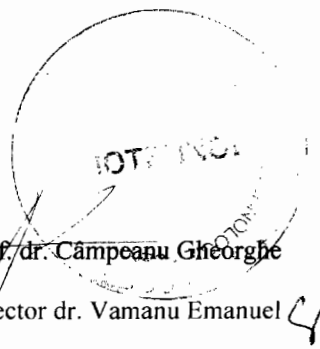


FIGURA 1



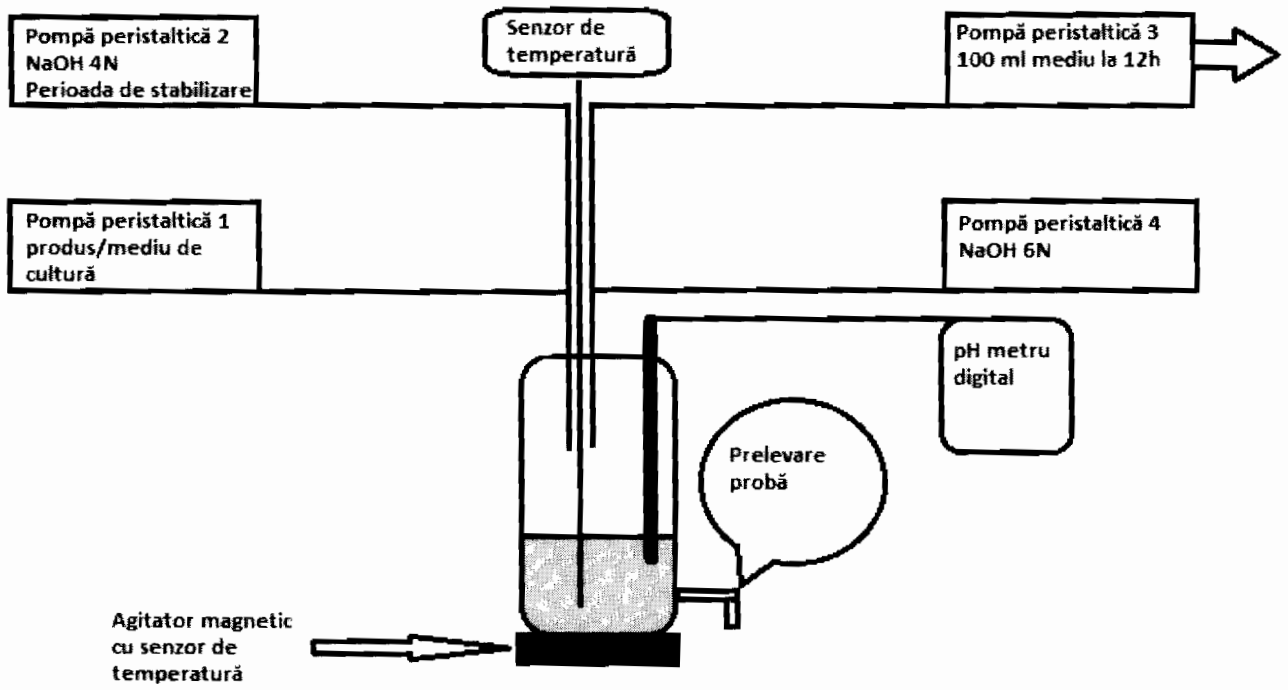


FIGURA 2

