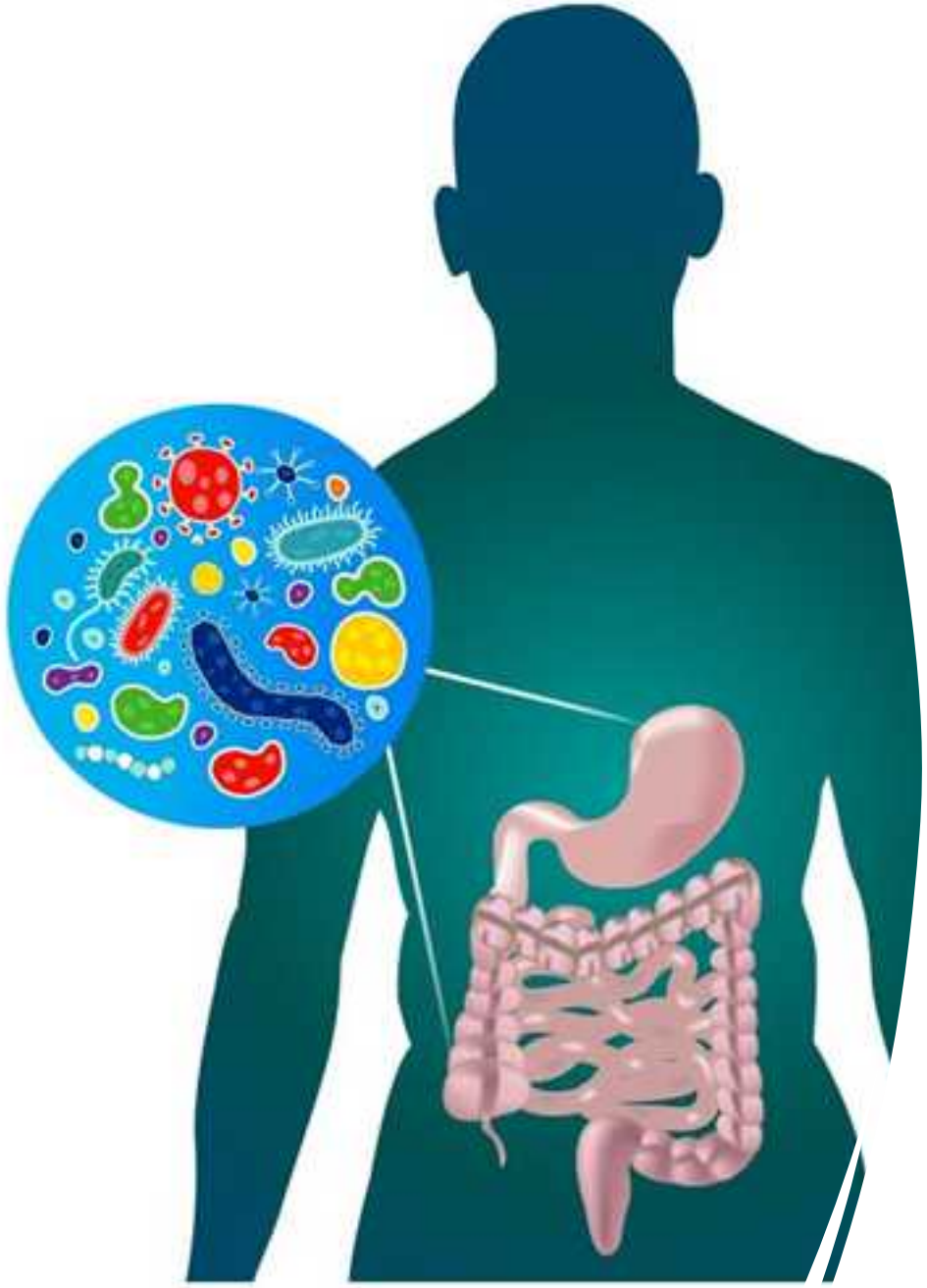
MİKROBİYOM

Prof. Dr. Görkem Yaman

Tıbbi Mikrobiyoloji

Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

SYNLAB Laboratuvarlar Grubu



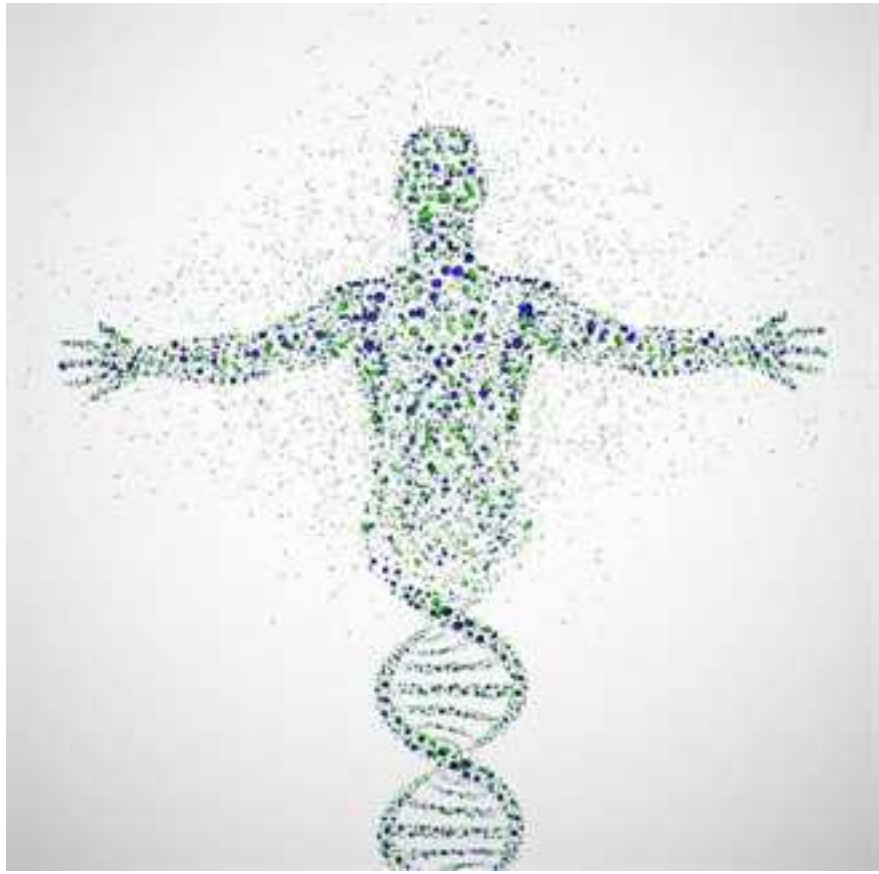
Sunum Özeti

- Mikrobiyom vs Mikrobiyata
- Bağırsak mikrobiyomu nerden geliyor, nasıl şekilleniyor?
- Bağırsak mikrobiyomunun fonksiyonları ve hastalıklarla bağlantısı?
- Mikrobiyom analizleri
- Prebiyotikler ve Probiyotikler

Holobiyont:
ortak ekoloji oluşturan konak ve mikroorganizmalardan oluşan biyomoleküler network
İnsan hücresi:1x
Mikroorganizma hücresi: 1.3x
Total hücre sayımızın %56'sı bakteri!

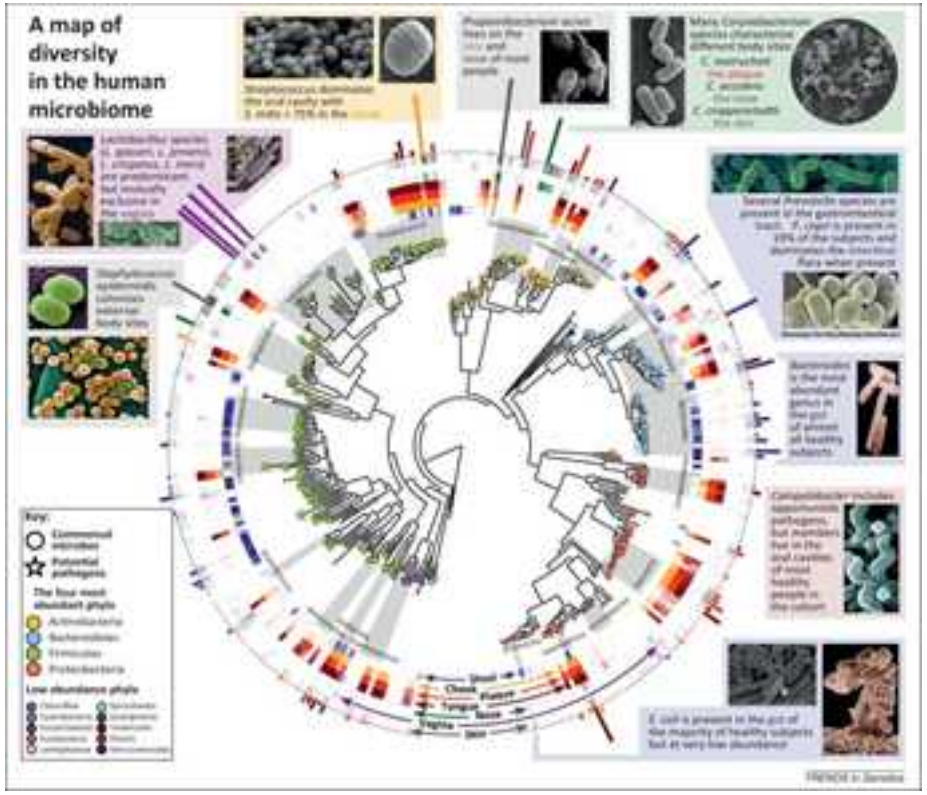
Mikrobiyata – Mikrobiyom Fark Ne?

- Mikrobiyata?
  - Belirli bir çevrede/ortamda yaşayan geniş çeşitlilikte mikroorganizmadır.
- Mikrobiyom?
  - Belirli bir çevre/ortamdaki mikroorganizmaların kollektif genomlarıdır.
  - Tüm genetik materyal (DNA ve RNA) koleksiyonunu içerir.
- Mikrobiyatanın tüm genleri: MİKROBİYOM



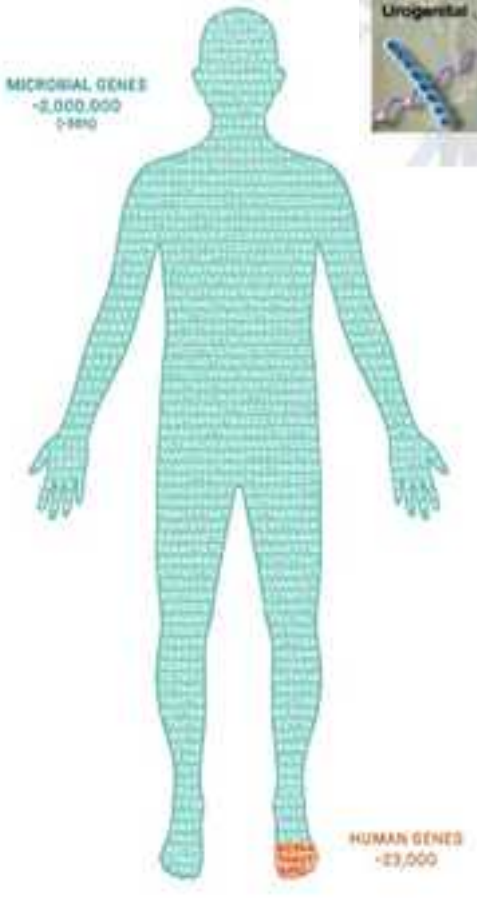
Human Microbiome Project

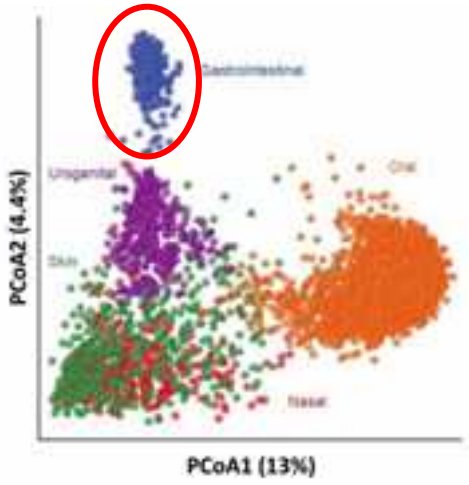
- 2007 – 2016 arasında NIH tarafından desteklendi (215 M$ fon)
- Amaç: İnsan mikrobiyomunun temel özelliklerini kapsamlı şekilde değerlendirmek ve sağlık/hastalıktaki rolünü analiz etmek
- 2000'lerde geliştirilen DNA sekanslama teknikleri ile gerçekleşti (16S rRNA ve Metagenomik tüm genom sekanslama)
- 18-40 yaşları arasında 300 sağlıklı erişkinden 5 majör vücut alanından (oral kavite, nazal kavite, deri, gastrointestinal ve ürogenital yol) toplam 11,000 örnekleme yapıldı.
- 1000'in üzerinde yayın



İnsan Mikrobiyomu

- >10,000 tür, 2 milyon mikrobiyal gen (23bin insan geni)
- Bakteri, mantar, virüsler, fajlar, arkeler, protozoalar
- 100 trilyon bakteri (%95'i GIS'de, ~2 kg)
- Metabolik olarak çeşitli, aktif ve değişken bir «mikrobiyal organ»
- İnsan genomuna kıyasla medikal açıdan manipüle edilebilir!

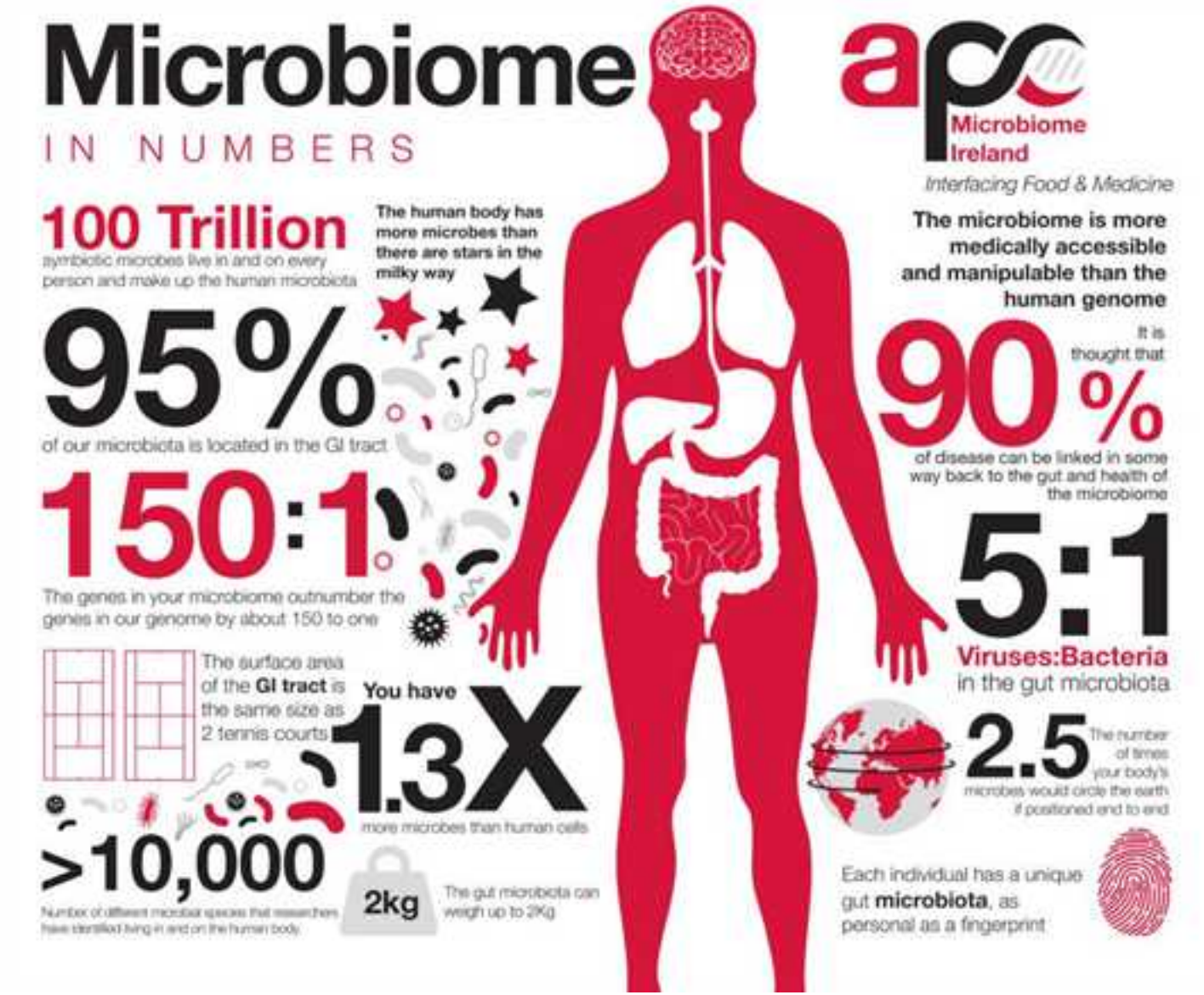




Bölge	Sayı
Ağız	10^{10}
Akciğerler	~10^{9}/ml
Anne sütü	~10^{9}/L
Deri	10^{12}
GİS	10^{14}
Vajen	10^{9}/ml

BARSAK MİKROBİYOMU

- Tüm mikrobiyatanın %95'i barsakta lokalize
- Aynı parmak izi gibi her bireyin <u>benzersiz bir barsak mikrobiyomu</u> mevcut
- **Hastalıkların %90'ının bir şekilde barsakla ve mikrobiyom sağlığıyla ilişkilendirilebileceği düşünülüyor.**



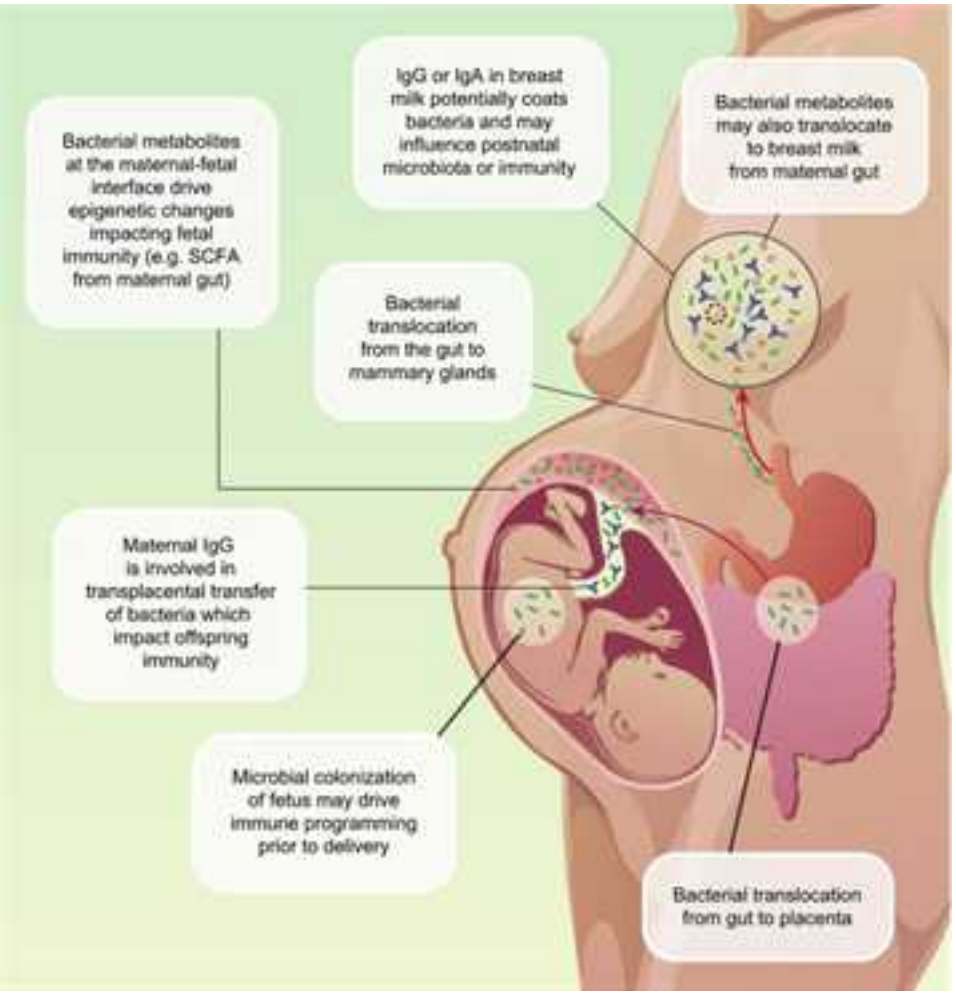
Mikrobiyom nereden geliyor?

- En önemli kaynak anne bağırsak mikrobiyatası!
- Bakteriler bebeğin sindirim, solunum, ürogenital yollarına ve derisine geçiyor.
- Doğumdan bir hafta sonra bebeklerin barsak mikrobiyomunda az sayıda Firmicutes ile birlikte Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes içeren mikrobiyom yerleşiyor.
- Anne sütü ile (oligosakkaridler) başlayan mikrobiyom matürasyonu 2-3 yaşına kadar devam ediyor. Aynı dönemde immün sistem de gelişiyor.
- Mikrobiyomun kodladığı metabolik yolaklar ile insan genomunun kapasitesi artırıyor veya genişliyor.

Clinical & Experimental Immunology
The Journal of Translational Immunology
immunology
doi: 10.1111/cei.13331
Clinical and Experimental Immunology REVIEW ARTICLE
REVIEW SERIES: IMMUNOLOGY OF PREGNANCY
Series Editors: Angelo A. Manfredi and Patrizia Rovere-Querini

Influence of maternal microbiota during pregnancy on infant immunity

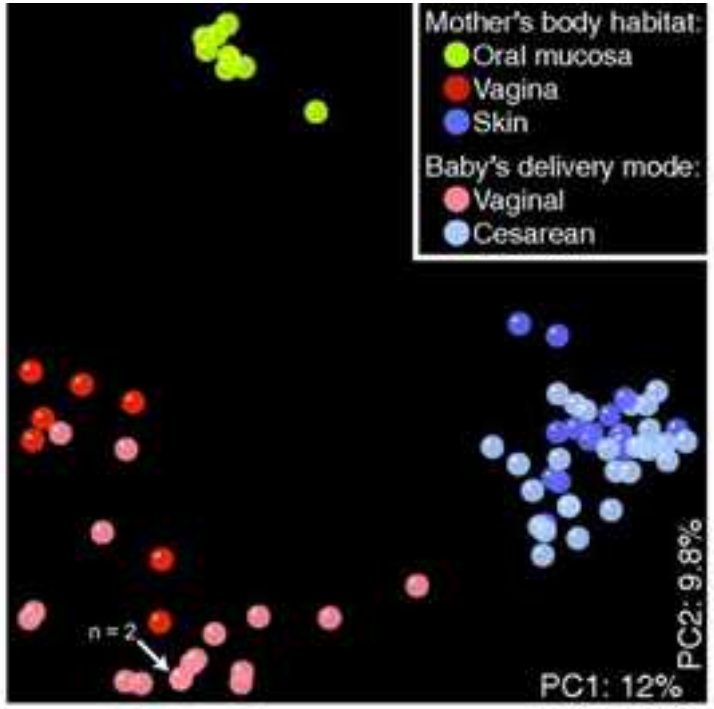
- Hamilelik sırasında maternal bağırsak mikrobiyatası plasentaya veya fetal bağırsağa transloke oluyor.
- Plasentada Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes ve Fusobacteria filumuna ait geniş spektrumda mikrobiyata saptandı.
- Epigenetik değişiklikler, kısa zincirli yağ asitleri ve sitokin değişiklikleri ile fetal immunite gelişimine etki ediyorlar.
- Meme bezlerine geçen bakteri veya metabolitleri doğumdan sonra infantın bağırsak kolonizasyonu ve devam eden immünite gelişimine etki ediyor.



- Potential mechanisms of crosstalk between maternal microbiota and offspring immunity. Maternal gut microbiota during pregnancy translocate to the maternal-fetal interface. Commensals microbes translocate from the maternal gut to the placenta or fetal gut during pregnancy (maternal gut placenta axis) or to mammary glands. These microbes impact developing fetal immunity via various mechanisms including epigenetic changes, release of short chain fatty acids and alteration of the cytokine environment. Bacteria or bacterial metabolites transfer to the mammary glands (gut-breastmilk axis) impacting infant gut colonization and continued immune development after delivery.

Normal doğum - Sezeryan

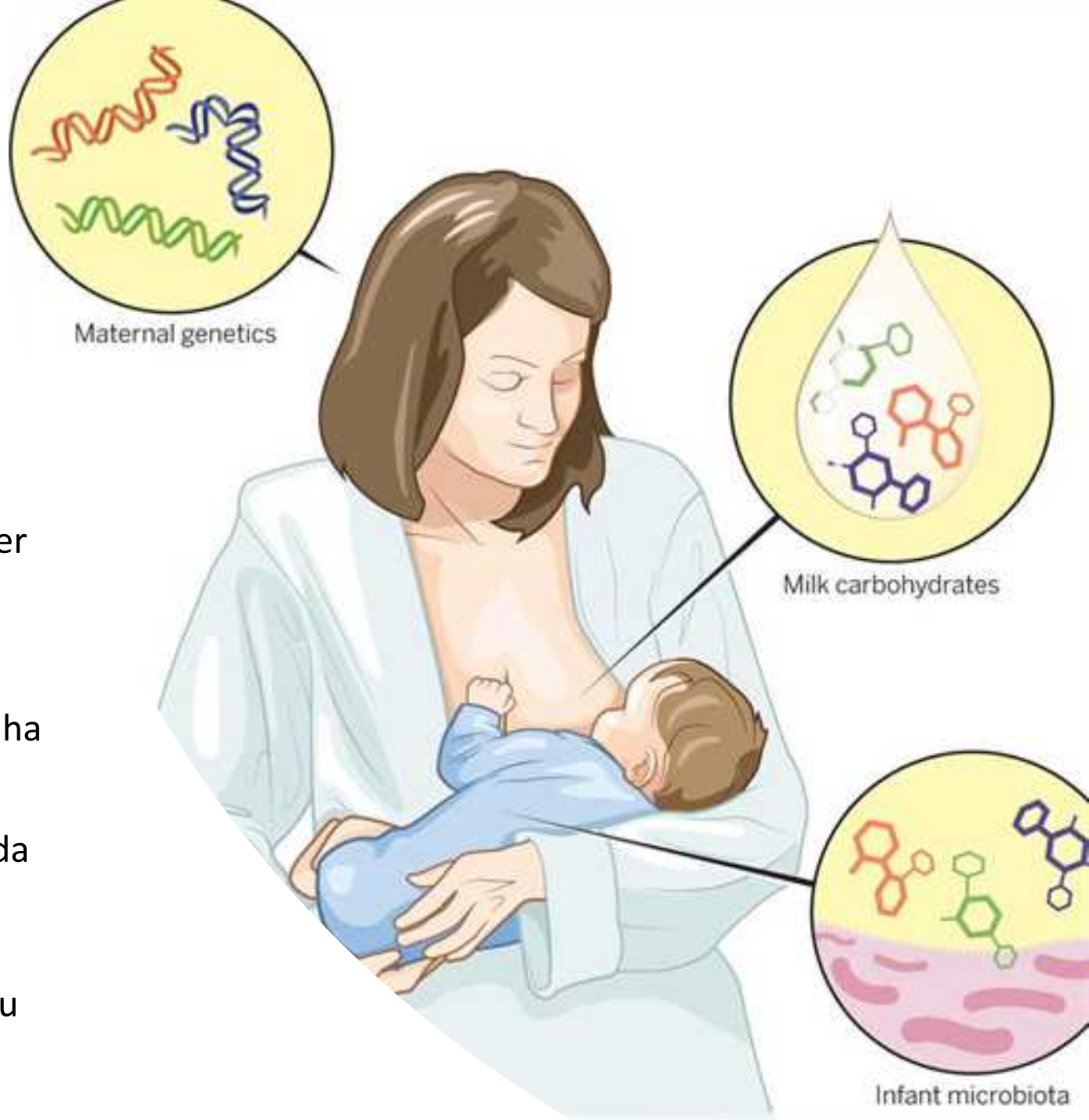
- Bebeklerin ilk mikrobiyataları doğum şekillerine göre değişiyor.
  - Normal vajinal doğum ile Lactobacillus ve Prevotella türleri ile kolonizasyon.
  - Sezeryan doğumda Clostridium, Staphylococcus, Propionibacterium ve Corynebacterium'lar dominant.
- Sezeryan doğanlarda Bacteroides ve Bifidobacterium gibi anaerob bakterilerin miktarı düşük.
- Bu değişiklik 7 yıl kadar sürüyor ve sezeryanla doğanların bağırsaklarında daha az tür bulunuyor (çeşitlilik düşük).
- Sezeryan doğum; inflamatuvar bağırsak hastalığı, tip 1 diyabet, çölyak hastalığı, çocukluk çağı astımları ve obezite riski ile ilişkilendirilmiş.
- Hayatın ilk haftasında gerçekleşen bağırsak kolonizasyon paternleri bireyin gelecekteki mikrobiyata kompozisyonunu ve sağlığını çeşitli faktörlerle etkiliyor.



Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Maria G. Dominguez-Bello, Elizabeth K. Costello, Monica Contreras, Magda Magris, Glida Hidalgo, Noah Fierer, and Rob Knight. PNAS June 29, 2010 107 (26) 11971-11975; https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107

Anne sütü

- Anne sütünde Staphylococcus, Streptococcus, Bifidobacterium ve Lactobacillus gibi bakteriler bulunuyor.
- Bifidobacterium ve Bacteroides gibi probiyotikler sütte bulunan sindirilemeyen karbonhidratları kolonda fermente ediyor.
- Formül sütle beslenen bebeklerde ise anne sütündeki oligosakkaridler bulunmadığından Clostridium dominansı görülüyor ve çeşitlilik daha düşük saptanıyor.
- Mikrobiyomun sağladığı sinyaller ile doğal bağışıklık aktive olurken T reg hücreler ve sIgA da indükleniyor ve yardımcı T hücrelerin over-aktivasyonu engelleniyor.
- Sinyallerin eksikliğinin ise otoimmun aktiviteye bağlı astım, allerji ve diyabetten kısmen sorumlu olduğu düşünülüyor.



Antibiyotik ve Yenidoğan Mikrobiyomu

- Antepartum antibiyotik kullanan annelerden doğan bebeklerde barsak mikrobiyom çeşitliliği anlamlı olarak azalıyor.
- Actinobacteria, Bacteroidetes, Bifidobacterium ve Lactobacillus'lar azalırken; Proteobacteria, Firmicutes ve Enterococcus'lar artıyor.
- Benzer etkiler infantlarda da görülüyor.
- Preterm infantlarda mikrobiyom çeşitliliği azalması ile nekrotizan enterokolit riskindeki artış ilişkili bulunmuş.

Allergology International 66 (2017) 515–522

Contents lists available at ScienceDirect

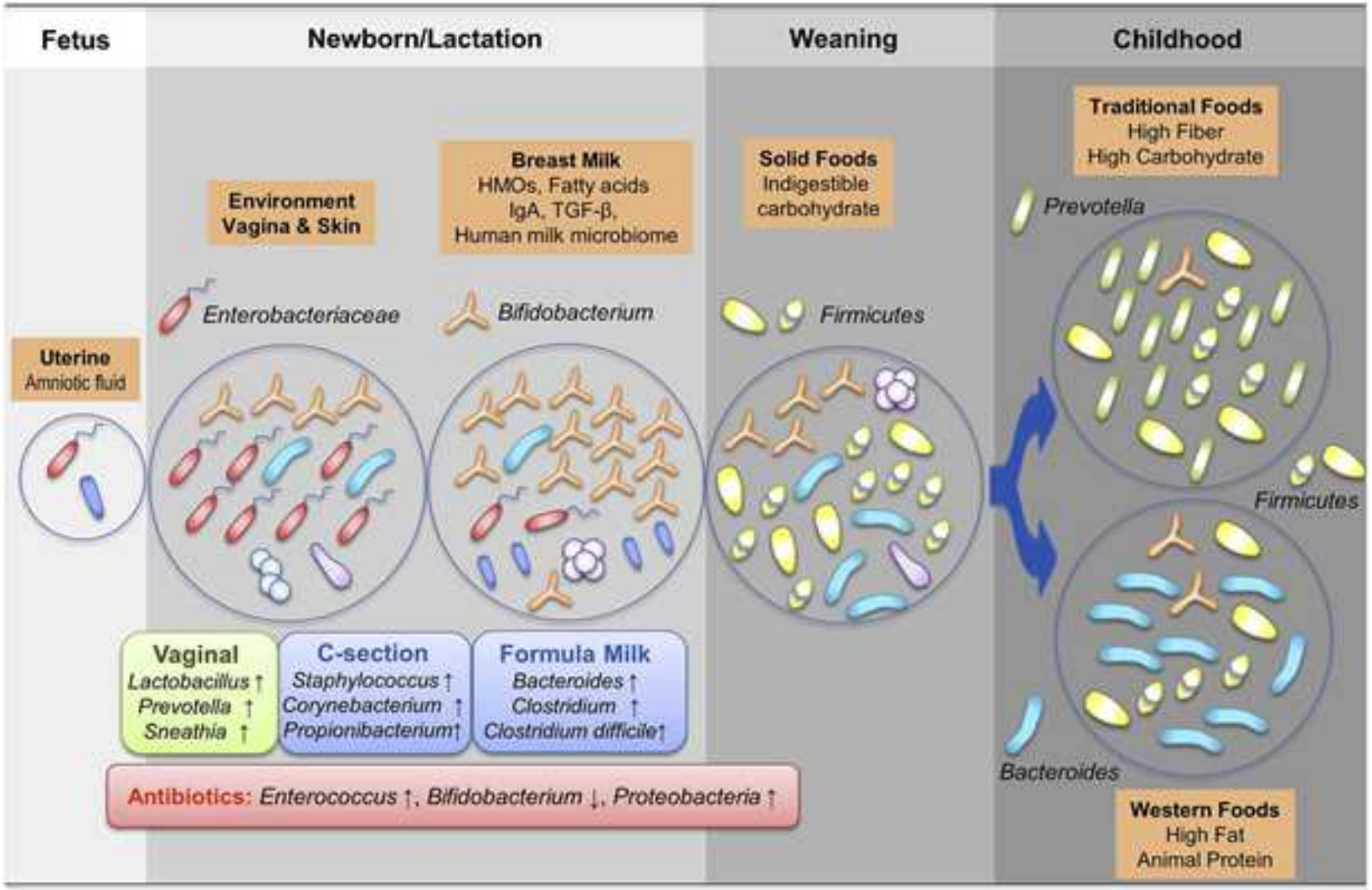
Allergology International

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ali

Invited review article

Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life

Masaru Tanaka, Jiro Nakayama*



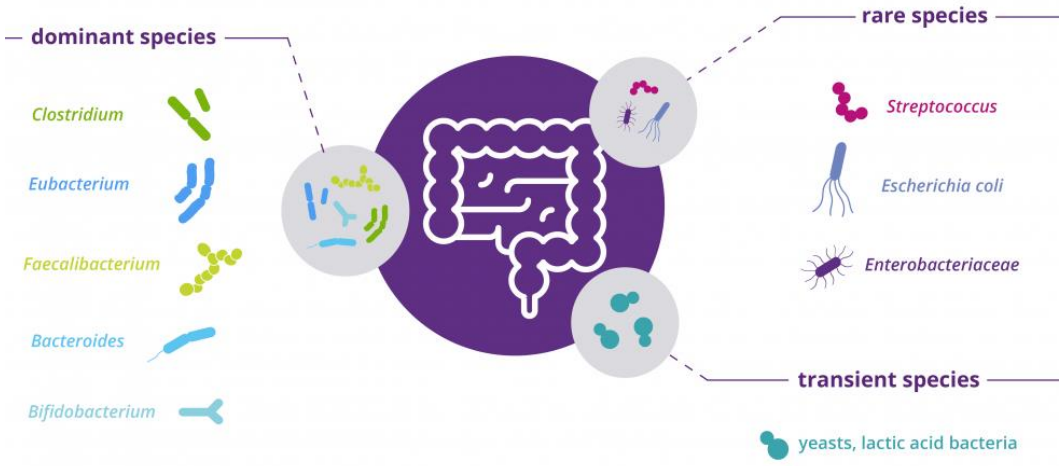
Mikrobiyom değişiyor…

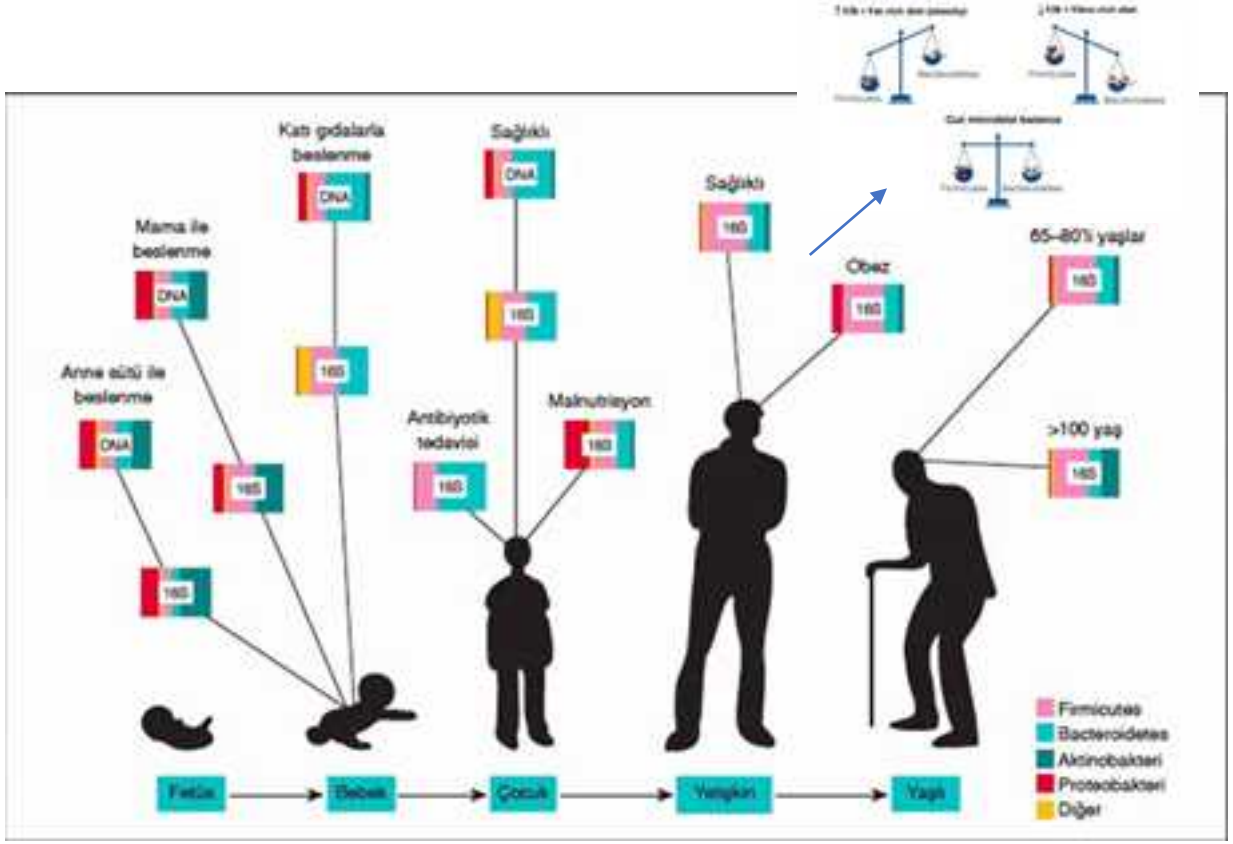
- Anne sütünden sonra farklı yiyecekler tüketilmeye başlamasıyla 2-3 yaş civarında mikrobiyom erişkin forma dönüşüyor.
- Erişkin mikrobiyom değişikliklerini sağlayan en önemli faktörler;
  - Diyet,
  - İlaçlar (özellikle antibiyotikler),
  - Stres (vagus siniri boyunca iletilen stres hormonları),
  - Egzersiz alışkanlıkları,
  - Yaş ve genetik.
- Sağlıklı dönüşüm ile immün, metabolik ve barsak fonksiyonları gelişimi - SAĞLIK
- Son yıllarda disbiyozis ve çeşitli sağlık durumları ile ilgili bağlantılar saptandı - HASTALIK
- **«Diyet ile değişime müsait olduğundan, sağlığı ve hastalığı kontrol edebilme olasılığı sunuyor»**

Bağırsak Mikrobiyatası

- Bakteri, virüs, arkeler, mantarlar…
- Firmicutes
  - Clostridium
  - Enterococcus
  - Lactobacillus
  - Ruminococcus
- Bacteroidetes
  - Bacteroides
  - Prevotella
- Actinobacteria
  - Bifidobacterium
- Proteobacteria
  - Helicobacter
  - Escherichia

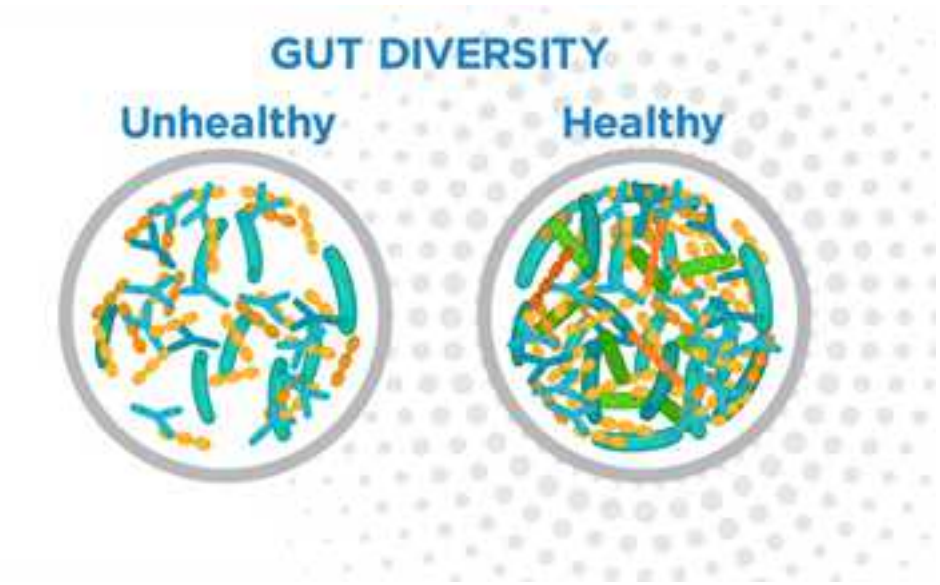
%90





Mikrobiyal Çeşitlilik

- Mikrobiyomda farklı türlerin bulunması: ZENGİNLİK
- Mikrobiyomdaki türlerin ne kadar eşit dağıldığı: EŞİTLİK
- Bolca farklı türleri içeren, homojen dağılım gösteren, dominant tür içermeyen mikrobiyom – YÜKSEK ÇEŞİTLİLİK

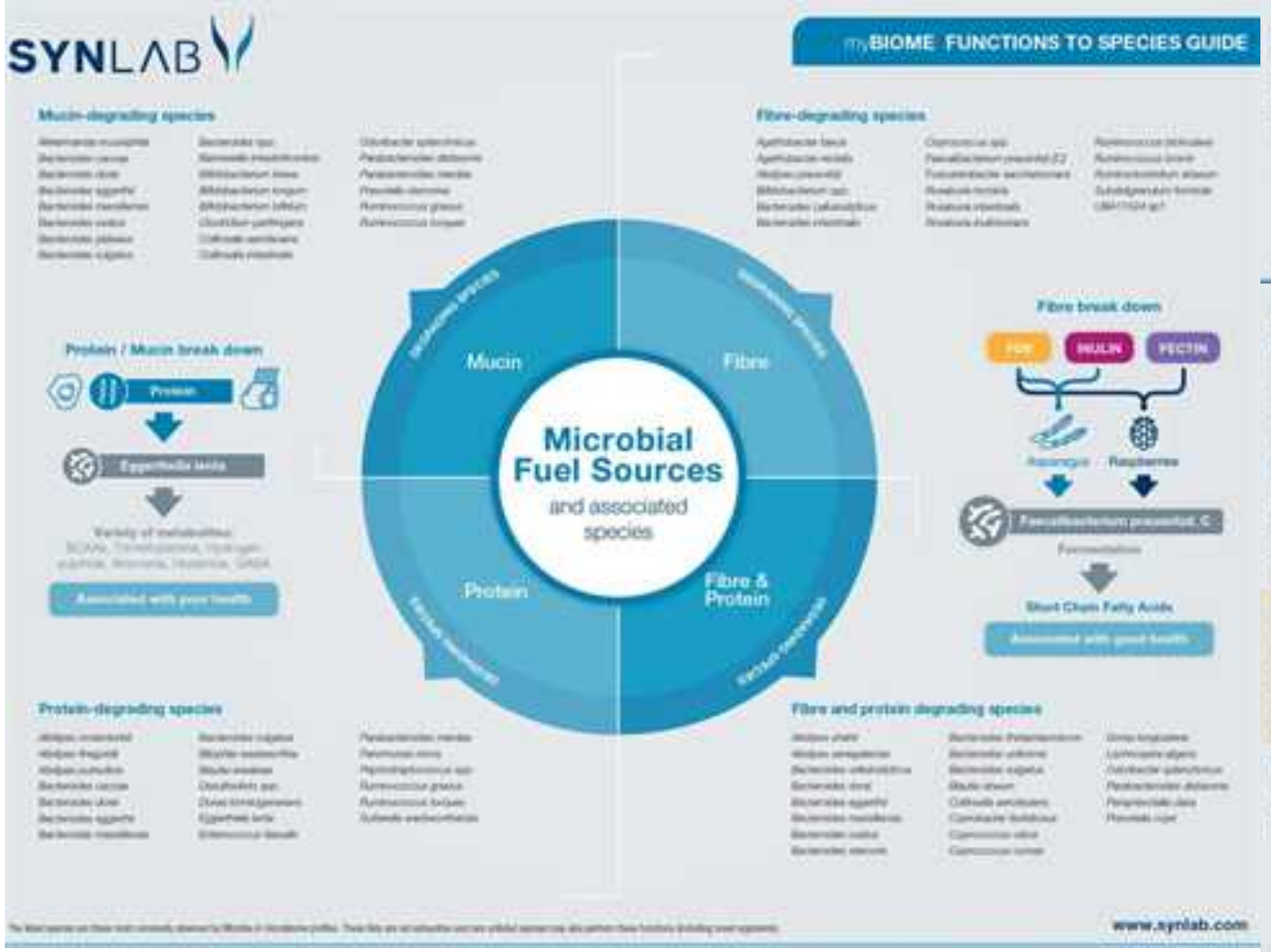


Tür ve alt tür düzeyinde analizler ile mikrobiyatanın tercih ettiği enerji kaynakları, ürettikleri yararlı ve zararlı metabolitler ile konağın sağlığına katkısını yorumlayabiliriz.

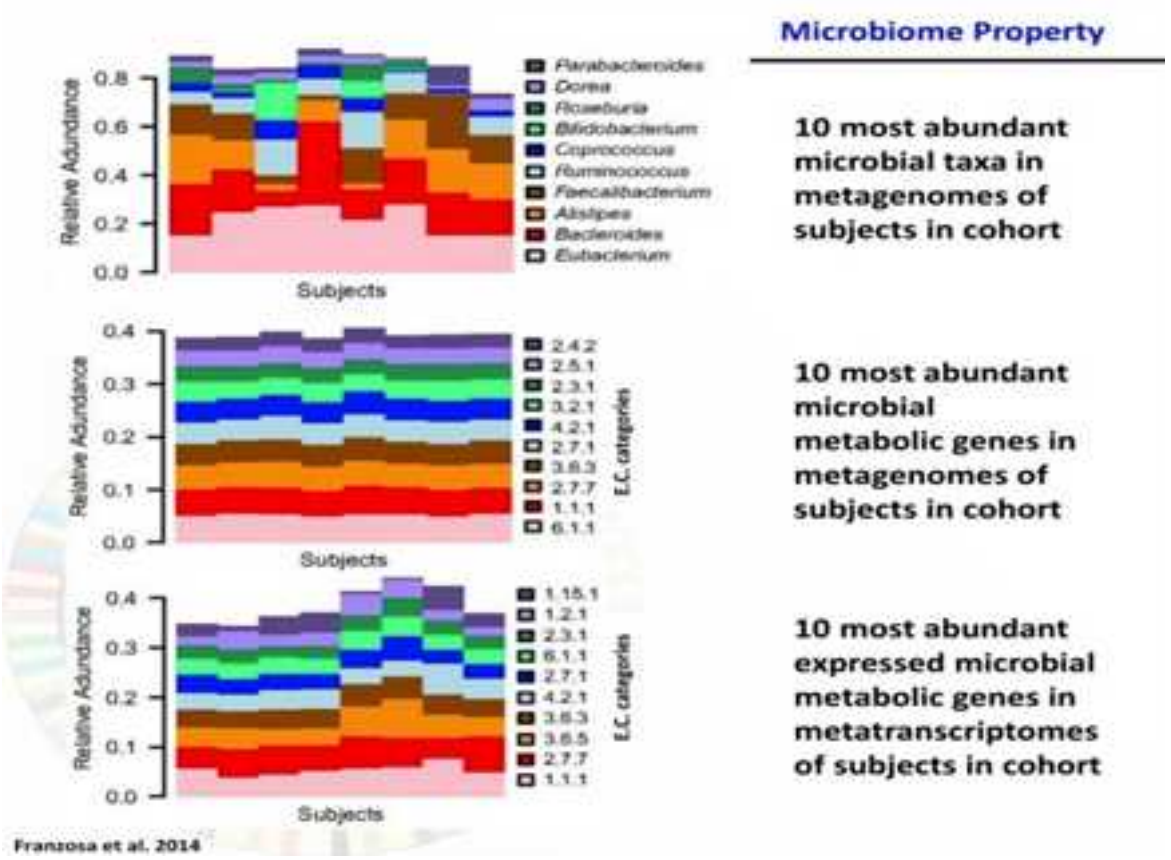
Akkermansia muciniphila
Faecalibacterium prausnitzii

Eggerthella lenta

Prevotella copri

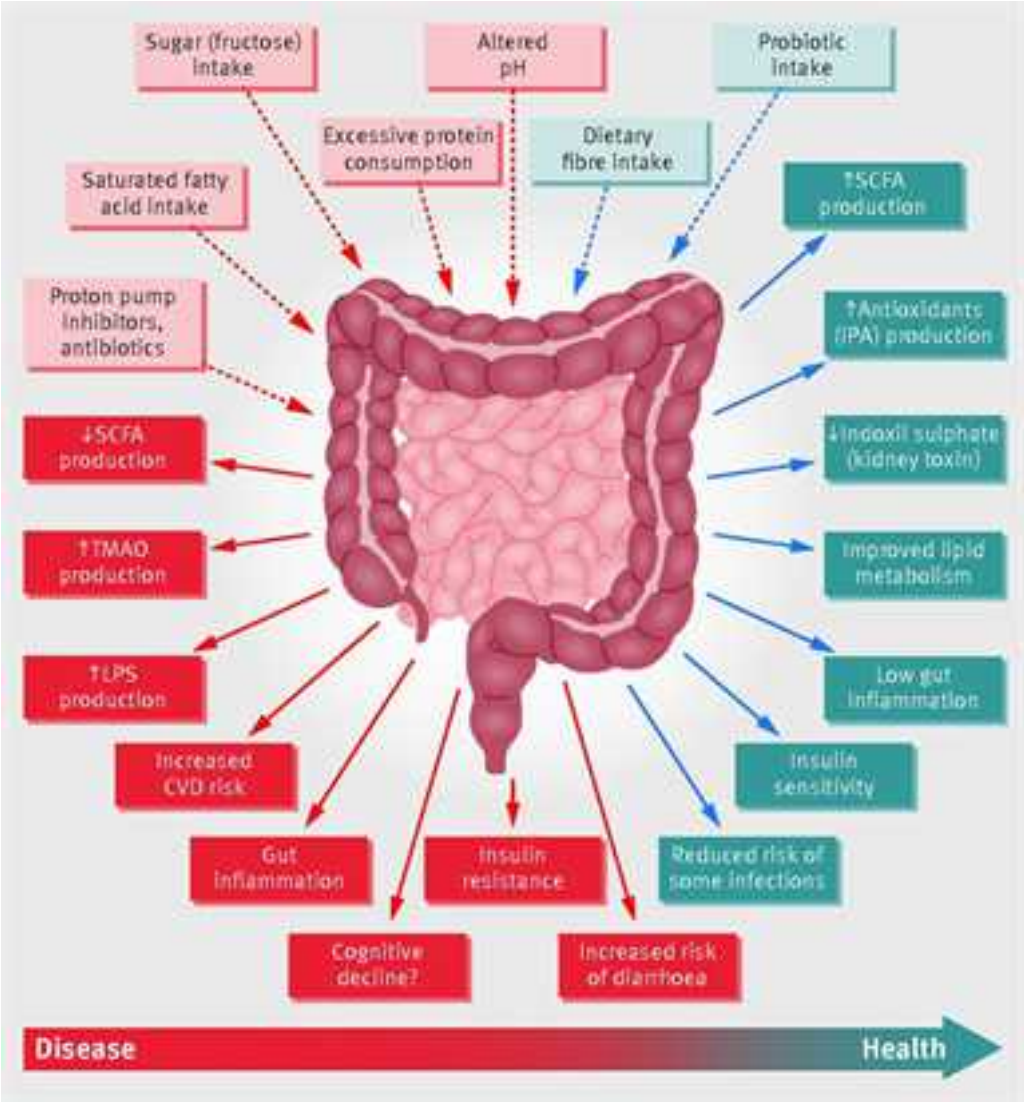


- Konak fenotipine göre «temel» bir mikrobiyal kompozisyon olmayabilir.
- Mikrobiyal kompozisyon çok değişken ve bakterinin çokluğu her zaman fonksiyonel önemi yansıtmayabilir.
- Fakat konak fenotipine göre «temel» bir metagenomik ve/veya fonksiyonel profil görebiliriz.



Bağırsak Mikrobiyomunun Rolü

- Ana fonksiyonları;
  - Patojen invazyonundan korumak
  - Metabolizma
    - Sindirim, abzorpsiyon
    - B12, K ve Folat gibi vitaminlerin sentezi
    - SCFa ve Serotonin gibi moleküllerin sentezi
  - Bağışıklık sisteminin eğitilmesi ve regülasyonu

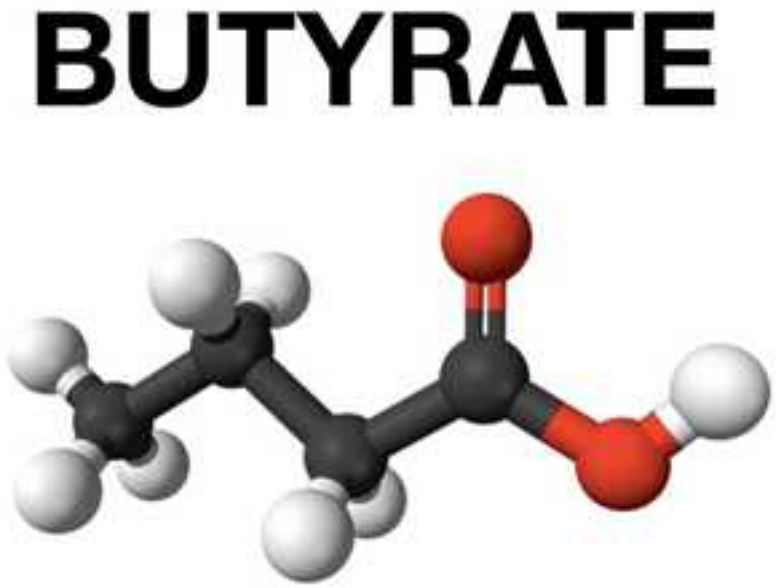


Savunma

- Mikrobiyota tüm alanı kolonize ederek ve substratlar için rekabete girerek potansiyel patojenik bakterilere yerleşme imkanı vermez.
- Antimikrobiyal bakteriyosinler salgılar veya sekonder safra asit üretimini uyarır.
- Üretilen SCFa’lar epigenetik regülatuvar mekanizmaları uyararak tolerojenik immun yanıtı destekler.
- Cathellicidin-LL37 gibi antimikrobiyal peptidler sentezleyerek immunmodülatuvar, antimikrobiyal ve yara iyileştirici etkiler sağlar.

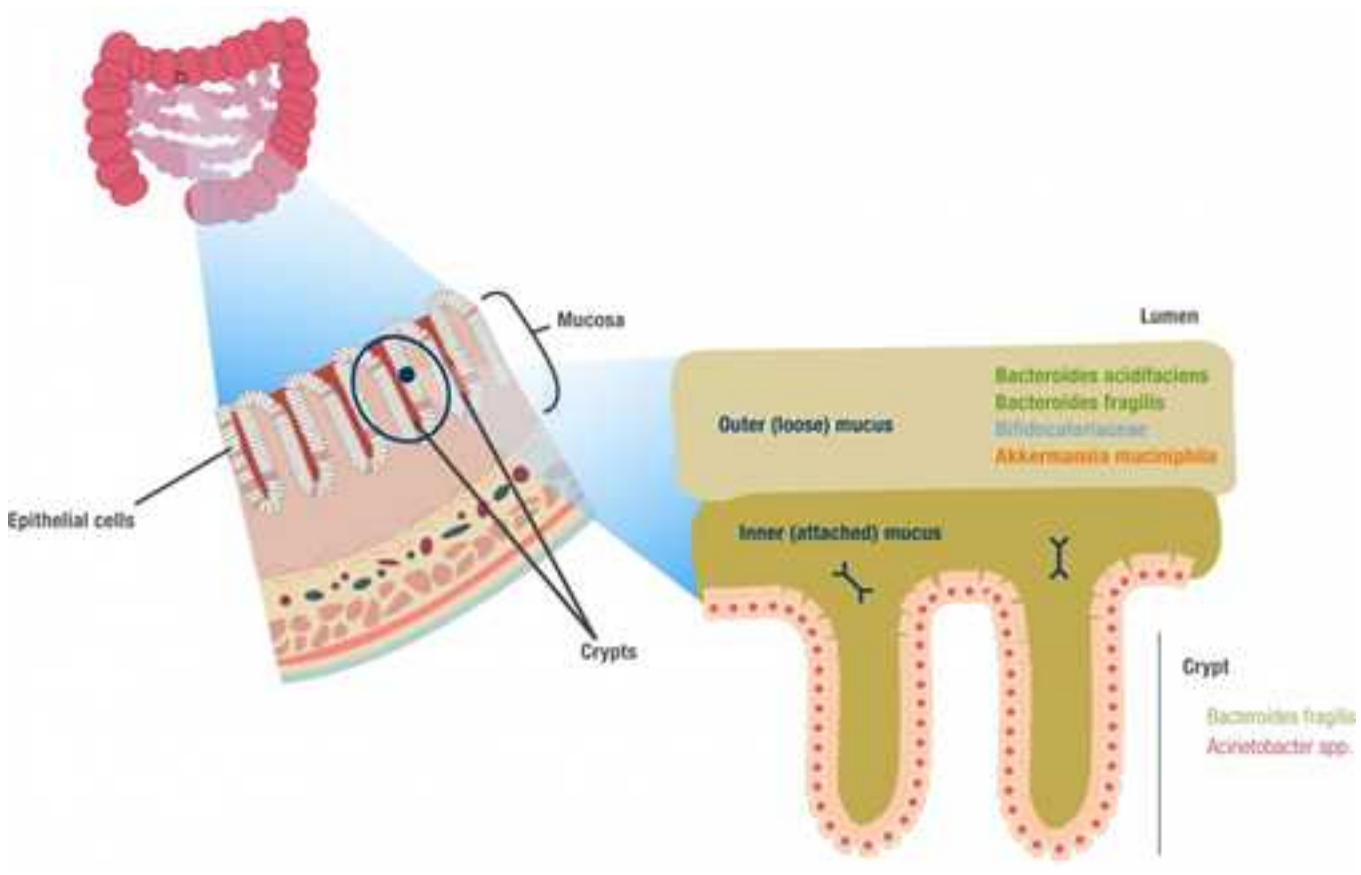
Metabolizma

- **Mikrobiyal metabolomiks**; kimyasal mikrobiyal ürünleri inceleyen bilim alanı
- Sindirilemeyen lifli gıdaların fermentasyonu sonucunda kısa zincirli yağ asitleri (SCFa) üretiliyor;
    - Asetat (en bol miktarda, kolesterol metabolizması, lipogenez, bütirat üretenler için besin)
    - Propiyonat (glukoz homeostaz, tokluk hissi)
    - Bütirat (en önemli)
- Bütirat kolonositler için en önemli enerji kaynağı (%90) ve böylece mukoza bütünlüğünü (epitel defans bariyeri) sağlıyor.
- Fare deneylerinde otofaja uğrayan kolonositlerin butirat artışıyla kurtarılabildiği gösterilmiş.
- Histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü olarak anti-kanserojen etki ve spesifik immun hücreleri suprese ederek anti-enflamatuvar etki
- Villusların gelişmesini sağlayarak müsin üretimini artırıyor, kolon motilitesini regüle ediyor.



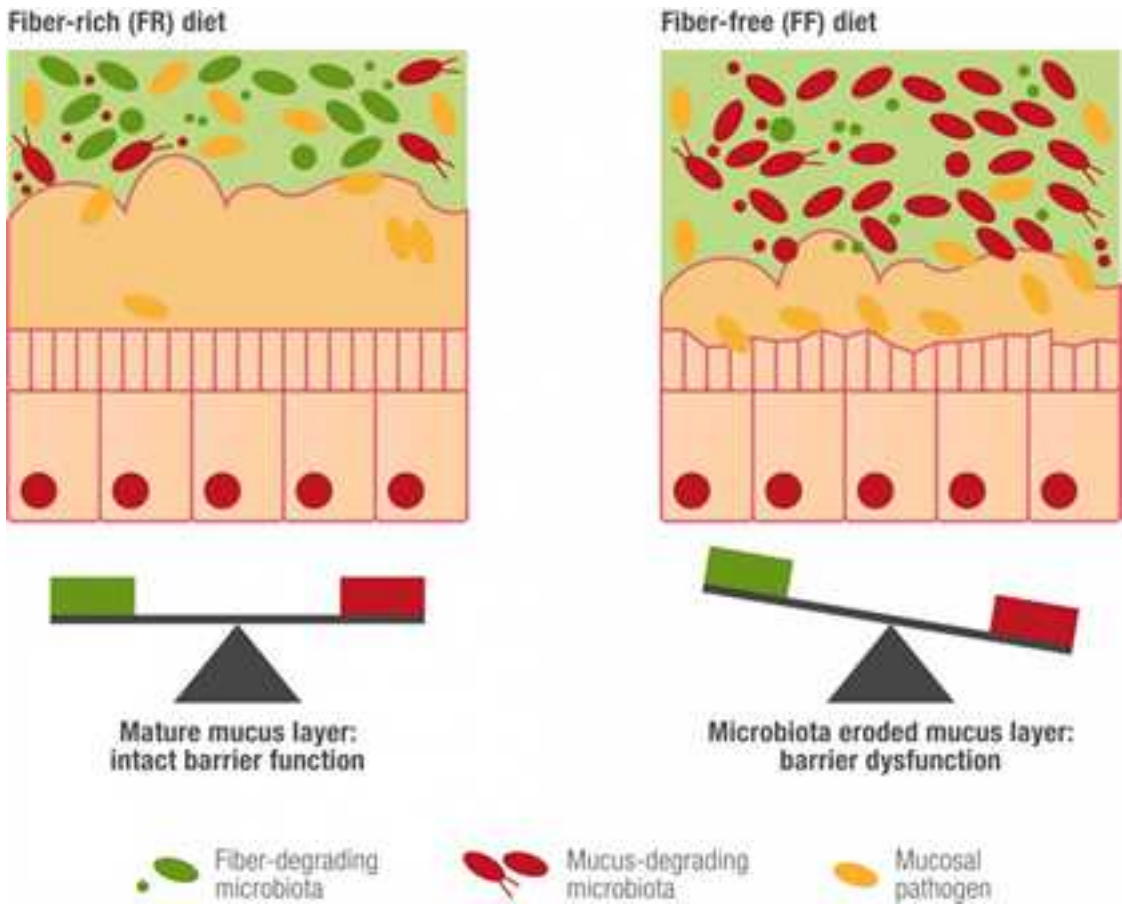
Kalın Barsak Yapısı

- Kolonun yüzeyi kriptler (sıkı katlantılar) içeren epitelyal hücrelerle kaplıdır.
- Epitel hücrelerin üzerinde 2 tabaka mukus bulunur
  - Yoğun iç mukus
  - Gevşek dış mukus
- Bu mukus tabakalar epitel hücrelerce üretilir ve primer olarak şeker yan zincirler (glikan) eklenmiş bir protein olan **müsin**'den oluşur.
- Çoğu bakteri lümen ve gevşek mukozada yaşar.



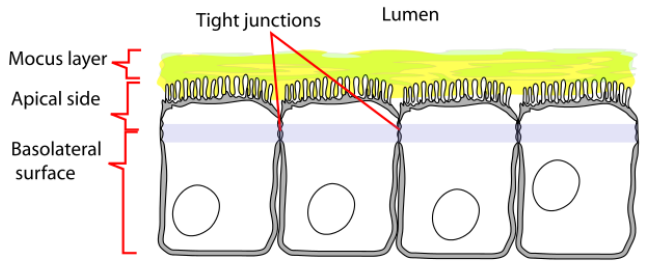
Mukus tabaka

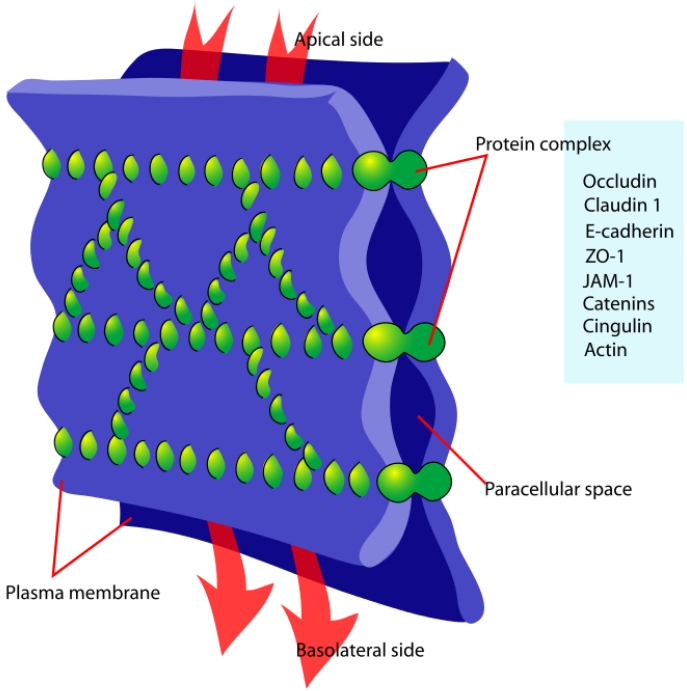
- Sağlam mukus tabakası patojenlerin epitelyal hücrelere ulaşmasını ve enfeksiyonu engellemek için önemlidir.
- Bazı mikroorganizmalar iç mukus tabakaya ulaşıp kriptleri kolonize edebilir.
- Ayrıca hücre tabakasına erişip enflamasyona sebep olabilirler.
- Lifli besinler yeterince alınmazsa bazı bakteriler mukustaki glikanları kullanarak sağlıklı tabakayı bozabilir.
- Mukus bütünlüğünün değişmesi enflamatuvar barsak hastalıkları gibi sağlık problemleri ile ilişkilendirilmiştir.



Geçirgen Bağırsak Sendromu

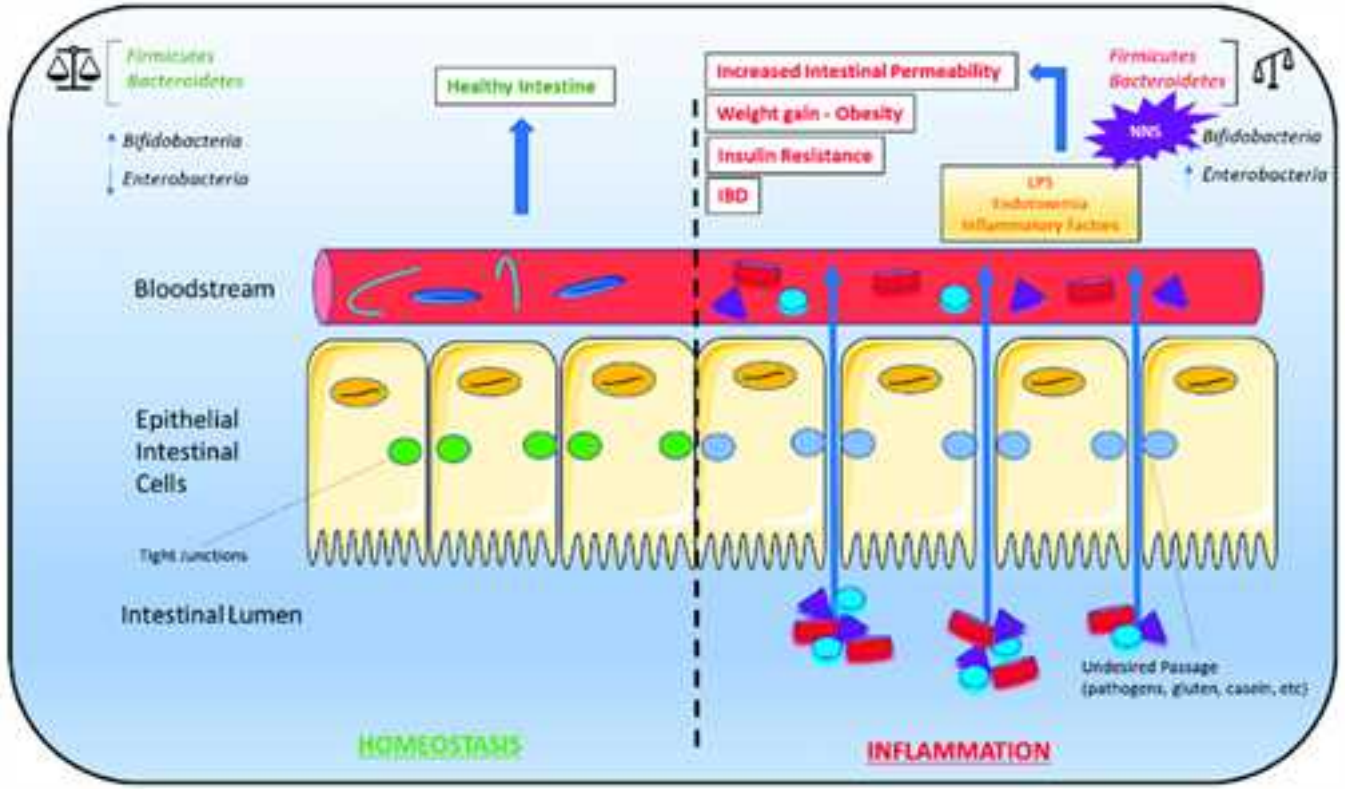
- Bağırsak duvarı yararlı besinleri geçirmeli; toksinleri, bazı gıda bileşiklerini, patojenleri dolaşımdan uzak tutmalı.
- İntestinal permeabilite:
  - Mukus membran ve hücrelerden oluşan fiziksel katman
  - Mukozal immunite
- İntestinal permeabilitenin kapı gardiyanları: sıkı bağlantı proteinleri
- Yemek sonrası genişler, hafif enflamasyon – postprandial endotoksemi (4 saat)





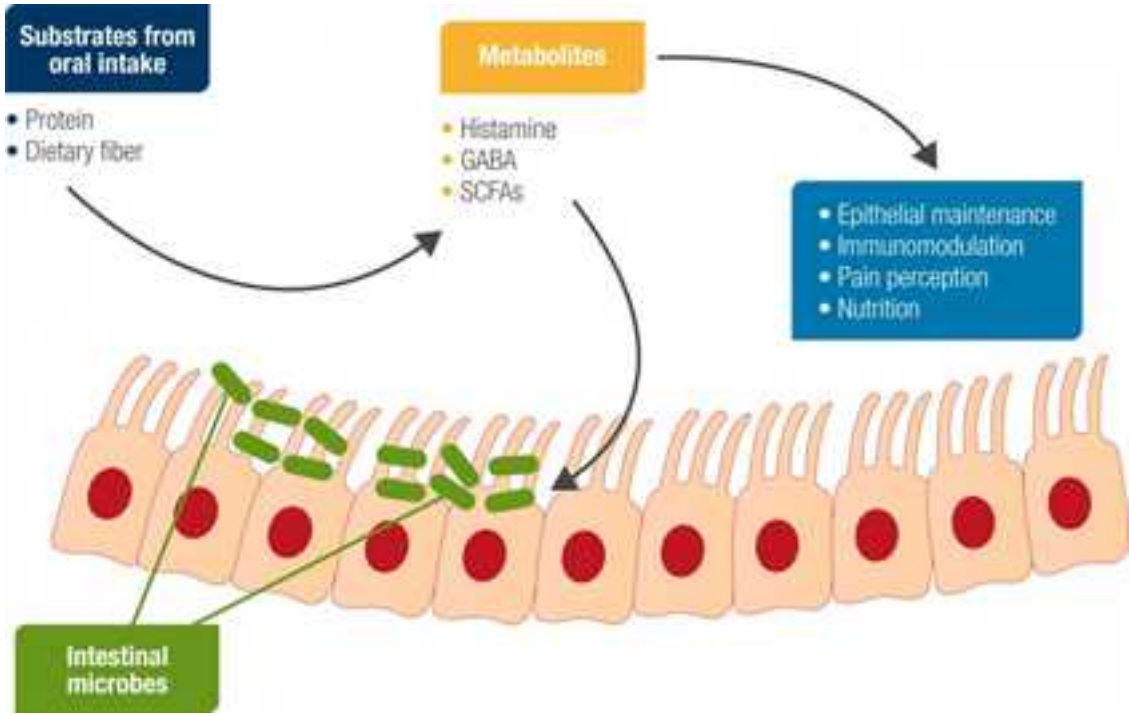
Kronik Pro-inflamasyon

- Disbiyozis, sık yemek/atıştırmak gibi sebeplerle geçirgenlik artıyor.
- Patojenler, LPS, gluten, kazein gibi maddelerin geçişi endotoksemiye sebep olarak kronik düşük seviyede inflamasyona sebep oluyor.
- İnsülin direnci, metabolik sendrom, IBH, IBS



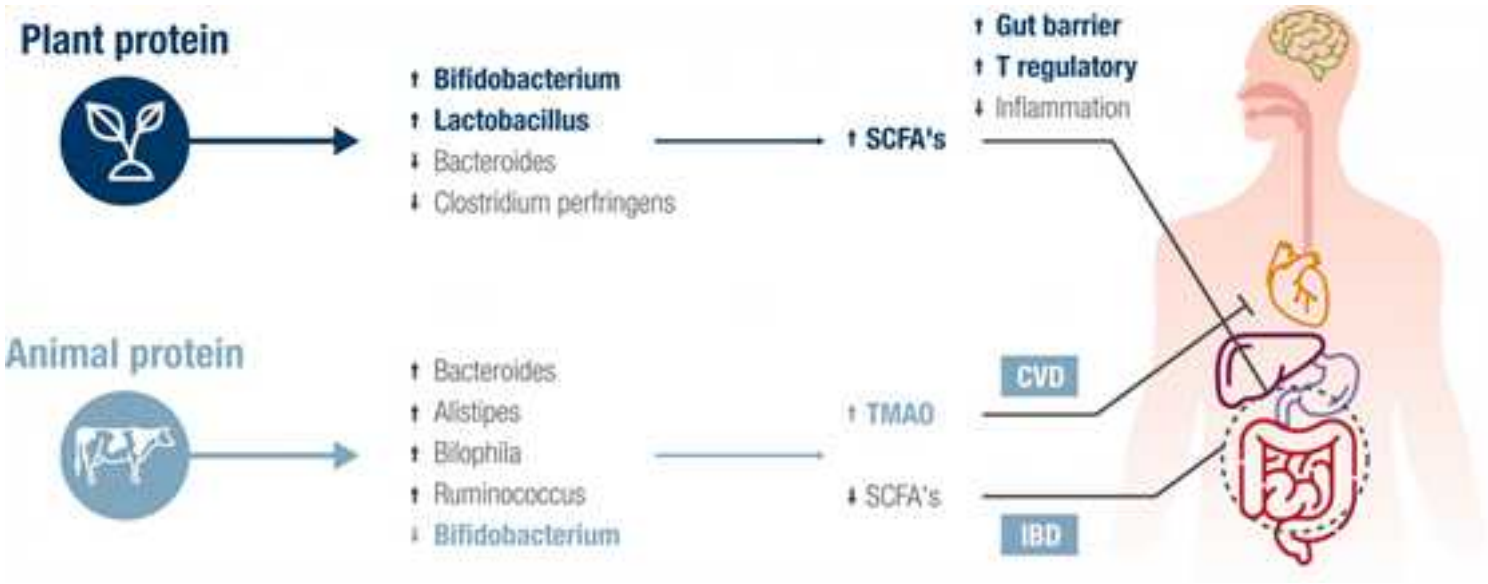
Metabolitler

- Bakteriler lif ve proteini parçalarken metabolitler denen küçük moleküller açığa çıkar.
- Metabolitler;
  - Gamma amino butirat (GABA); SSS gevşetip regüle ediyor, modu yükseltiyor.
  - Histamin; allerji
  - Trimetilamin; ateroskleroz, inflamasyon, obezite
- Çözünebildikleri için emilerek dolaşıma katılıp tüm vücutta farklı etkilere yol açabilirler.
- Nörotransmitterler vagus boyunca ilerleyip beyin aksını etkileyebilir (duygu durum) .



Protein Metabolitleri

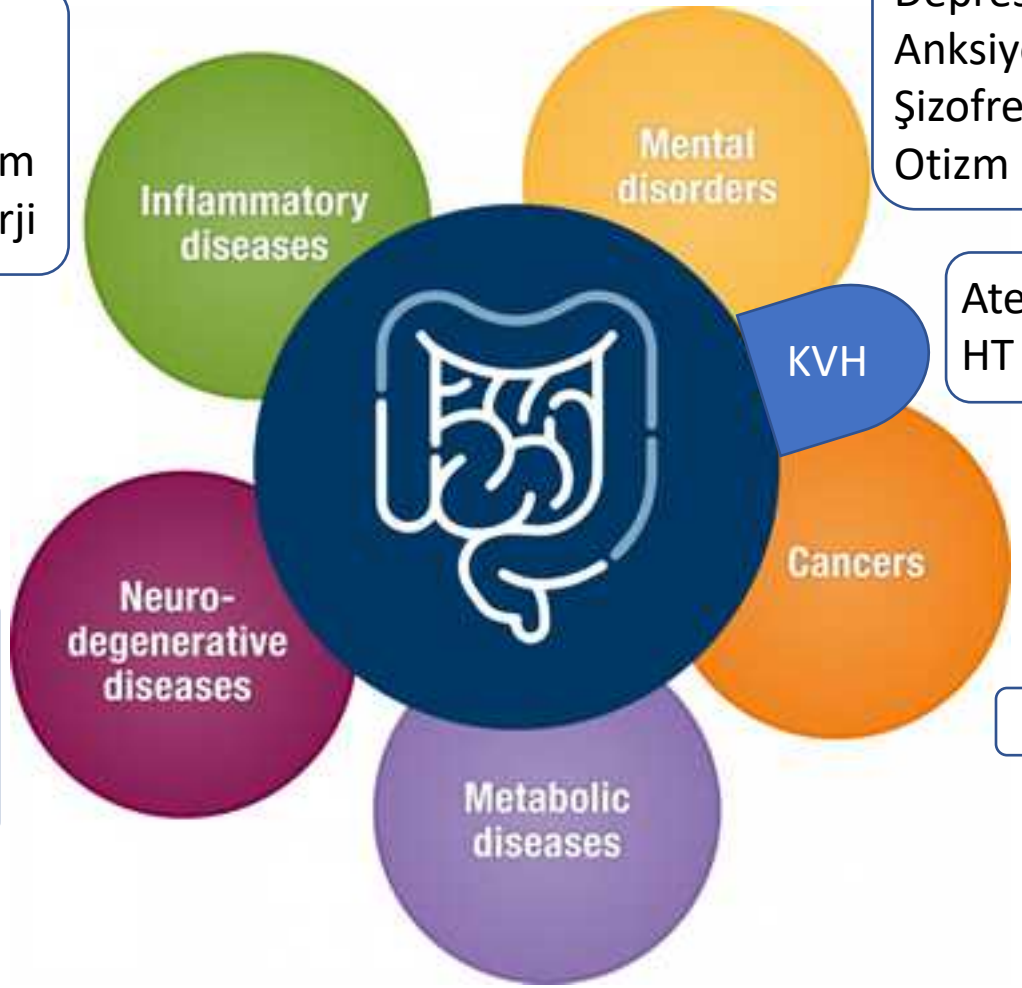
- İnce barsağın absorbe edemediği fazla protein kolona ulaşıp bakterilerce kullanılır.
- Bitki proteinleri genellikle lif içerirken (yararlı) hayvansal proteinler genelde yağ ile birlikte (enflamatuvar).
- Protein yokluğunda mukus tabakanın protein ve glikanlarını kullanabilir (mukus-indirgeyiciler).
- Bazıları müsini primer enerji kaynağı olarak kullanırken, bazıları lif yokluğunda müsini kullanır – tür düzeyinde ayrım önemli!



Mikrobiyom ile ilişkilendirilen hastalıklar

IBD
IBS
Astım
Allerji

Depresyon
Anksiyete
Şizofren
Otizm



Ateroskleroz
HT

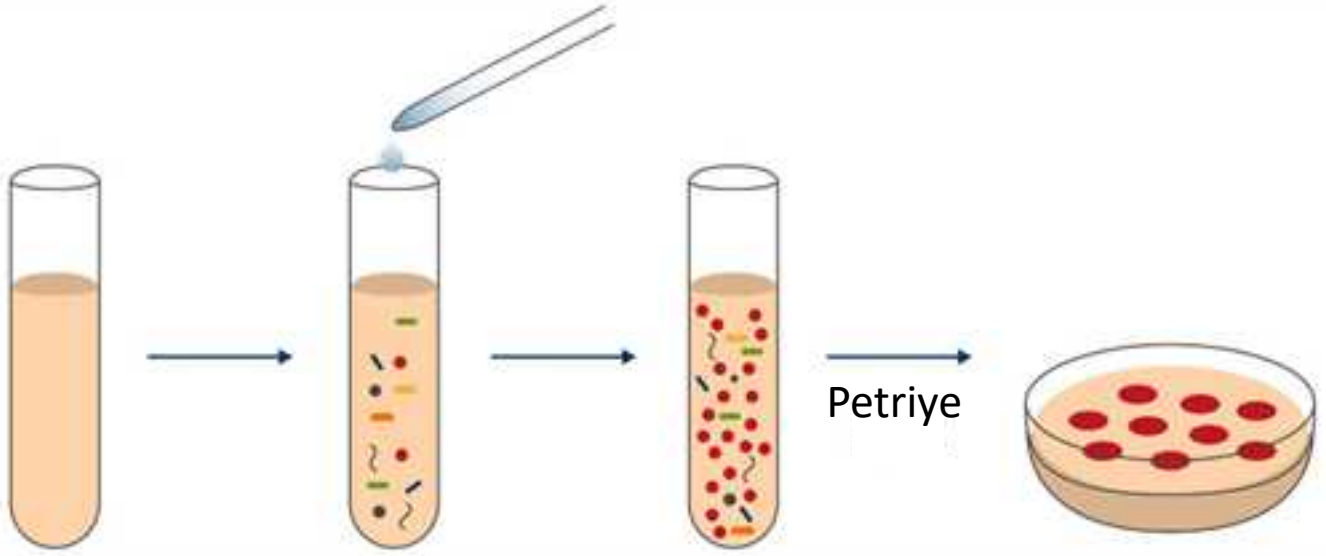
Parkinson
MS
ALS
Alzheimer

Kolon kanseri

T2 Diyabet
Obezite

Mikrobiyata ve Mikrobiyom Çalışma Metotları

Konvansiyonel kültür



Seçili besin maddeleri içeren besiyeri

Geniş çeşitlilikte organizma içeren örnek ilave edilir.

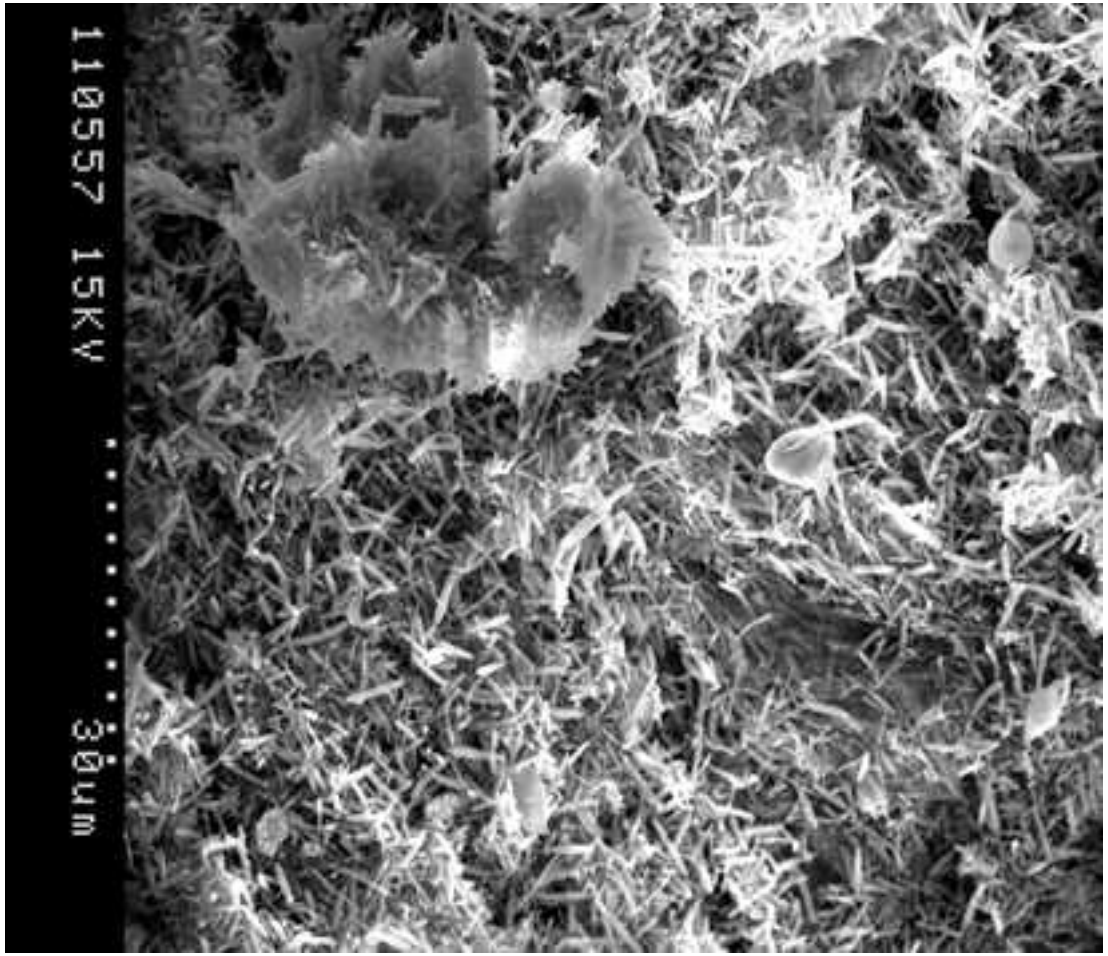
Belirli bakteriler ürerken çoğu üreyemez

Belirli organizmaların saf kolonileri elde edilir.

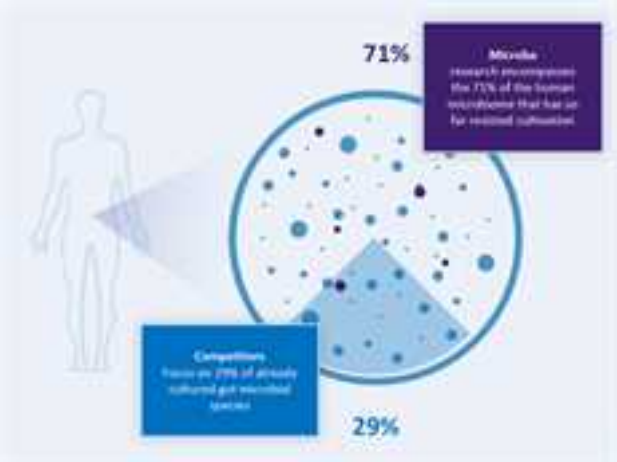
- Spesifik
- Bazı fonksiyonlar hakkında bilgi verebilir

- Varolan türlerin yalnızca %5-10'u kültürde ürüyor (zorunlu anaeroblar, fotosensitifler).

Elektron Mikroskopi ile Barsak Bakterileri

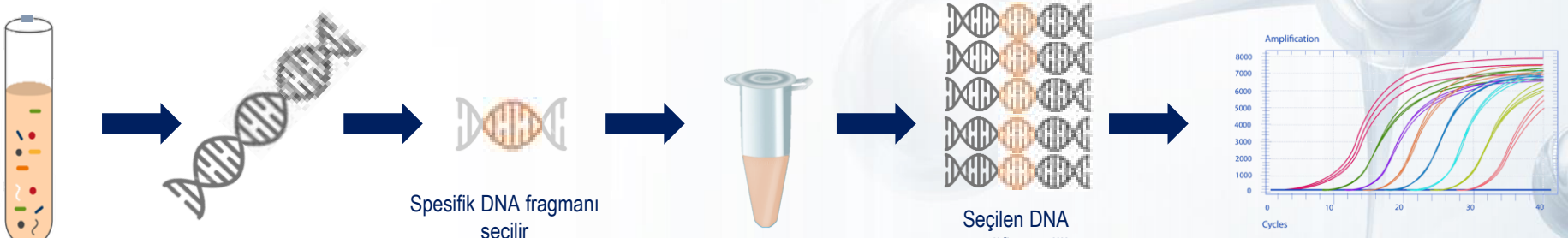


- Gelişen teknikler ve elektron mikroskobu bağırsak mikroorganizmalarının çok küçük bir oranını tespit ettiğimizi gösterdi.



EUROPE'S NUMBER ONE
MEDİCAL DİAGNOSTİCS PROVİDER

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)



DNA ekstraksiyonu

Spesifik DNA fragmanı seçilir

Spesifik primerler eklenir

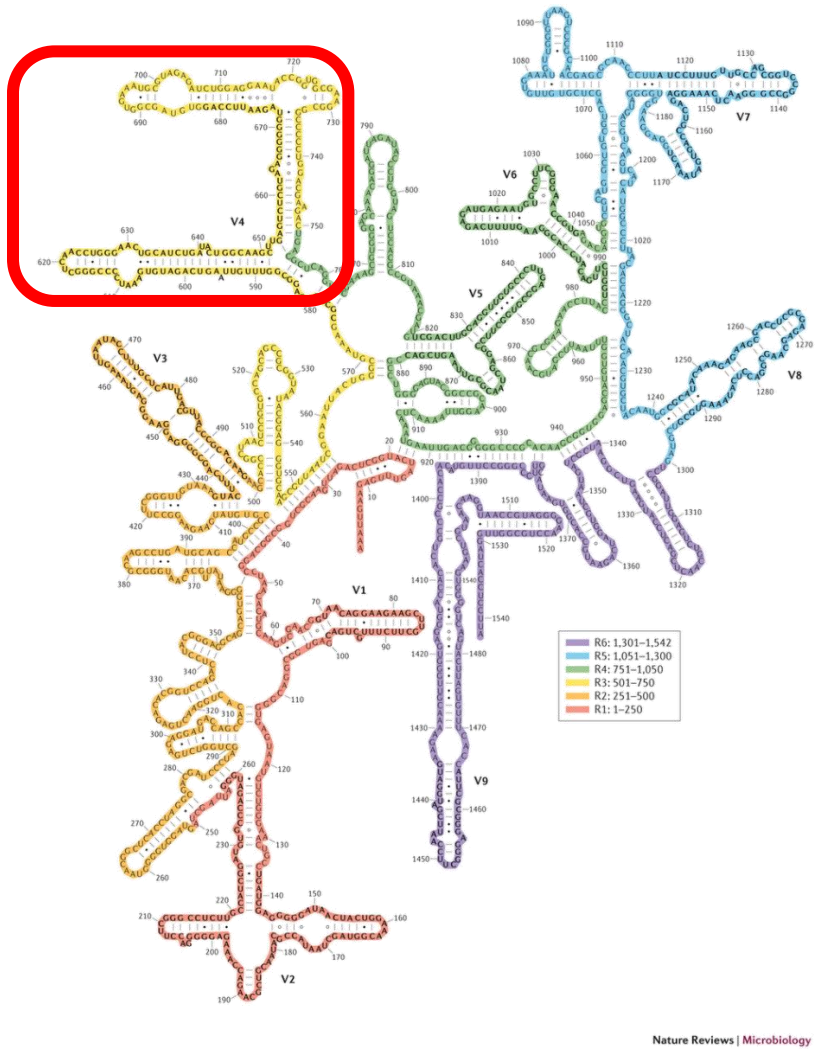
Seçilen DNA amplifiye edilir

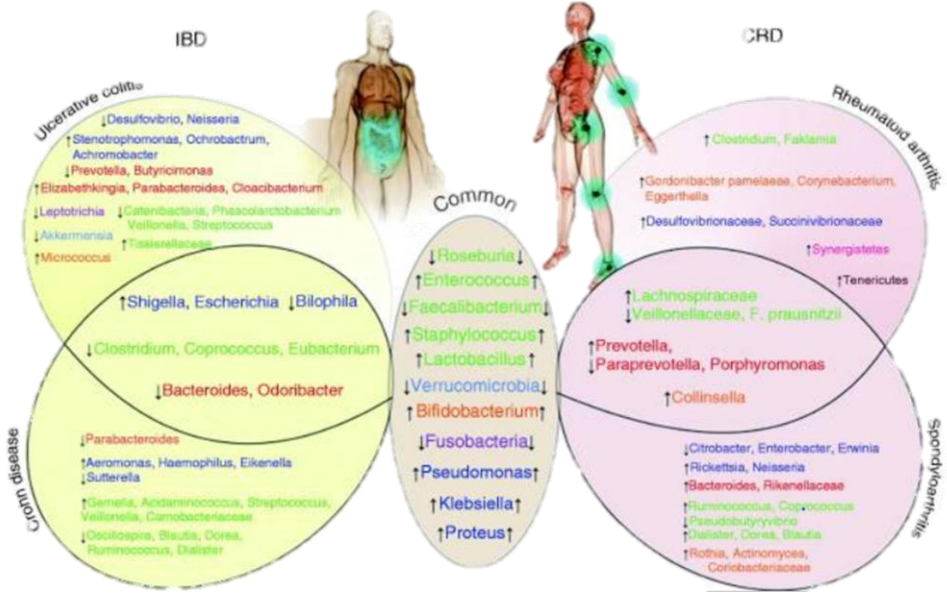
Amplifiye edilmiş mikroorganizmaların tanımlanması ve miktar tayini

- Yüksek hassasiyet, qPCR ile kantitasyon
- Yüksek çözünürlük, türlerin veya alt türlerin tespit edilmesini sağlar
- Patojenleri veya toksin genlerini saptamak için kullanılır.

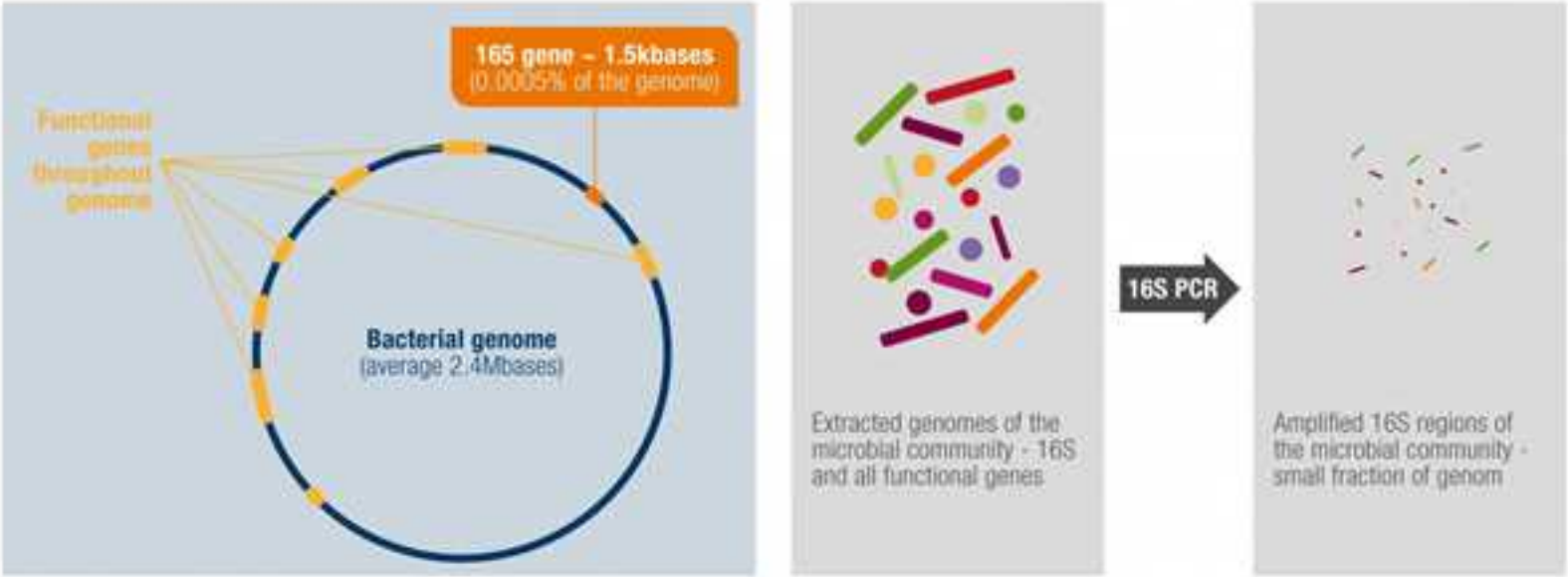
- Sınırlı kapsama alanı, yalnızca çoğaltacağımız organizmalar görülüyor
- Sadece tanınan dizilenmiş ajanları saptama olanağı

16S rRNA sekanslama





- İlk olarak 16S rRNA sekanslama ile mikrobiyataya genel bir bakış sağlanmıştır.
- 16S ribozomal RNA tüm bakteriler ve arkelerde bulunan ortak saklanmış genler
- 16S geni yaklaşık 1500 bazdan oluşur (genom 2.4 milyon).
- DNA primerleri ile 16S genin bir bölgesi (örn: V4; 150-200 baz) hedeflenir ve PCR ile çoğaltılarak sekanslanır (yaklaşık 30,000 okuma)



Gen. *Streptococcus*

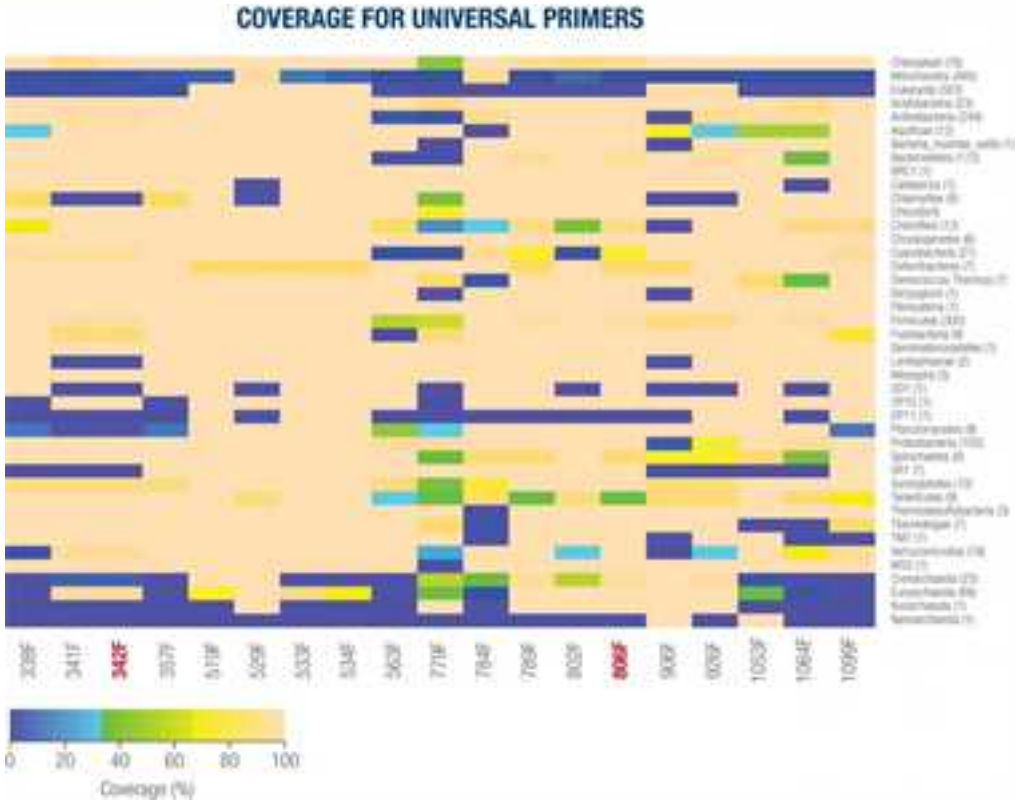
Streptococcus thermophilus

Streptococcus pneumoniae

Gen. *Escherichia*

Escherichia coli Nissle 1917

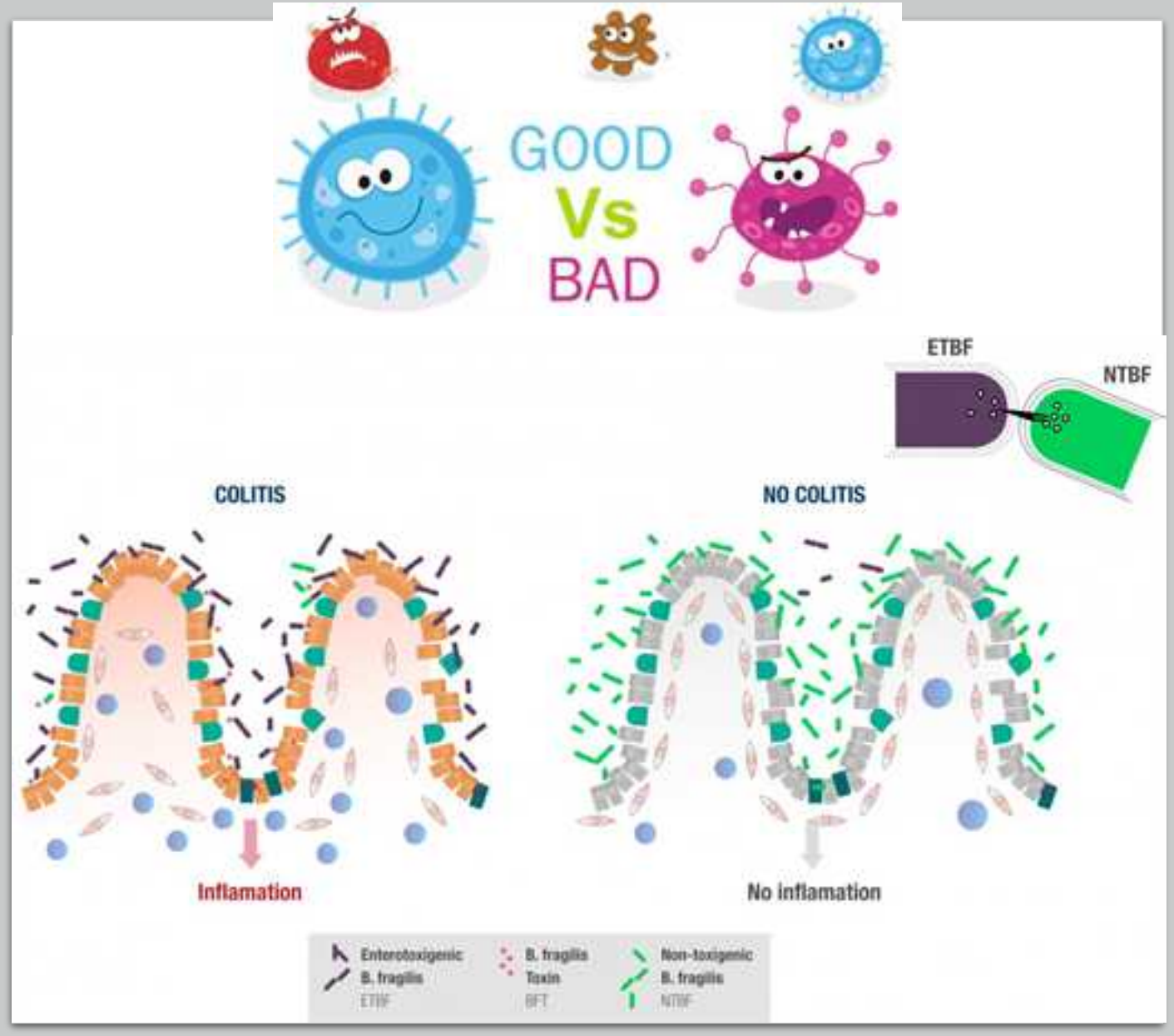
Escherichia flexnerii



- Belirli dar alan hedeflendiğinden çoğu zaman «cins düzeyinde identifikasyon».
- Farklı türler veya suşlar çok farklı işlevlere sahip olabilir
- Tüm organizmaları hedefleyebilecek tek bir primer yok!
- Bazı türlerin primer bağlanma alanlarında değişiklikler olduğunda saptanamaz – Görünmez türler
- Farklı türlerin benzer 16S bölgeleri bulunabildiğinden bunları ayırt edemez (kısıtlı ayrım gücü).
- 16S bölgesi dışındaki metabolik genler saptanamaz, mikrobiyomun konak ile etkileşimi hakkında bilgi sağlamaz.

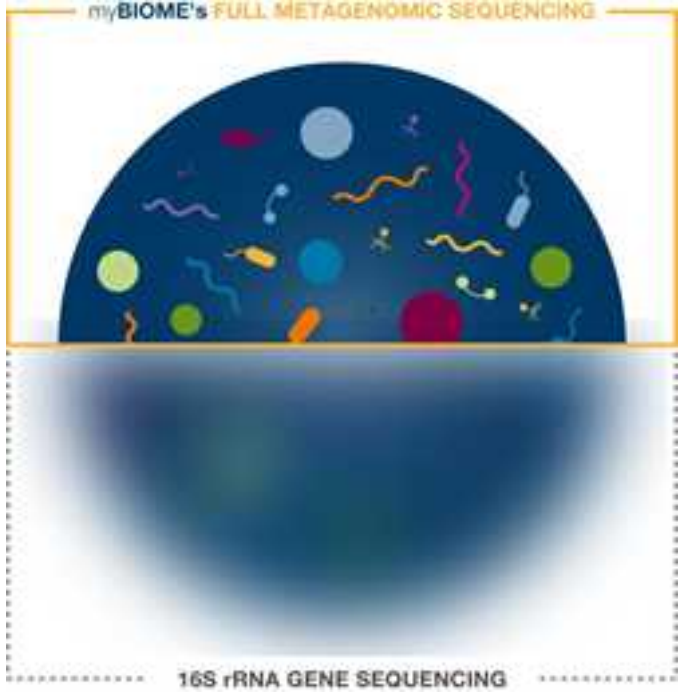
Bir örnek!

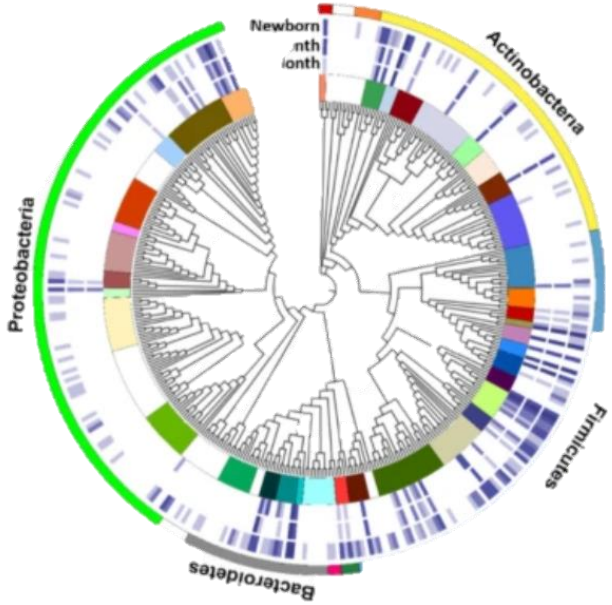
- *B.uniformis*: SCFa ve antienflamatuvar bileşikler ürettiğinden yararlı.
- *B.vulgatus*: dallanmış zincirli yağ asitleri üretir, diyabet ve insülin direnci ile ilişkilidir.
- *B.fragilis;*
  - SCFa ve inflamasyonu azaltan polisakkarid A üretir.
  - Bazı suşları toksin üreterek enflamasyona sebep olur ve kolon kanserini tetikleyebilir.



Gerçek Metagenomiks

- 16S sekanslamanın limitasyonlarını aşmak için geliştirildi!
- Tüm genomun çoklu bölgeleri randomize sekanslanıyor – shotgun
- Mikrobiyal komunitenin tüm DNA'sı ekstrakte edilir, küçük parçalara fragmente edilir ve sekanslanır (yaklaşık 7M okuma) .
- PCR amplifikasyonu olmadığından primer biası yaşanmaz.
- Bakteriler dışında arkeler, mantar ve protistalar saptanabilir.
- Yeni türler tanımlanabilir.
- Metabolik genleri de içeren tüm genom sekanslandığından fonksiyonel kapasite bilgisini de sağlar.
- Yüksek rezolüsyon sağladığından tür hatta suş düzeyinde identifikasyon yapabilir.





İnsan sağlığı için hayat değiştirici gelişmeler

İnsan sağlığına katkıda bulunacak, medikal açıdan önemli biyobelirteçler keşfetmek

Mikrobiyom bilimini daha fazla anlayarak pratik sağlık çözümleri üretmek üzere kullanmak

Mikrobiyom-bazlı terapötik yaklaşımlar

- Fekal mikrobiyata transplantasyonu
- Mikrobiyom kaynaklı mikrobiyal karışım
- Canlı biyoterapötik ürünler
- Bakteriyofajlar
- Farmakobiyotikler

Mikrobiyomu etkileyen yiyecekler

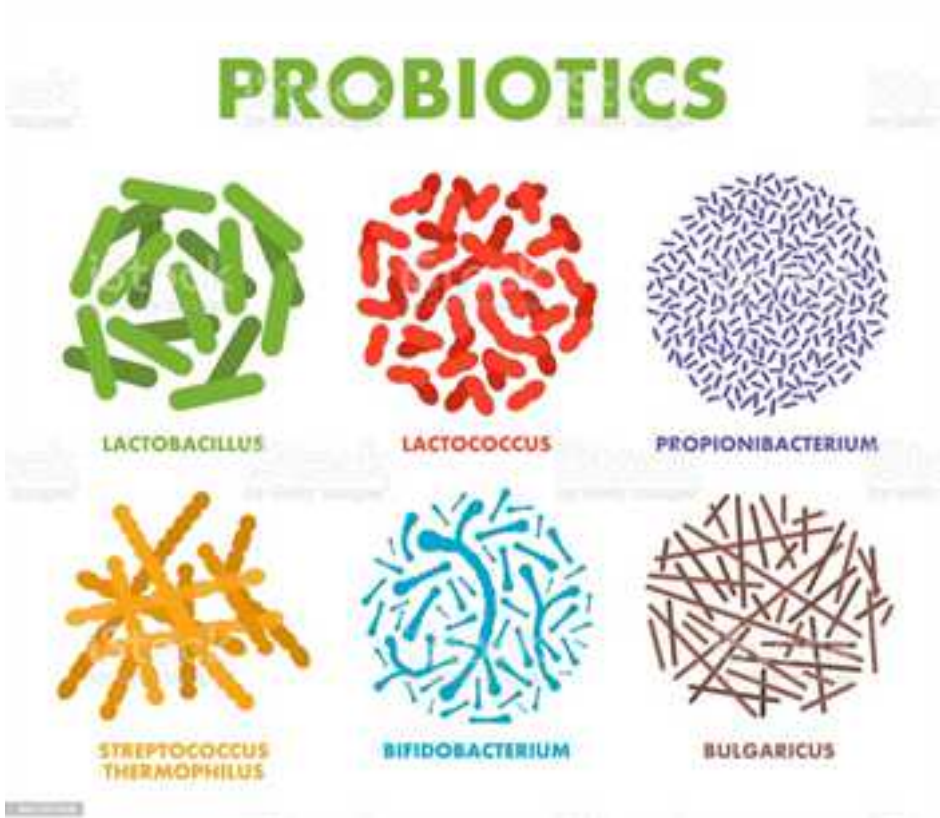
- Primer enerji kaynağı sindirimi zor bitkisel kaynaklı lifler.
- **Prebiyotikler:** Fruktooligosakkaridler (FOS), galaktooligosakkaridler (GOS), pektin, inülin ve dirençli nişastalar
  - Sebzeler, baklagiller, tam tahıllar.
  - Fermente mandıra ve sebze ürünleri (yoğurt, kefir, turşu vs)
  - Sağlıklı yağlar – zeytinyağı, kabuklu yemişler, avokado
  - Yüksek kaliteli protein (haftada 2-3)

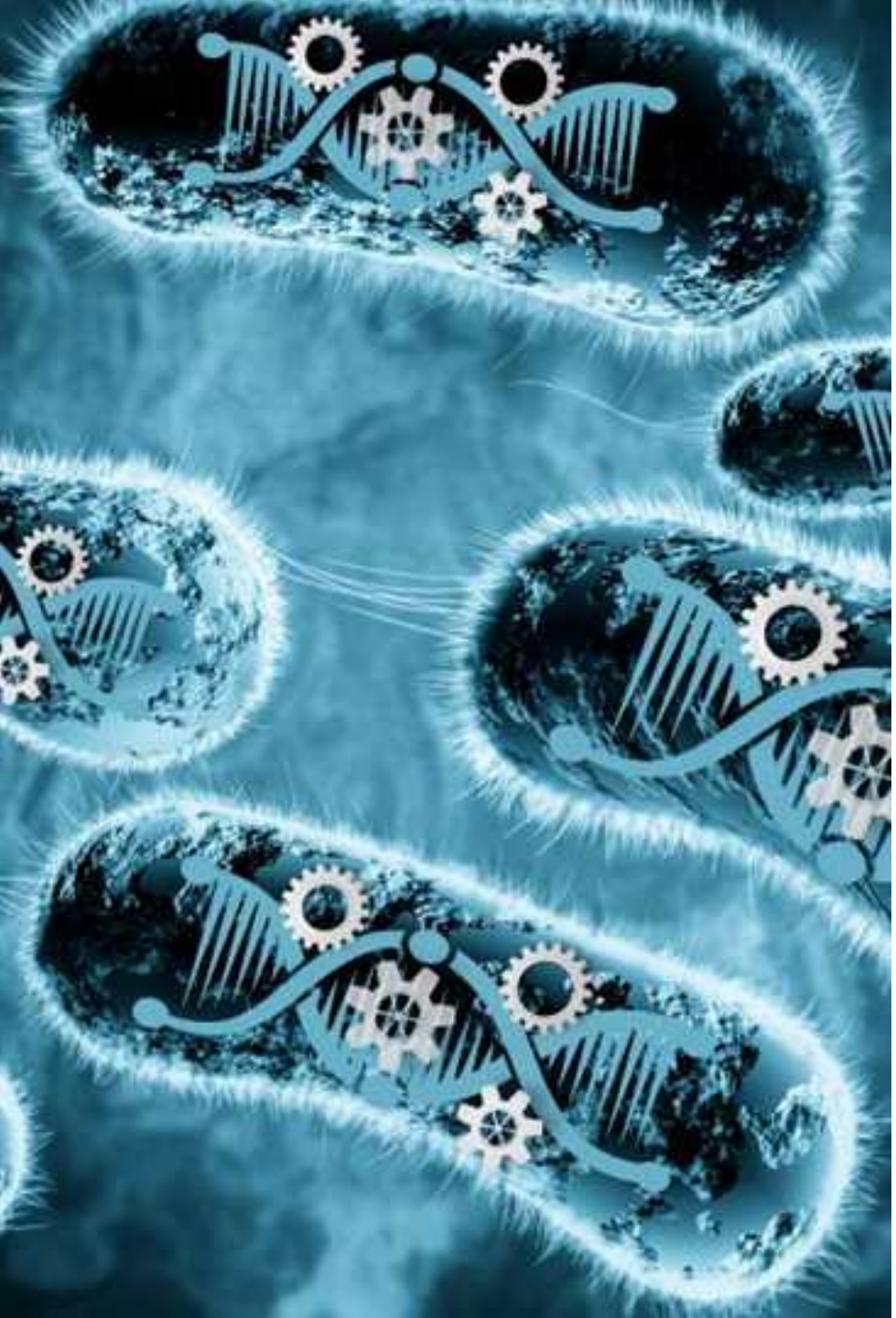
Rafine karbohidratlar ve şekerler

- İmal edilen işlenmiş gıdaların %75'ine şeker ilave ediliyor.

Probiyotikler (for life!)

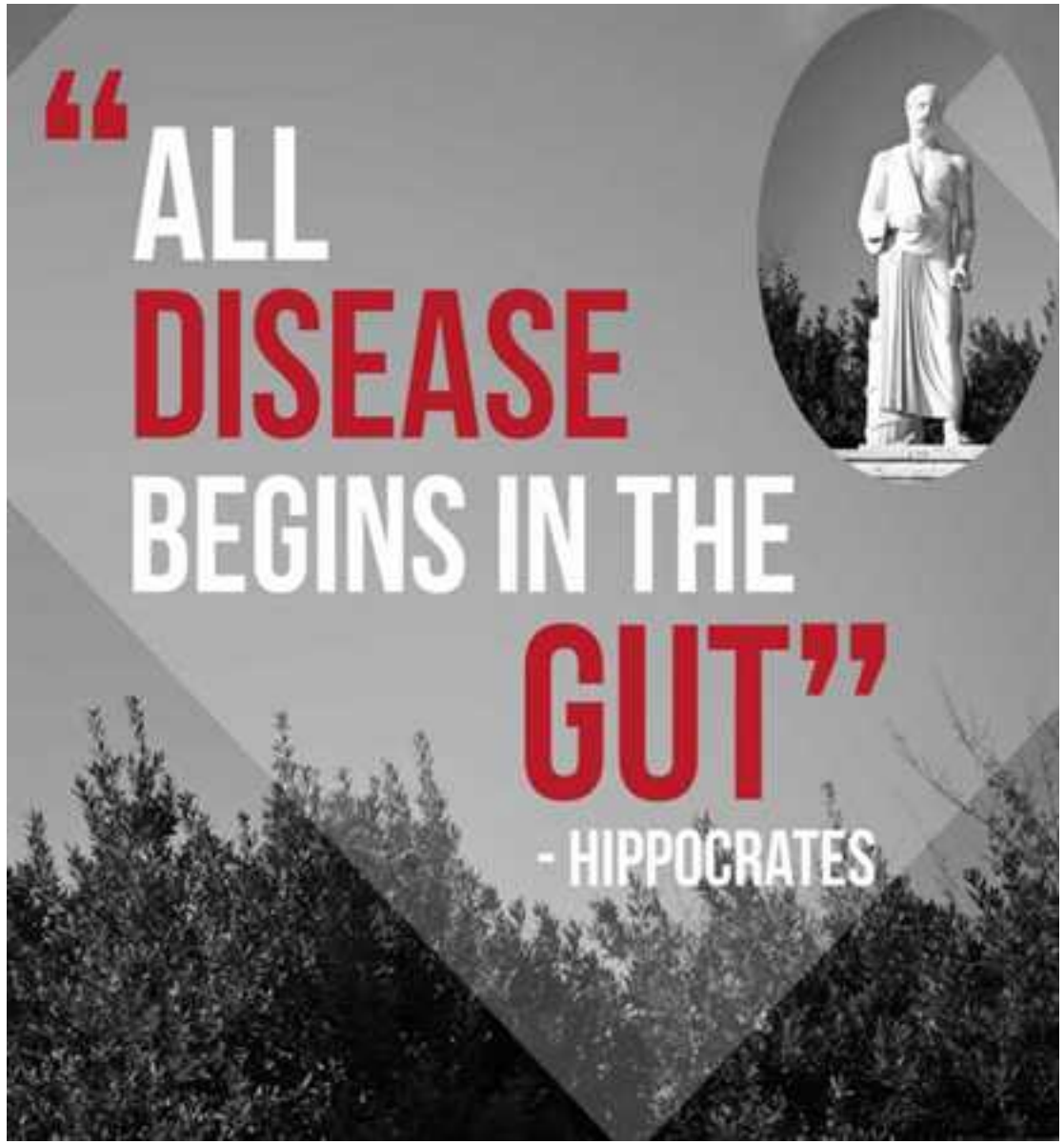
- Sağlığa fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar
- Rus Mikrobiyolog **İlya Meçnikov** (1908 Nobel/Fizyoloji-Tıp/Fagositoz)
- En yaygın ***Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*** türleri. ***Bacillus subtilis*** ve ***Bacillus coagulans*** gibi diğer bakteriler veya ***Saccharomyces boulardii*** gibi mayalar
- FAO ve WHO probiyotik tanımı:
  - **Yeterli miktarlarda uygulandığında konakta sağlığa fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar!**
  - Probiyotik gıdaların sağlığa faydalı yarar sağlama potansiyelini ve insan kullanımı için güvenli olduğunu gösteren yeterli sayıda bilimsel kanıtın bulunduğunu belirtmiştir.
- Probiyotik kökenlerin gerçek probiyotik mikroorganizma kriterlerini sağladığının standardizasyonu gerekmektedir!

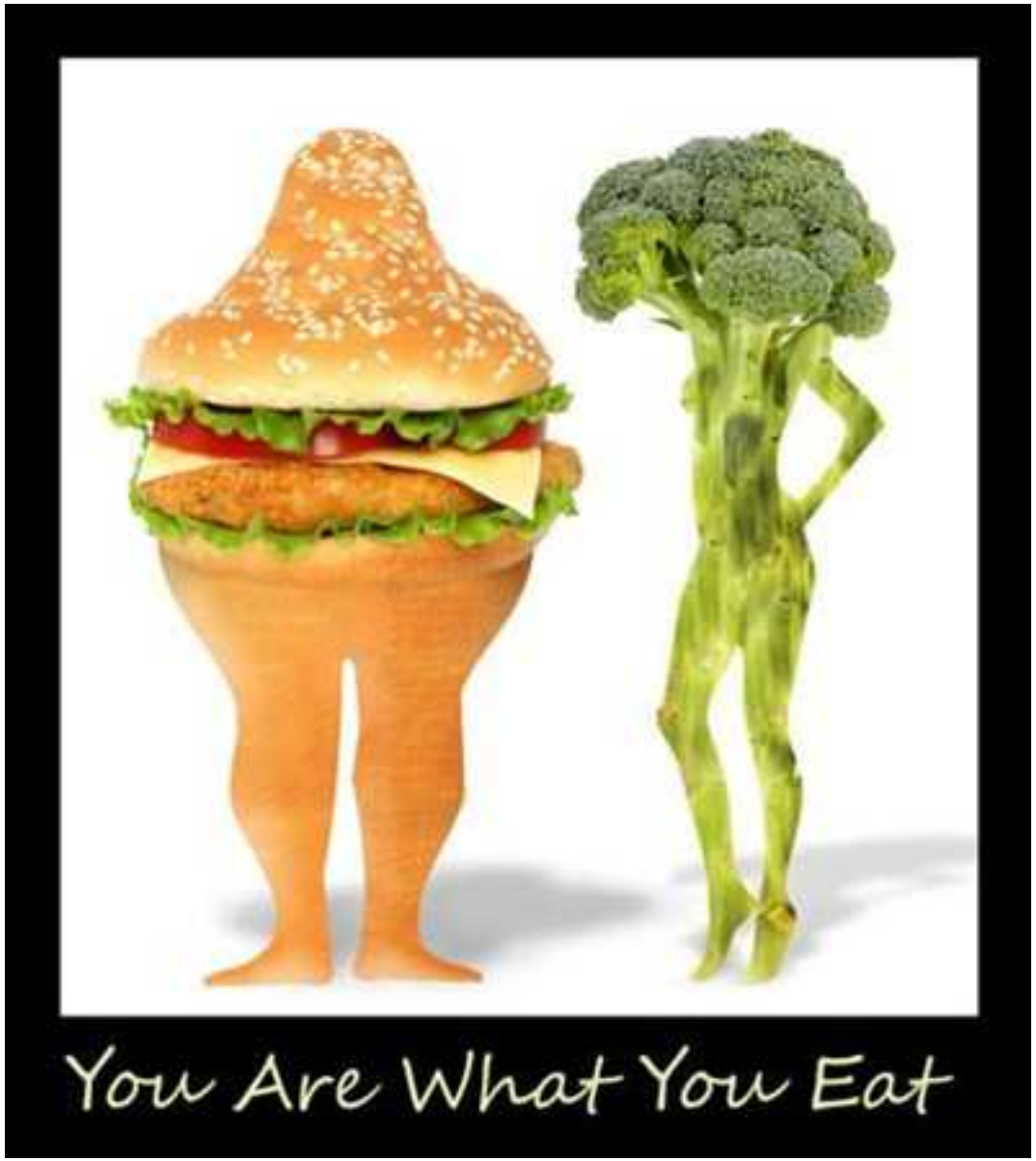


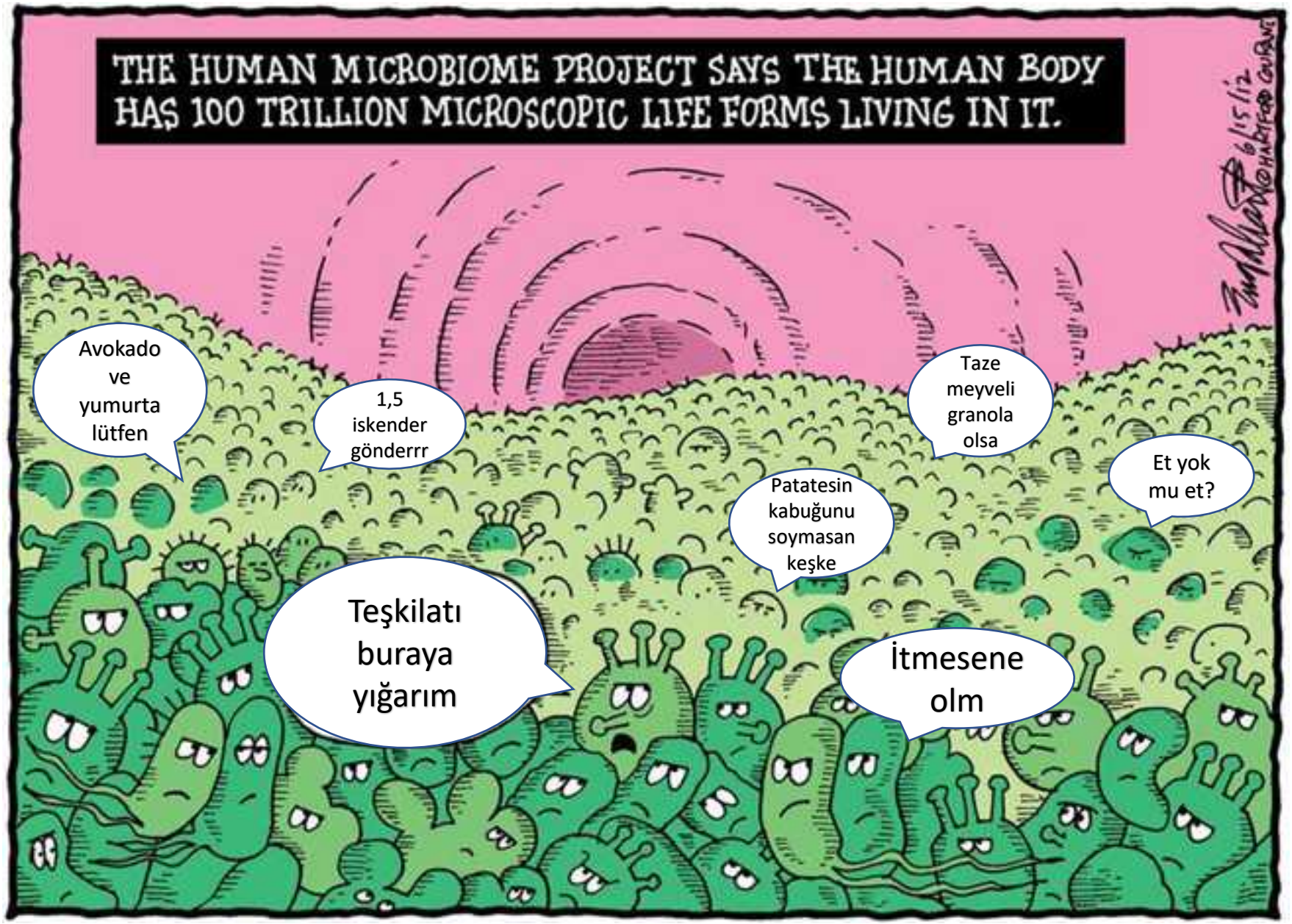


Biyoterapötik?

- Biyoterapötik = iyileştirme özelliği bulunan mikroorganizmalar
- Çalışmada 30 gün boyunca «Lactobacillus helveticus R0052» ve «Bifidobacterium longum» karışımı verildiğinde daha az depresif semptomlara ve daha düşük psikolojik stres görülmüş.
- Laktobasilluslar'ın stresi ve anksiyeteyi azalttıkları, hafıza ve kognitif fonksiyonlar üzerinde olumlu etki gösterdiği raporlanmıştır.
- Probiyotiklerin tedavi amaçlı güvenilir bir alternatif olarak sunulmasından önce daha fazla araştırma yapılması gerekir.


"ALL
DISEASE
BEGINS IN THE
GUT"
- HIPPOCRATES


You Are What You Eat



https://mybiome-demo.microba.com/results/eyJhbGciOiJIUzI1NiIsInR5cCI6IkpXVCJ9.eyJ1c2VyX2lkIjpudWxsLCJrZXlfaWQiOjEsInVzZXJfbmFtZSI6bnVsbCwic2NvcGUiOlsic2FtcGxlLXJlcG9ydCJdLCJleHAiOjE5MjY2NzU5NjksImF1dGhvcml0aWVzIjpbIkJCRjA1MDYiXSwianRpIjoiYTdhNzBkNzYtYzU3MS00YzVlLTlkMzAtOTg5NWIxZjgyZmZkIiwiY2xpZW50X2lkIjoic3lubGFiLWFwaSJ9.XuLOGSIpTm4H1XF-yrEA7gj9v8wkKL3neGMI5hdPUho