

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego  
Wydział Nauk Biologicznych



Rozprawa doktorska  
**Katarzyna Łubiech**

**Bakterie z rodziny *Lactobacillaceae*  
w mleku kobiecym**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem promotora  
dr hab. Magdaleny Twarużek, prof. uczelni,  
oraz promotora pomocniczego  
dr n. med. Eleny Sinkiewicz-Darol  
w Katedrze Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego

Bydgoszcz 2023



Składam serdeczne podziękowania:  
Pani Promotorce dr hab. Magdalenie Twarużek, prof. uczelni,  
Pani Promotorce Pomocniczej dr n. med. Elenie Sinkiewicz-Darol,  
Kierownikowi Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW  
Panu prof. dr. hab. inż. Janowi Grajewskiemu  
za wsparcie, życzliwość, cenne uwagi i możliwość realizacji badań,  
Zespołowi Zakładu Diagnostyki Mikrobiologicznej  
Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu  
oraz prof. dr hab. Dorocie Martysiak-Żurowskiej z Politechniki Gdańskiej  
za pomoc w realizacji zadań badawczych,  
Mężowi i Mamie za wsparcie każdego dnia,  
a przede wszystkim Uczestniczkom niniejszych badań.  
DZIĘKUJĘ!

Niniejszą pracę doktorską dedykuję synowi Wojciechowi,  
który stał się dla mnie inspiracją.  
Bez Ciebie, Synku nie powstałoby ani jedno zdanie tej pracy.



## Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów oraz symboli.....	8
1 Wstęp.....	11
1.1 Karmienie piersią.....	11
1.2 Wybrane właściwości karmienia piersią i żywienia mlekiem kobiecym.....	14
1.3 Mikrobiota mleka kobiecego.....	18
1.4 Bakterie należące do rodziny <i>Lactobacillaceae</i> .....	20
1.5 Oligosacharydy mleka kobiecego.....	22
1.6 Mikrobiom dziecka.....	25
2 Cel pracy.....	30
2.1 Hipotezy badawcze.....	31
2.2 Cel ogólny.....	32
2.3 Cele szczegółowe.....	32
3 Materiały.....	33
3.1 Materiał badawczy.....	33
3.2 Odczynniki mikrobiologiczne.....	35
3.2.1 Podłoża mikrobiologiczne.....	35
3.2.2 Krążki do oznaczania wrażliwości na antybiotyki.....	35
3.2.3 ETESTY.....	35
3.2.4 Pozostałe odczynniki wykorzystane w badaniach mikrobiologicznych.....	35
3.3 Odczynniki do identyfikacji molekularnej.....	36
3.4 Odczynniki i materiały do badania cytotoksyczności.....	36
3.5 Odczynniki do oznaczania oligosacharydów.....	37
4 Aparatura i wyposażenie.....	38
5 Metody badawcze.....	39
5.1 Badanie ankietowe – charakterystyka kobiet biorących udział w badaniu.....	41
5.2 Badanie makroskładników mleka kobiecego.....	41
5.3 Badanie mikrobiologiczne w kierunku oznaczenia zawartości ogólnej liczby tlenowych bakterii mezofilnych.....	43
5.4 Badanie mikrobiologiczne w kierunku wykrycia obecności bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> .....	44
5.4.1 Posiew mikrobiologiczny.....	44
5.4.2 Ocena makroskopowa.....	45

5.4.3	Identyfikacja z zastosowaniem spektrometrii mas MALDI-TOF .....	45
5.4.4	Identyfikacja genetyczna za pomocą techniki biologii molekularnej .....	47
5.4.5	Ocena mikroskopowa - barwienie metodą Grama .....	50
5.4.6	Ocena właściwości biochemicznych .....	50
5.5	Oznaczanie wrażliwości na wybrane antybiotyki .....	51
5.5.1	Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki z wykorzystaniem krążków antybiotykowych.....	51
5.5.2	Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego MIC – metoda z wykorzystaniem ETEST-ów .....	52
5.6	Ocena wpływu metabolitów postbiotycznych pochodzących ze szczepów bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> , wyizolowanych z mleka kobiecego, na komórki nowotworu piersi linii MCF-7 w warunkach in vitro .....	53
5.7	Ocena przeżywalności bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> w warunkach obniżonej temperatury.....	56
5.8	Analiza oligosacharydów mleka kobiecego .....	58
5.9	Analiza statystyczna.....	61
6	Wyniki .....	61
6.1	Charakterystyka badanej populacji na podstawie badania ankietowego .....	62
6.2	Badanie składu mleka kobiecego .....	68
6.3	Ogólna liczba mezofilnych bakterii tlenowych oraz różnorodność mikrobiologiczna przebadanych próbek mleka kobiecego .....	73
6.3.1	Ogólna liczba tlenowych bakterii mezofilnych .....	73
6.3.2	Różnorodność mikrobiologiczna próbek mleka kobiecego .....	73
6.4	Ocena występowania bakterii należących do rodziny <i>Lactobacillaceae</i> .....	74
6.4.1	Identyfikacja kolonii bakteryjnych z zastosowaniem spektrometrii mas MALDI-TOF/MS .....	74
6.4.2	Identyfikacja genetyczna z wykorzystaniem metody biologii molekularnej .....	76
6.4.3	Ocena mikroskopowa - barwienie metodą Grama .....	76
6.4.4	Ocena zdolności do wytwarzania katalazy.....	76
6.5	Ocena wrażliwości szczepów należących do <i>Lactobacillaceae</i> wyizolowanych z mleka kobiecego na wybrane antybiotyki.....	77
6.5.1	Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki z wykorzystaniem krążków antybiotykowych.....	77
6.5.2	Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego MIC – metoda z wykorzystaniem ETEST-ów .....	80
6.6	Ocena wpływu szczepów bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> , wyizolowanych z mleka kobiecego na komórki nowotworu piersi linii MCF-7 w warunkach in vitro .....	81

6.7	Ocena przeżywalności badanych izolatów w środowisku pasteryzowanego mleka kobiecego, w warunkach obniżonej temperatury .....	83
6.8	Ocena zawartości oligosacharydów w badanych próbkach mleka kobiecego .....	86
6.9	Ocena zależności występowania bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> , w grupie kobiet karmiących piersią poddanej badaniu, od analizowanych czynników .....	90
6.9.1	Czynniki matczyne .....	90
6.9.2	Czynniki okołoporodowe .....	94
6.9.3	Czynniki środowiskowe .....	97
6.9.4	Ocena zależności występowania bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> w grupie kobiet karmiących piersią poddanej badaniu składu mleka kobiecego .....	101
7	Dyskusja .....	104
7.1	Mikrobiota mleka kobiecego – liczebność i zróżnicowanie .....	104
7.2	Obecność bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym i ocena jej zależności od różnorodnych czynników .....	105
7.2.1	Czynniki matczyne .....	106
7.2.2	Czynniki okołoporodowe .....	110
7.2.3	Czynniki środowiskowe .....	111
7.3	Skład mleka kobiecego i jego wpływ na obecność bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym .....	114
7.4	Ocena wrażliwości wyizolowanych szczepów na wybrane antybiotyki .....	115
7.5	Ocena przeżywalności badanych izolatów w warunkach obniżonej temperatury....	121
7.6	Ocena wpływu metabolitów postbiotycznych pochodzących ze szczepów bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> , wyizolowanych z mleka kobiecego, na komórki nowotworu piersi linii MCF-7 w warunkach in vitro .....	123
7.7	Ocena występowania oligosacharydów .....	126
8	Podsumowanie .....	132
9	Wnioski .....	134
	Spis tabel .....	135
	Spis wykresów .....	136
	Spis rysunków .....	138
	Spis zdjęć .....	139
	Załączniki .....	140
	Bibliografia .....	147

## Wykaz stosowanych skrótów oraz symboli

**2'-FL** – *2'-fucosyllactose*, 2'-fukozylolaktoza

**3'-FL** – *3'-Fucosyllactose*, 3'-fukozylolaktoza

**6'-SL** – *6'-Sialyllactose*, 6'-sialilolaktoza

**AAP** – *American Academy of Pediatrics*, Amerykańska Akademia Pediatrii

**AC** – *amoxicillin*, amoksycylina

**AMP** – *amipicilin*, ampicylina

**ATCC** – *American Type Culture Collection*, Amerykańska Kolekcja Kultur

**BMK** – bank mleka kobiecego

**CLSI** – *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Instytut Norm Kliniknych i Laboratoryjnych

**CM** – *clindamycin*, klidamycyna

**CN** – *gentamicin*, gentamycyna

**DFL** – *difucosyllactose*, difukozylolaktoza

**DMSO** – *dimethyl sulfoxide*, dimetylosulfotlenek

**E** – *erythromycin*, erytromycyna

**EDTA** – *ethylenediaminetetraacetic acid*, kwas etylenodwuaminoczworoocowy

**EM** – *erythromycin*, erytromycyna

**EUCAST** – *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości

**FCS** – *foetal calf serum*, cielęca surowica płodowa

**GALT** – *gut-associated lymphoid tissue*, tkanka limfatyczna występująca w obrębie przewodu pokarmowego

**gen 16s RNA** – gen kodujący rybosomalny kwas rybonukleinowy (rRNA)

**Hbd** – *hebdomas graviditatis*, tydzień ciąży

**HMO** – *human milk oligosaccharides*, oligosacharydy mleka kobiecego

**HRMS** – *high resolution mass spectrometry*, spektrometria mas wysokiej rozdzielczości

**IC<sub>50</sub>** – *half-maximal inhibitory concentration*, połowa maksymalnego stężenia hamującego



**IP** – *imipenem*, imipenem

**jtk** – jednostka tworząca kolonię

**K** – *kanamycin*, kanamycyna

**LAB** – *lactic acid bacteria*, bakterie fermentacji mlekowej

**LNT** – *lacto-N-neotetraose*, lakto-N-tetraoza

**LNT** – *lacto-N-tetraose*, lakto-N-tetraoza

**MALDI-TOF/MS** – *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, metoda jonizacji próbki połączona z pomiarem jej masy w spektrometrze masowym

**MCF-7** – linia komórek nowotworu piersi (nazwa MCF od *Michigan Cancer Foundation*)

**MIC** – *minimum inhibitory concentration*, minimalne stężenie hamujące

**MIRIS HMA** – *MIRIS human milk analyser*, analizator składu mleka MIRIS

**MRS** – *De Man, Rogosa and Sharpe*, pożywka do wykrywania, namnażania i oznaczania bakterii fermentacji mlekowej

**MS** – *mass spectrometry*, spektrometria mas

**MS** – *mass spectrometry*, spektrometria masowa

**MS/MS** – *tandem mass spectrometry*, tandemowy spektrometr mas

**MTT** – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*, bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenyłu

**NEC** – *necrotizing enterocolitis*, nekrotyczne zapalenie jelit

**NMR** – *neonatal mortality rate*, wskaźnik umieralności niemowląt

**PBS** – *phosphate buffered saline*, bufor fosforanowy

**PCA** – *Plate Count Agar*, pożywka mikrobiologiczna do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów

**PCR** – *polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy

**PG** – *benzylipenicillin*, benzylopenicylina

**TE** – *tetracycline*, tetracyklina

**TOF** – *time of flight*, pomiar czasu przelotu jonów

**UHPLC** – *ultra high performance/pressure liquid chromatography*, wysokosprawna/wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa

**VA** – *vancomycin*, wankomycyna

**VBNC** – *viable but non-culturable*, żywe, lecz niehodowalne mikroorganizmy

**WHO** – *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia

# 1 Wstęp

## 1.1 Karmienie piersią

Karmienie pokarmem kobiecym (karmienie piersią lub odciągniętym mlekiem kobiecym) jest optymalnym sposobem żywienia dzieci od urodzenia. Zalecenia opiniotwórczych organizacji, związanych z nauką i medycyną (np. WHO – *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia czy AAP – *American Academy of Pediatrics*, Amerykańska Akademia Pediatrii), podkreślają korzystny wpływ wyłącznego karmienia piersią w pierwszym półroczu życia dziecka. W okresie wyłącznego karmienia piersią dziecko spożywa tylko i wyłącznie mleko kobiece, które ma zdolność adaptacji do zmieniających się potrzeb dziecka, łącznie ze zwiększonym zapotrzebowaniem na podaż płynów w warunkach podwyższonej temperatury otoczenia (Ashraf i wsp., 1993; Cohen i wsp., 2000).

AAP zaleca kontynuowanie karmienia piersią po rozszerzeniu diety niemowlęcia o pokarmy uzupełniające przez rok lub dłużej (AAP, 2012), równocześnie WHO rekomenduje kontynuowanie karmienia piersią co najmniej do drugiego roku życia dziecka (WHO, 2001). Żadna z organizacji formułujących rekomendacje dotyczące sposobu żywienia dzieci i niemowląt nie wyznacza górnego limitu wiekowego, do jakiego karmienie piersią jest wskazane. Taka granica nie została wyznaczona ze względu na indywidualne potrzeby zarówno karmionego piersią dziecka, jak i matki. Decyzja o długości karmienia piersią pozostaje w gestii matki i dziecka, uwzględniając indywidualne potrzeby, i nie powinna podlegać presji otoczenia (Agostini i wsp., 2009).

Przyjmuje się, że mleko kobiece zawiera w swoim składzie około 87%–88% wody, 60–70 g/L węglowodanów, 8–10 g/L białka oraz 35–40 g/L tłuszczu (Kim i Yi, 2020). Wartości te są jednak ogólne, a prowadzone badania składu mleka kobiecego wskazują, że zachodzą w nim istotne zmiany wraz z długością laktacji, dopasowując się do aktualnych potrzeb żywieniowych rosnącego organizmu dziecka. Warto podkreślić, że pokarm matki nie traci właściwości odżywczych wraz z wydłużającą się laktacją (Andreas i wsp., 2015; Czosnykowska-Łukacka i wsp., 2018). Długie karmienie piersią definiowane jest w różny sposób. Niektóre źródła za wartość graniczną przyjmują karmienie dziecka powyżej 12 miesięcy (Wrigley

i Hutchinson, 1990). Istnieją dowody na to, że mleko kobiet długo karmiących zaczyna swoim składem przypominać mleko z pierwszego etapu laktacji. Jest zatem bogatsze w składniki odżywcze, takie jak tłuszcz oraz białka, a także cechuje się wyższą wartością energetyczną. W badaniach przeprowadzonych przez Mandel i wsp. (2005) porównywano wartość energetyczną mleka kobiecego na różnych etapach laktacji. Średnia wartość energetyczna mleka kobiecego w grupie kontrolnej wyniosła 3103,7 kJ/L (74 kcal/mL), natomiast mleko kobiece pochodzące od matek długo karmiących osiągnęło wartość energetyczną na poziomie 3683,2 kJ/L (88 kcal/100 mL). W powyższym badaniu analizowano również zmiany zawartości tłuszczu zależne od długości trwania laktacji. Wyniki wskazały na istotnie skorelowany wzrost zawartości tłuszczu oraz wartości energetycznej mleka kobiecego wraz z postępem laktacji (Mandel i wsp., 2005; Verd i wsp., 2018). W badaniach przeprowadzonych przez Sinkiewicz-Darol i wsp. (2022) średnia zawartość składników odżywczych dla tłuszczu, białka ogólnego, węglowodanów w próbkach mleka kobiecego pochodzących od kobiet karmiących piersią ponad rok wyniosła odpowiednio: 4,88; 1,18 oraz 6,95 g/100 mL. Średnia wartość energetyczna próbek mleka kobiet długo karmiących, przeanalizowana w badaniu, wyniosła 78,13 kcal/100 mL. Z powyższych danych wynika, że mleko kobiece jest ważnym składnikiem diety nie tylko niemowląt, ale także starszych dzieci. Niestety długie karmienie piersią, pomimo dobroczynnego wpływu na stan zdrowia dzieci, nie jest zjawiskiem powszechnym (Baranowska i wsp., 2019). W tabeli 1. przedstawiono skład mleka kobiecego pochodzącego z różnych etapów laktacji na podstawie przeprowadzonych badań (Czosnykowska-Łukacka i wsp., 2018; Kin i Yi, 2020).

Tabela 1. Wartości dotyczące składu mleka kobiecego na różnych etapach laktacji (opracowanie własne na podstawie Kin i Yi, 2020 oraz Czosnykowska-Lukacka i wsp., 2018)

Parametr składu mleka kobiecego	Siara (1 –5 dzień)	Mleko dojrzałe (>14 dni)	Mleko kobiet długo karmiących (> 1 roku)
wartość energetyczna	50-60 kcal/100 mL	65-70 kcal/100mL	78-107 kcal/ mL
węglowodany	5,0-6,2 g/100mL	6,0-7,0 g/100mL	6,6-7,0 g/100mL
białko ogólne	1,4-1,6 g/100mL	0,8-1,0 g/100mL	1,0 -1,9 g/100mL
tłuszcz	1,5-2,0 g/100mL	3,5-4,0 g/100mL	5,8-8,0 g/100mL

Karmienie dziecka piersią może być kontynuowane pomimo zajścia matki w kolejną ciążę, a także po urodzeniu kolejnego dziecka. Zjawisko karmienia piersią młodszego dziecka przy kontynuowaniu karmienia piersią także starszego nazywane jest karmieniem w tandemie. Karmienie tandemowe nie jest zjawiskiem powszechnym. Kobiety decydują się na taki sposób żywienia dzieci głównie ze względu na świadomość korzyści zdrowotnych. Badania przeprowadzone przez Sinkiewicz-Darol i wsp. (2021) nie wykazały negatywnego wpływu karmienia dzieci w różnym wieku na skład mleka kobiecego. Mleko to pokrywało potrzeby żywieniowe zarówno młodszego, jak i starszego dziecka.

Oprócz podstawowych potrzeb związanych z pokryciem zapotrzebowania energetycznego oraz zapotrzebowania na poszczególne składniki odżywcze podczas karmienia piersią zaspokajane są również potrzeby emocjonalne. Udowodniono korzystny wpływ karmienia piersią na rozwój psychiczny i poczucie bezpieczeństwa dzieci, a także kształtowanie silnej więzi pomiędzy matką a dzieckiem (Kendall-Tackett i Sugarman, 1995; Kennell i McGrath, 2005; Krol i Grossmann, 2018).

## 1.2 Wybrane właściwości karmienia piersią i żywienia mlekiem kobiecym

Karmienie piersią wykazuje szereg korzyści zdrowotnych, których beneficjentami są zarówno kobiety karmiące piersią, jak i dzieci żywione mlekiem kobiecym. Oprócz zaspokajania podstawowych potrzeb żywieniowych mleko kobiece dostarcza dziecku również wielu składników bioaktywnych, które sprawiają, że mleko kobiece jest pokarmem jedynym w swoim rodzaju (Gregg i wsp., 2022). Do składników bioaktywnych, których obecność została potwierdzona w składzie mleka kobiecego, należą m.in.: drobnoustroje, komórki macierzyste, mikroRNA, oligosacharydy hormony oraz enzymy (Kosaka i wsp., 2010; Lönnerdal, 2013; Andreas i wsp., 2014; Smilowitz i wsp., 2014; Witkowska-Zimny i Kaminska-El-Hassan, 2017; Ninkina i wsp., 2019).

Karmienie piersią niesie ze sobą wiele korzyści prozdrowotnych, wśród których szczególne znaczenie przypisuje się wpływowi żywienia naturalnego na prawidłowy rozwój i funkcjonowanie układu odpornościowego dziecka (Silvers i wsp., 2012). Bioaktywne składniki mleka kobiecego wspomagają odporność organizmu, przez co zmniejsza się podatność układów: pokarmowego, oddechowego czy też moczowego, na infekcje, a w przypadku wystąpienia choroby obserwowany jest łagodniejszy jej przebieg (Kramer i Kakuma, 2004; Ip i wsp., 2009; Ballard, 2013). Jednymi z ważniejszych elementów bioaktywnych zawartych w składzie mleka kobiecego są mikroorganizmy, które również przyczyniają się do budowania odporności karmionego piersią dziecka, co przejawia się m.in. w zapobieganiu chorobom infekcyjnym, zwłaszcza w początkowym okresie życia. To ochronne działanie ma niezwykle duże znaczenie w krajach rozwijających się, gdzie śmiertelność dzieci jest wyższa w porównaniu z krajami uprzemysłowionymi (Perin i wsp., 2022). Chociaż na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się zmniejszanie śmiertelności dzieci, biegunka cały czas jest jedną z głównych jej przyczyn (Turin i Ochoa, 2014; Sharrow i wsp., 2022). Biegunki na tle infekcyjnym stają się przyczyną odwodnienia i osłabienia organizmu, co prowadzić może do śmierci. Wiążą się także z konsekwencjami długofalowymi w postaci zahamowania tempa wzrostu oraz zaburzeń funkcji poznawczych. Zaobserwowano znacznie niższe ryzyko wystąpienia biegunek wśród dzieci karmionych mlekiem

kobiecy w porównaniu do żywienia z zastosowaniem mieszanek mlekozastępczych (Cattaneo i Quintero-Romero, 2006).

Wpływ karmienia piersią na układ odpornościowy dziecka przejawia się również obniżaniem ryzyka wystąpienia chorób alergicznych oraz autoimmunologicznych. Efekt protekcyjny uwarunkowany jest działaniem przeciwzapalnym składników bioaktywnych mleka kobiecego, wpływem na wykształcenie odpowiedniego poziomu tolerancji immunologicznej dla antygenów oraz działaniem modulującym na mikrobiom dziecka (Vieira Borba i wsp., 2018). Na przykład polisacharyd A umiejscowiony na powierzchni *Bacteroides fragilis*, bakterii wchodzącej w skład mikrobiomu mleka kobiecego, może oddziaływać z receptorem Toll 2 komórek dendrytycznych i w efekcie pobudzać do uwalniania cytokin, sprzyjających proliferacji komórek odpornościowych w błonie śluzowej jelit. Ma to kluczowe znaczenie dla prawidłowego rozwoju układu odpornościowego związanego z błoną śluzową jelit GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) oraz wykształcenia odpowiedniej tolerancji immunologicznej (Carr i wsp., 2021).

Badania dotyczące prozdrowotnych właściwości mleka kobiecego wykazały, że żywienie mlekiem kobiecym zmniejsza zapadalność noworodków na martwicze zapalenie jelit NEC (*necrotizing enterocolitis*) (Altobelli i wsp., 2020; Lucas i Cole, 1990). Schorzenie to jest jedną z głównych przyczyn śmierci wśród dzieci przedwcześnie urodzonych. Mechanizmy patofizjologiczne dotyczące NEC nie zostały do końca wyjaśnione, co utrudnia podjęcie działań prewencyjnych. Wiadomo, że w rozwoju NEC obserwowane są procesy zapalne w obrębie przewodu pokarmowego noworodka, wyzwalane przez takie czynniki, jak: stosowanie preparatów mlekozastępczych, dysbioza jelitowa oraz niedojrzałość immunologiczna błony śluzowej jelit (Nolan i wsp., 2020). Żywienie mlekiem kobiecym może zapobiegać rozwojowi martwiczego zapalenia wśród dzieci przedwcześnie urodzonych, co zaobserwowano na oddziałach neonatologicznych, przyczyniając się do zmniejszenia częstości diagnozowania NEC (Schanler, 2005; Sullivan i wsp., 2010; Kantorowska i wsp., 2016). Badania przeprowadzone przez Good i wsp. (2015) wyjaśniają działanie ochronne mleka kobiecego. Odbywa się ono dzięki hamowaniu receptora TLR4 w nabłonku jelitowym, co skutkuje

zahamowaniem apoptozy enterocytów i pobudzeniem ich proliferacji. Ponadto mleko kobiece zawiera w swoim składzie wiele czynników charakteryzujących się działaniem przeciwzapalnym oraz immunostymulującym, takich jak immunoglobuliny, czynniki wzrostu, oligosacharydy czy też cytokiny. Składniki te przyczyniają się do wzmocnienia bariery jelitowej noworodka (Nolan i wsp., 2020). Problemem związanym z żywieniem mlekiem własnej matki dzieci przedwcześnie urodzonych są trudności laktacyjne wynikające z urodzenia dziecka przed spodziewanym terminem porodu. Organizm matki nie jest jeszcze w pełni przygotowany pod względem fizjologicznym do laktacji, co powoduje niedostatek pokarmu niezbędnego do wykarmienia nowo narodzonego dziecka. Optymalnym rozwiązaniem w tej sytuacji jest żywienie dzieci mlekiem kobiecym pozyskanym od dawczyń do banków mleka kobiecego (Bai i Kuscin, 2001).

Oprócz doraźnych korzyści zdrowotnych wynikających z żywienia dzieci mlekiem kobiecym obserwuje się również efekty długofalowe (Salone i wsp., 2013; Hoddinott i wsp., 2008). Dieta dziecka oparta na mleku kobiecym może przyczyniać się do zmniejszenia ryzyka rozwoju chorób cywilizacyjnych na późniejszych etapach życia, chociaż badania naukowe pozostają w tej kwestii niejednoznaczne. Wpływ karmienia piersią na zapobieganie występowania chorób cywilizacyjnych jest tematem spornym. Wyniki prowadzonych badań często wykazują przeciwstawne rezultaty (Horta i wsp., 2013; Marseglia i wsp., 2015). Główną przyczyną napotykanych trudności w określeniu wpływu żywienia dzieci mlekiem kobiecym na skutki odległe w czasie jest wieloczynnikowe podłoże omawianych chorób oraz konieczność długoterminowej perspektywy w ocenie skuteczności działania. Pomimo kontrowersji coraz więcej dowodów sugeruje, że karmienie piersią pełni rolę ochronną w stosunku do występowania otyłości, nadciśnienia tętniczego czy też cukrzycy typu II w wieku dorosłym (Martin i wsp., 2005; McCrory i Layte, 2012; Spatz, 2014; Pereira i wsp., 2014; Dieterich i wsp., 2013; Wang i wsp., 2017). Zapobieganie rozwojowi chorób kwalifikowanych do grupy schorzeń cywilizacyjnych istotne jest nie tylko z punktu widzenia pojedynczego człowieka, ale także całego społeczeństwa. Prewencja stanowi optymalny sposób poprawy jakości życia ludzi oraz redukcji nakładów finansowych związanych z późniejszą terapią (Ball i Bennett, 2001).



Oprócz korzystnego wpływu żywienia mlekiem kobiecym na stan zdrowia dziecka obserwuje się również korzyści wynikające z karmienia piersią dla zdrowia matki. Wyniki prowadzonych badań wskazują na zmniejszenie zapadalności kobiet na takie choroby, jak: nowotwory piersi i jajnika, endometrium, występowanie nadciśnienia tętniczego, cukrzycy typu II czy hiperlipidemii w porównaniu do kobiet niekarmiących piersią (Newcomb i wsp., 1994; Babita i wsp., 2014; Van Rossum i wsp., 2008; Zhou i wsp., 2015; Chowdhury i wsp., 2015). Na przykład według badań Da-Peng Li i wsp. (2014) redukcja ryzyka zachorowania na nowotwór jajnika wyniosła 30% w porównaniu z kobietami, które nigdy nie karmiły piersią. Zauważono, że efekt protekcyjny uwarunkowany jest długością okresu karmienia piersią (Stuebe, 2009; Abou-Dakn, 2018).

Z karmieniem piersią wiążą się także inne korzyści dla zdrowia matki. Badania wskazują, że wyłączone karmienie piersią może chronić przed wystąpieniem depresji poporodowej (Figueiredo, 2014; Xia i wsp., 2022). Przeciwdepresyjna rola karmienia piersią polega w głównej mierze na regulacji gospodarki hormonalnej m.in. poprzez osłabienie reakcji neuroendokrynych na stres, objawiające się obniżeniem poziomu kortyzolu we krwi. Duże znaczenie ma także regulacja wzorców snu i czuwania, poprawa poczucia własnej sprawczości oraz wzmocnienie emocjonalnej więzi z dzieckiem (Figueiredo i wsp., 2014). Działanie przeciwdepresyjne karmienia piersią przypisywane jest także zmniejszaniu matczynych endogennych zasobów retinoidów. Związki te gromadzone są pod koniec ciąży oraz po porodzie w wątrobie i gruczołach piersiowych, stanowiąc zapas na nadchodzący okres laktacji. Dane literaturowe wskazują, że podwyższony poziom retinoidów wiąże się z występowaniem zaburzeń poznawczych oraz zaburzeń nastroju u matki (Mawson i Xueyuan, 2013).

Karmienie piersią wywiera także korzystny wpływ na gospodarkę wapniową organizmu kobiety. Wykazano, że kobiety karmiące piersią w młodości, pomimo utraty masy kostnej w okresie laktacji, obarczone są mniejszym prawdopodobieństwem zachorowania na osteoporozę w wieku pomenopauzalnym (Labbok, 1999).

### 1.3 Mikrobiota mleka kobiecego

Mleko kobiece zawiera mikroorganizmy pochodzące ze skóry, jak i drobnoustroje związane ze środowiskiem jelit matki oraz środowiskiem otaczającym. Dotychczasowe analizy mikrobiologiczne pozwoliły na scharakteryzowanie głównych rodzajów bakterii obecnych w składzie mikrobiomu mleka kobiecego, stanowiących jego rdzeń. Rdzeniem mikrobiomu mleka kobiecego zdrowych kobiet są bakterie należące do rodzajów: *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Propionibacterium* oraz rodziny *Lactobacillaceae*. Do bakterii, identyfikowanych w większości próbek mleka kobiecego poddawanych analizie, należą również przedstawiciele rodzajów: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Sphingomons* oraz *Bradyrhizobium* (Rodríguez, 2014; Jiménez i wsp., 2015; Fitzstevens i wsp., 2017; Kotlińska i Huras, 2017; Moubareck, 2021).

Chociaż w skład mikrobiomu mleka kobiecego wchodzi drobnooustroje występujące u większości kobiet w okresie laktacji, charakteryzuje się on dużą zmiennością osobniczą (Jiménez i wsp., 2015). Mleko kobiece oprócz mikroorganizmów korzystnie wpływających na stan zdrowia dziecka może być także źródłem bakterii patogennych, a także wirusów eukariotycznych (głównie *Herpesviridae*) oraz bakteriofagów, wśród których najliczniejszą grupę stanowią przedstawiciele *Podoviridae*, *Myoviridae* oraz *Siphoviridae* (Mohandas i Pannaraj, 2020; Dinleyici i wsp., 2021; Duale i wsp., 2022). Wirusy zawarte w mleku kobiecym biorą udział w kształtowaniu wiriomu i mikrobiomu jelit dziecka. Mleko kobiece zawiera w sobie czynniki chroniące przed procesem internalizacji patogennych wirusów. Należą do nich np.: oligosacharydy, laktoferyna oraz przeciwciała (Duale i wsp., 2022). Kolejną grupą mikroorganizmów, wchodzących w skład mikrobioty mleka kobiecego, są grzyby. Badania przeprowadzone przez Jiménez i wsp. (2015) wykazały, że grzyby stanowią od 0,5 do 2% wszystkich drobnoustrojów zawartych w mleku kobiecym.

Skład jakościowy mikrobioty mleka kobiecego jest zmienny i zależy od wielu czynników. Mogą to być czynniki zewnętrzne, środowiskowe, ale także czynniki zależne od matki, tzw. matczyne. Przykładowo obecność poszczególnych rodzajów bakterii w kompozycji mikrobiologicznej mleka kobiecego może być

uwarunkowana masą ciała kobiety karmiącej piersią. Na podstawie wartości wskaźnika BMI wykazano, że mleko kobiet karmiących piersią o wyższym indeksie masy ciała charakteryzowało się mniejszą zawartością bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Dodatkowo mleko to zawierało większą ilość bakterii z rodzajów *Staphylococcus* i *Streptococcus* niż mleko kobiet, których waga mieściła się w granicach normy (Notarbartolo i wsp., 2022; Taghizadeh i wsp., 2015).

Jednym z głównych determinant kompozycji mikrobiologicznej mleka kobiecego jest etap laktacji. Siara charakteryzuje się większą różnorodnością mikrobiologiczną w stosunku do mleka dojrzałego (Martin i wsp., 2003). Wśród mikroorganizmów zidentyfikowanych w siarze dominują bakterie należące do rodzajów: *Weissella*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* oraz *Lactococcus* (Kotlińska i Huras, 2017).

Skład mikrobiologiczny mleka kobiecego zależy także od sposobu jego pozyskiwania. Mleko podczas bezpośredniego karmienia piersią jest bogatsze w mikroorganizmy związane z jamą ustną oraz bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* w porównaniu z mlekiem odciganym (Moossavi i wsp., 2019). Wśród innych czynników mogących wpłynąć na zróżnicowanie mikroorganizmów zasiedlających środowisko mleka kobiecego można wyróżnić wiek ciążowy w momencie urodzenia dziecka czy też sposób porodu (Khodayar-Pardo i wsp., 2014). Badania przeprowadzone przez Hermansson i wsp. (2019) wskazują, że planowane cięcie cesarskie ma wpływ na skład mikrobioty mleka kobiecego. Badając wpływ rodzaju porodu, nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w odniesieniu do bakterii występujących najliczniej w środowisku mleka kobiecego, do których zaliczyć można gronkowce oraz paciorkowce, wpływał natomiast na zróżnicowanie gatunkowe dotyczące pozostałych bakterii zawartych w mleku kobiecym. Większa różnorodność mikrobiologiczna charakteryzowała mleko pochodzące od kobiet, które urodziły siłami natury, niż w przypadku porodu poprzez cięcie cesarskie.

## 1.4 Bakterie należące do rodziny *Lactobacillaceae*

Bakterie należące do *Lactobacillaceae* są przedstawicielami bakterii fermentacji mlekowej. Do roku 2020 rodzaj *Lactobacillus* obejmował 261 gatunków bakterii. Charakteryzowały się one dużym zróżnicowaniem fenotypowym, genotypowym oraz ekologicznym. Rodzaj *Lactobacillus* zaliczano do typu *Firmicutes*, klasy *Bacilli*, rzędu *Lactobacillales*, rodziny *Lactobacillaceae* (Pot i wsp., 2014). Postęp w poznawaniu genomu poszczególnych drobnoustrojów pozwolił na reorganizację ich systematyki (Zheng i wsp., 2015). Początkowe kryteria klasyfikowania bakterii przyporządkowywanych do rodzaju *Lactobacillus* opierały się na cechach fenotypowych, wymaganiach wzrostowych oraz różnicach w procesach metabolicznych. Rodzaj *Lactobacillus*, obowiązujący przed rokiem 2020, obejmował dużą ilość różnych podgrup filogenetycznych. Stwarzało to problemy z przynależnością taksonomiczną drobnoustrojów. Wiele gatunków bakterii z rodzaju *Lactobacillus* było ze sobą w niewielkim stopniu spokrewnionych. Badania wykazały, że obowiązujący rodzaj *Lactobacillus* wykazywał poziom różnorodności genetycznej przewyższający różnorodność obserwowaną w przypadku innych rodzajów, a nawet rodzin bakteryjnych (Zielińska i Kołożyn-Krajewska, 2020; Zheng i wsp., 2020). W roku 2020 bakterie z ówczesnego rodzaju *Lactobacillus* zostały przydzielone do 25 rodzajów: *Lactobacillus delbrueckii*, *Paralactobacillus* oraz 23 nowych rodzajów (Zheng i wsp., 2020). Wprowadzone zmiany, chociaż słuszne z punktu widzenia nauki, wiązały się ze zmianami nie tylko w nauce, ale także przemyśle, który coraz szerzej korzysta z bakterii probiotycznych, do których należą przedstawiciele omawianych drobnoustrojów. Aby zapobiec chaosowi związanemu ze zmianą, zarówno rodzaju, jak i gatunku bakterii, podjęto decyzję o pozostawieniu bez zmian oznaczeń numerycznych szczepów odnoszących się do kolekcji kultur referencyjnych, a obowiązek aktualizacji nomenklatury w przemyśle farmaceutycznym oraz spożywczym odłożono w czasie (Zielińska i Kołożyn-Krajewska, 2020). W tabeli 2. zamieszczono obowiązujący podział poprzedniego rodzaju *Lactobacillus* na nowo wyodrębnione rodzaje.

Tabela 2. Nowy podział rodzajów bakterii należących poprzednio do rodzaju *Lactobacillus* (opracowanie własne na podstawie Zheng i wsp., 2020)

Nowe rodzaje bakterii wydodrębnione z poprzedniego rodzaju <i>Lactobacillus</i>		
<i>Acetilactobacillus</i>	<i>Dellaglioia</i>	<i>Lentilactobacillus</i>
<i>Agrilactobacillus</i>	<i>Fructilactobacillus</i>	<i>Levilactobacillus</i>
<i>Amylolactobacillus</i>	<i>Furfurilactobacillus</i>	<i>Ligilactobacillus</i>
<i>Apilactobacillus</i>	<i>Holzapfelia</i>	<i>Limosilactobacillus</i>
<i>Bombilactobacillus</i>	<i>Lactaseibacillus</i>	<i>Liquorilactobacillus</i>
<i>Companilactobacillus</i>	<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>Paucilactobacillus</i>
<i>Loigolactobacillus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Schleiferilactobacillus</i>
<i>Paralactobacillus</i>	<i>Lapidilactobacillus</i>	
<i>Secundilactobacillus</i>	<i>Latilactobacillus</i>	

Bakterie należące do rodziny *Lactobacillaceae* są drobnoustrojami Gram-dodatnimi, co związane jest ze specyfiką budowy ściany komórkowej. Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich zbudowana jest z peptydoglikanu, a także kwasów teicholowych, lipoteichojowych, polisacharydów i białka. Struktura ta charakteryzuje się dużą wytrzymałością na rozciąganie dzięki silnemu usieciowaniu. Bakterie należące do rodziny *Lactobacillaceae* wytwarzają egzopolisacharydy połączone z komórką wiązaniami lub uwalniane do otoczenia (Górska, 2007). Przedstawiciele rodziny *Lactobacillaceae* są fakultatywnymi bądź bezwzględnie beztlenowcami, gdyż proces fermentacji glukozy może zachodzić w warunkach mikroaerofilnych lub beztlenowych. Ze względu na prowadzone przemiany metaboliczne środowisko, w którym funkcjonują, obniża swoje pH. Bakterie kwasu mlekowego, do których należą przedstawiciele rodziny *Lactobacillaceae*, mają zdolność regulacji odczynu wewnątrzkomórkowego dzięki obecności mechanizmów wyrównawczych (Gajewska i Błaszczuk, 2012). Dzięki takiemu przystosowaniu bakterie należące do *Lactobacillaceae* mogą funkcjonować w środowisku, którego pH mieści się w granicach 4,5 do 7 (Ha i wsp., 2003). Wśród bakterii z rodziny *Lactobacillaceae* wyróżnić można bakterie homofermentatywne oraz heterofermentatywne. Homofermentacja glukozy prowadzi do wytworzenia kwasu mlekowego. W przypadku bakterii

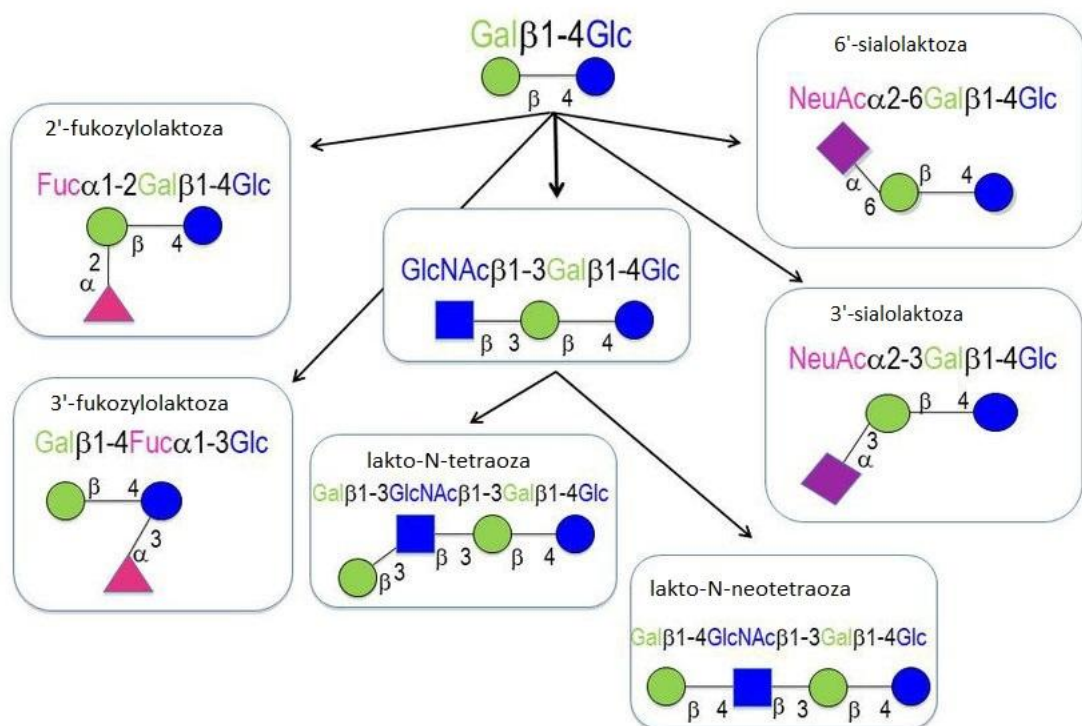
heterofermentacyjnych w wyniku przemian metabolicznych powstaje kwas mlekowy, etanol oraz dwutlenek węgla (Gajewska i Błaszczuk, 2012). Wspólnymi cechami omawianych drobnoustrojów są także: niezdolność do wytwarzania przetrwalników oraz katalazy oraz zdolność do wytwarzania dysmutazy nadtlenkowej. Przedstawiciele rodziny *Lactobacillaceae* odznaczają się dużymi wymaganiami wzrostowymi. Wymagają do wzrostu obecności węglowodanów, aminokwasów, peptydów, kwasów tłuszczowych, składników kwasów nukleinowych oraz witamin w podłożu. Na podłożu hodowlanym bakterie należące do *Lactobacillaceae* rosną w postaci małych, gładkich kolonii, o średnicy od 2 do 5 mm. Powierzchnia kremowych lub bezbarwnych kolonii *Lactobacillaceae* może być matowa lub błyszcząca. Omawiane drobnoustroje odnajdują najlepsze warunki do wzrostu w przedziale temperaturowym pomiędzy 30 a 40°C oraz w środowisku o pH w granicach 5,5–6,2 (Buda i wsp., 2013).

### 1.5 Oligosacharydy mleka kobiecego

Wśród wielu składników bioaktywnych mleka kobiecego wyróżnić można czynniki prebiotyczne w postaci oligosacharydów mleka kobiecego HMO (*human milk oligosaccharides*), wspierające wzrost drobnoustrojów jelitowych. Związki te stanowią trzecią pod względem ilości grupę składników stałych w mleku kobiecym (Menzel i wsp., 2021). Charakteryzują się zróżnicowaną strukturą, utworzoną przez 3 do 22 monosacharydów, wśród których występują: D-glukoza, D-galaktoza, L-fukoza, N-acetyloglukozamina oraz kwas N-acetyloneuraminowy (kwas sjałowy) (Kuntz i Rudloff, 2008; Marcobal i wsp., 2011). Każdy z oligosacharydów zbudowany jest z cząsteczki laktozy, do której przyłączone mogą być kolejne cząsteczki mono- i disacharydów (Bode, 2015; Andreas i wsp., 2015). Można wyróżnić HMO sjałowane oraz fukozylowane powstające poprzez przyłączenie cząsteczek kwasu sjałowego lub fukozy do szkieletu struktury HMO dzięki działaniu enzymów katalizujących ten proces, sialotransferaz oraz fukozylotransferaz. Na podstawie obecności lub braku fukozy oraz kwasu sjałowego HMO dzieli się na grupy:

- kwaśne – sjałowane
- neutralne.

Aktywność poszczególnych enzymów uwarunkowana jest genetycznie i wpływa na różnice osobnicze kompozycji HMO. Na podstawie różnic w obecności i sposobie przyłączania fukozy wyodrębnić można cztery możliwości uwarunkowane genetycznie, zdeterminowane aktywnością odpowiednich transferaz. Pierwsza możliwość charakteryzuje się obecnością fukozy przyłączonej do struktury HMO wiązaniami zarówno  $\alpha$ 1-2- jak i  $\alpha$ 1-3/4-glikozydowymi (Se+/L+). Druga możliwość to występowanie wyłącznie połączeń za pomocą wiązań  $\alpha$ 1-3/4-glikozydowych (Se-/L+). Trzecia możliwość polega na związaniu fukozy wyłącznie za pomocą wiązań  $\alpha$ 1-2-glikozydowych (Se+/L-). Ostatnią możliwością jest brak ww. wiązań, co za tym idzie, brak przyłączonej fukozy do struktury oligosacharydu (Se-/L-) (Bode, 2015; Lis-Kuberka i Orczyk-Pawitowicz, 2015). Rysunek 1. przedstawia podstawowe struktury oligosacharydów mleka kobiecego.



Rysunek 1. Podstawowe struktury oligosacharydów mleka kobiecego (modyfikacja na podstawie Plaza-Díaz i wsp., 2018)

Przydział do poszczególnych grup można przeprowadzić na podstawie analizy zawartości określonych HMO w składzie mleka kobiecego. Tabela 3.

przedstawia zaproponowane zawartości 2'-fukozylolaktozy oraz lakto-N-fukopentasacharydu II jako kryteriów przydziału do poszczególnych grup.

Tabela 3. Przydział do grup na podstawie zawartości 2'-FL oraz LNFP II w próbkach mleka kobiecego (modyfikacja na podstawie Wang i wsp., 2020)

2'-FL		LNFP II	
Se+	≥15 mg/L w ≥1 próbce	L+	≥30 mg/L w ≥1 próbce
Se-	<15 mg/L we wszystkich próbkach	L-	<30 mg/L we wszystkich próbkach

Wśród wielu funkcji oligosacharydów największe znaczenie przypisywane jest funkcji prebiotycznej w stosunku do mikrobioty jelitowej, dzięki czemu wspierana jest homeostaza organizmu (Boehm i Stahl, 2007). Efektem działania HMO w przewodzie pokarmowym dziecka jest także zdolność do blokowania adhezji patogenów do struktury błony śluzowej jelita. Szczególne znaczenie mają tu fukozylowane oligosacharydy. Struktura oligosacharydów mleka kobiecego zbliżona jest do glikokaliksu nabłonka jelitowego, w efekcie czego HMO wiążą patogeny obecne w świetle przewodu pokarmowego, blokując receptory lektynowe patogenów, a przez to uniemożliwiając im adhezję do błony śluzowej jelita (Lis-Kuberka i Orczyk-Pawiłowicz, 2015; Kong i wsp., 2021). Oligosacharydy wykazują również pośrednie działanie przeciwpatogenne, wspierając rozwój prawidłowej mikrobioty przewodu pokarmowego, a także wpływając na stan komórek nabłonka błony śluzowej jelit (Kuntz i wsp., 2008). Oligosacharydy mleka kobiecego mają także zdolność modulowania funkcji układu odpornościowego. HMO pobierane są przez komórki dendrytyczne zlokalizowane w blaszce właściwej błony śluzowej jelit. Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano aktywację tolerogennych komórek dendrytycznych przy udziale HMO. Komórki te charakteryzują się wysoką ekspresją markerów hamujących, odpowiadając za zmniejszoną produkcję cytokin prozapalnych. Pełnią również funkcję indukującą regulatorowe limfocyty T, przez co wywierają efekt immunosupresyjny. Mechanizmy te istotne są z punktu widzenia prewencji chorób o podłożu alergicznym oraz autoimmunologicznym (Xiao i wsp., 2019).



Chociaż oligosacharydy mleka kobiecego nie podlegają procesom trawiennym w organizmie dziecka, niewielka ich część ulega wchłonięciu, o czym świadczy wykrywanie omawianych struktur w moczu i osoczu. Badane są efekty działania HMO na obszary niezwiązane z przewodem pokarmowym, w tym m.in. wpływ na rozwój mózgu lub działanie immunostymulujące (Vinjamuri i wsp., 2022).

Dotychczasowe badania potwierdziły obecność kilkuset rodzajów oligosacharydów w mleku kobiecym, których ilość uwarunkowana jest w głównej mierze etapem laktacji (German i wsp., 2008). Wyższą koncentrację obserwuje się w pierwszym okresie po porodzie. Wydzielana w tym czasie siara zawiera 20–23 g/L HMO. W mleku dojrzalym, wydzielanym w późniejszym etapie laktacji, zawartość oligosacharydów obniża się do 12–15 g/L (Thurl i wsp., 2010). Również według Bode (2012) największą ilość HMO zawiera siara (20-25 g/l), a wraz z postępowaniem laktacji zawartość oligosacharydów w mleku kobiecym spada do poziomu 5–20 g/L.

## 1.6 Mikrobiom dziecka

Kształtowanie mikrobiomu dziecka jest złożonym procesem, na który wpływ mają czynniki okołoporodowe, środowiskowe, a także matczyne. Wśród mikroorganizmów zasiedlających organizm dziecka zachodzą zarówno pozytywne, jak i negatywne interakcje (Milani i wsp., 2017). Pierwszy kontakt organizmu dziecka z drobnoustrojami ma miejsce jeszcze przed narodzeniem. We krwi pępowinowej, łożysku, płynie owodniowym oraz błonach płodowych zidentyfikowano obecność bakterii komensalnych lub ich materiału genetycznego. Wśród drobnoustrojów obecnych we krwi pępowinowej wyizolowano bakterie należące do rodzajów: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* oraz *Propionibacterium*. W badaniach poświęconych kolonizacji łożyska przez bakterie o charakterze probiotycznym zidentyfikowano DNA należące do bifidobakterii oraz *L. rhamnosus* (Bearfield i wsp., 2002; Satokari i wsp., 2009; Jiménez i wsp., 2005). Badania te dowodzą, że dziecko posiada kontakt z mikroorganizmami jeszcze przed narodzeniem, co umożliwia tak wczesną kolonizację.

Do najważniejszych czynników wpływających na kształtowanie mikrobiomu dziecka zalicza się jednak rodzaj porodu (Bäckhed i wsp., 2015; Azad i wsp., 2016; Cerdó i wsp., 2017). Podczas porodu siłami natury dziecko ma kontakt z mikroorganizmami zasiedlającymi drogi rodne oraz przewód pokarmowy rodzącej kobiety. Wśród drobnoustrojów matczynych zidentyfikować można m.in. bakterie należące do *Lactobacillaceae* oraz *Prevotella* (Nuriel-Ohayon i wsp., 2016; Milani i wsp., 2017). W przypadku porodu drogą cięcia cesarskiego dominującymi mikroorganizmami kolonizującymi ciało rodzącego się dziecka są drobnoustroje kolonizujące skórę matki oraz mikroorganizmy pochodzące z otaczającego środowiska, w tym mikroorganizmy szpitalne (Dominguez-Bello i wsp., 2010; Pandey i wsp., 2012; Kulas i wsp., 2013). Mikrobiota jelitowa dzieci urodzonych drogą cięcia cesarskiego charakteryzuje się większą częstotliwością występowania w jej składzie bakterii z rodzaju *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* oraz *Propionibacterium*. Dodatkowo wykazuje mniejsze zróżnicowanie gatunkowe oraz rzadsze występowanie bakterii należących do *Bifidobacterium* oraz *Bacteroides* niż w przypadku mikrobioty jelitowej pochodzącej od dzieci urodzonych siłami natury (Jańczewska i Domańska-Popadiuk, 2014; Milani i wsp., 2017).

Elementem wpływającym na kształtowanie mikrobioty dziecka po porodzie jest kontakt „skóra do skóry” z rodzicem (Hendricks-Muñoz i wsp., 2015). Wśród wielu korzyści płynących z wczesnego kontaktu noworodka z rodzicem, m.in. redukcji stresu, wczesnej stymulacji karmienia piersią, dochodzi także aspekt związany z kolonizacją organizmu dziecka przez drobnoustroje zasiedlające organizm opiekuna (Guala i wsp., 2017). Optymalną sytuacją jest ciągły kontakt matki i dziecka po porodzie, trwający nieprzerwanie minimum dwie godziny. Mówi o tym Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 sierpnia 2018 r. w sprawie standardu organizacyjnego opieki okołoporodowej: *bezpośrednio po urodzeniu należy umożliwić dziecku nieprzerwany kontakt z matką „skóra do skóry”, trwający dwie godziny po porodzie. W tym czasie należy zachęcać matkę do rozpoznania momentu, kiedy dziecko jest gotowe do ssania piersi, a także obserwować matkę i dziecko, kontrolując cechy dobrego przystawienia i pozycji przy piersi, a w razie potrzeby zaoferować pomoc. Kontakt ten może być przerwany wyłącznie w sytuacji wystąpienia zagrożenia życia lub zdrowia matki lub noworodka, odnotowanego*

w dokumentacji medycznej (Dz.U. 2018 poz. 1756). Badania przeprowadzone przez Hendricks-Muñoz i wsp. (2015) wykazały większą częstotliwość występowania korzystnych drobnoustrojów jamy ustnej: *Neisseria* oraz *Acinetobacter*, wśród mikroorganizmów zasiedlających jamę ustną dzieci przedwcześnie urodzonych, które doświadczyły kontaktu „skóra do skóry” po porodzie, w stosunku do grupy dzieci, które nie miały takiej możliwości.

Kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na skład mikrobioty organizmu dziecka jest sposób karmienia. Pokarm jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na skład mikrobiomu jelitowego jako źródło znaczącej ilości mikroorganizmów (Martín i wsp., 2003; Martín i wsp., 2007; Li i wsp., 2017). Mleko kobiece zawiera liczne szczepy z rodzaju *Bifidobacterium*, pałeczki kwasu mlekowego, a także czynniki wspomagające drobnoustroje, korzystnie modulujące skład mikrobioty jelitowej dziecka (Isolauri, 2012). Okres noworodkowy i wczesnodziecięcy jest szczególnie intensywnym czasem w odniesieniu do kolonizacji organizmu dziecka przez drobnoustroje. Badania wykazały różnice w składzie mikrobioty jelitowej dzieci karmionych piersią w stosunku do dzieci karmionych mieszanką mlekozastępczą. Profil mikrobiologiczny przewodu pokarmowego dzieci żywionych wyłącznie mlekiem kobiecym wykazuje większy udział drobnoustrojów należących do *Lactobacillaceae* oraz *Bifidobacteriaceae* oraz niższy poziom potencjalnych patogenów w porównaniu do dzieci karmionych mlekiem modyfikowanym. Równocześnie przewód pokarmowy dzieci żywionych mlekiem kobiecym zawiera wąskie spektrum bakterii Gram-dodatnich (Rinne i wsp. 2005; Bezirtzoglou, i wsp., 2011). W okresie rozszerzania diety dziecka karmionego piersią zwiększa się różnorodność gatunkowa mikrobioty jelitowej (Favier i wsp., 2002). W odróżnieniu od dzieci karmionych piersią dzieci żywione preparatami mlekozastępczymi charakteryzują się bardziej zróżnicowanym mikrobiomem jelitowym, w którym dominują bakterie należące do *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, a także enterokoki, enterobakterie i bakterie z rodzaju *Atopobium* (Milani i wsp., 2017; van den Elsen i wsp., 2019). Dostarczanie drobnoustrojów o potencjalnie probiotycznym charakterze pochodzących z mleka kobiecego ma szczególne znaczenie w przypadku dzieci urodzonych drogą cięcia cesarskiego (Matsumiva i wsp., 2002). Badania przeprowadzone przez Martín i wsp. (2012)

wskazują na skuteczną kolonizację organizmu dziecka bakteriami pochodzącymi ze środowiska mleka kobiecego. Porównanie składu mikrobiomu mleka kobiecego oraz mikrobioty jelitowej dzieci karmionych piersią pozwoliło na zidentyfikowanie tych samych rodzajów bakterii w obu materiałach. Badania przeprowadzone przez Martín i wsp. (2007), polegające na analizie profilu mikrobiologicznego kału niemowląt, mleka kobiecego oraz wymazów z pochwy matki, wykazały większe podobieństwo profilu mikrobiologicznego odchodów dziecka do profilu mikrobiologicznego próbek mleka kobiecego w porównaniu z drobnoustrojami zidentyfikowanymi w wymazach z pochwy matki (Martín i wsp., 2007).

Z uwagi na liczne właściwości prozdrowotne mleka kobiecego jest ono pierwszym wyborem w żywieniu noworodków i niemowląt. Znaczenie mleka kobiecego jest podkreślane szczególnie w żywieniu dzieci przedwcześnie urodzonych. W przypadku porodu przedwczesnego mogą nastąpić trudności w karmieniu piersią ze strony organizmu matki. Najlepszym rozwiązaniem w tej sytuacji jest korzystanie z mleka dawczyń pochodzącego z banków mleka kobiecego. Niestety pasteryzacja, której podlega mleko kobiece, zanim zostanie podane pacjentom oddziałów neonatologicznych, wpływa na redukcję nie tylko potencjalnych mikroorganizmów patogennych, ale także mikrobioty komensalnej mleka kobiecego (Wesołowska i wsp., 2019). W badaniach przeprowadzonych przez Landers i Updegrave (2010) w 93% próbek poddanych procesowi pasteryzacji nie zidentyfikowano wzrostu drobnoustrojów rutynowo zasiedlających środowisko mleka kobiecego. Poddanie mleka kobiecego działaniu wysokiej temperatury podczas procesu pasteryzacji wpływa również na obniżenie biodostępności niektórych składników odżywczych i bioaktywnych (Arslanoglu i wsp., 2010). Wykazano, że część witamin i minerałów zawartych w mleku kobiecym, takich jak witamina A, B2, D, E, biotyna, witamina B12 oraz cynk, nie ulegają degradacji podczas procesu pasteryzacji. Z kolei zawartość witaminy C, B6 oraz kwasu foliowego ulega zmniejszeniu. Analiza danych przeprowadzona przez Colaizy (2021) potwierdza spadek wartości energetycznej o 2,8%–2,9%, a także spadek całkowitej zawartości tłuszczu od 6,2% do 8,9%, równocześnie nie obserwując zmian w zawartości białka oraz laktozy. Obecnie prowadzone są badania nad innymi sposobami utrwalania mleka kobiecego, np. za pomocą

ogrzewania mikrofalowego oraz wysokich ciśnień hydrostatycznych. Wyniki badań z zastosowaniem mikrofalii dają obiecujące wyniki, wskazując na zachowanie składników mleka kobiecego, takich jak: kwasy tłuszczowe, nadtlenki lipidów oraz  $\alpha$ -laktoalbumina, na poziomie zbliżonym do tego, jaki obserwowany jest w mleku niepoddanemu obróbce (Martysiak-Żurowska i wsp., 2022). W prowadzonych doświadczeniach wykazano również wyższy poziom laktoferyny, immunoglobulin sIgA oraz witaminy C, a także większą aktywność przeciwutleniającą w mleku kobiecym poddanemu działaniu mikrofalii niż konwencjonalnej metodzie pasteryzacji mleka kobiecego (Martysiak-Żurowska i wsp., 2022). Innym sposobem utrwalania mleka kobiecego może być poddawanie go działaniu wysokich ciśnień hydrostatycznych. Prowadzone badania wskazują, że zamierzony efekt utrwalenia produktu, jakim jest mleko kobiece, oraz osiągnięcie wymaganej czystości mikrobiologicznej można osiągnąć w krótszym czasie niż w przypadku stosowania konwencjonalnej pasteryzacji (Malinowska-Pańczyk i wsp., 2019). Dodatkowo poddanie mleka kobiecego procesowi ciśnieniowania wiąże się z mniejszymi stratami składników bioaktywnych, takich jak: adipokiny, czynnik wzrostu, laktoferyna, przeciwciała IgG (Wesołowska i wsp., 2018). Chociaż nowe metody utrwalania mleka kobiecego mogą wiązać się z mniejszymi stratami wartości odżywczej, to jednak w dalszym ciągu nakierowane są na redukcję mikrobioty mleka kobiecego, w tym także mikroorganizmów o potencjalnie probiotycznych właściwościach.

## 2 Cel pracy

Zebrana literatura oraz przedstawione wiadomości dotyczące bakterii z rodzaju *Lactobacillaceae* potwierdzają ich korzystny, prozdrowotny wpływ na stan zdrowia rozwijającego się dziecka. Według doniesień naukowych źródłem bakterii należących do *Lactobacillaceae* może być mleko kobiece. Przeprowadzone do tej pory badania wskazują na niejednorodność występowania omawianych drobnoustrojów w składzie mleka kobiecego. Na skład mikrobiologiczny mleka kobiecego mogą wpływać czynniki, tj. uwarunkowania osobnicze, czas trwania laktacji, czynniki okołoporodowe, a także biologicznie uwarunkowane różnice i predyspozycje genetyczne poszczególnych społeczności (Gomez-Gallego i wsp. 2016; Garcia-Mantrana i wsp., 2017). Z racji dowodów naukowych potwierdzających korzystny wpływ bakterii z rodziny *Lactobacillaceae* na stan zdrowia dziecka celem pracy było pogłębienie wiedzy na temat występowania omawianych drobnoustrojów w mleku kobiecym w populacji polskich kobiet karmiących piersią. Dodatkowym aspektem pracy było określenie właściwości bakterii należących do *Lactobacillaceae* wyizolowanych z mleka kobiecego oraz możliwości ich praktycznego wykorzystania. Bakterie te, charakteryzujące się naturalnym pochodzeniem, wydają się być odpowiednim materiałem, który w przyszłości posłużyć może do wzbogacania mleka kobiecego w szczepy o charakterze probiotycznym. Takie zastosowanie może okazać się szczególnie użyteczne w przypadku dzieci karmionych mieszankami mleklozastępczymi lub mlekiem pochodzącym z banków mleka kobiecego.

## 2.1 Hipotezy badawcze

Na podstawie analizy dostępnej literatury oraz zagadnień związanych z mikrobiotą mleka kobiecego, jak również potrzebą przeanalizowania statusu mikrobiologicznego mleka kobiecego pochodzącego od polskich kobiet w okresie laktacji, przedstawiono następujące hipotezy badawcze:

- Mleko kobiece pochodzące od polskich kobiet karmiących piersią jest źródłem bakterii należących do *Lactobacillaceae*.
- Szczepy bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowane z mleka kobiecego, są źródłem metabolitów postbiotycznych o działaniu cytotoksycznym w stosunku do komórek nowotworu piersi MCF-7.
- Szczepy bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowane z mleka kobiecego, charakteryzują się zróżnicowaną antybiotykoopornością.
- Szczepy bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowane z mleka kobiecego, charakteryzują się dobrą przeżywalnością w środowisku pasteryzowanego mleka kobiecego pochodzącego od dawczyń, przechowywanego w warunkach chłodniczych i zamrażalniczych, pozwalającą na wykorzystanie ich jako suplementu mleka kobiecego.
- Kompozycja oligosacharydów zawartych w mleku kobiecym uzależniona jest od mikrobioty mleka kobiecego.

## 2.2 Cel ogólny

Na podstawie postawionych hipotez sformułowano cel ogólny, jak i cele szczegółowe. Celem ogólnym było określenie częstości występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym, w populacji polskich kobiet karmiących piersią oraz scharakteryzowanie czynników środowiskowych oraz matczyńskich mogących mieć wpływ na jakość mikrobiologiczną mleka kobiecego.

## 2.3 Cele szczegółowe

Oprócz celu ogólnego sformułowano cele szczegółowe koncentrujące się na charakterystyce właściwości zarówno mleka kobiecego, jak i szczepów bakteryjnych należących do *Lactobacillaceae* wyizolowanych z próbek mleka kobiecego włączonych do badań. Określono następujące cele szczegółowe niniejszej pracy:

- Charakterystyka badanej populacji kobiet na podstawie kwestionariusza.
- Ocena składu mleka pod względem zawartości makroskładników.
- Ocena zawartości ogólnej liczby mezofilnych drobnoustrojów tlenowych w próbkach mleka kobiecego oraz różnorodności mikrobiologicznej próbek poddanych badaniu.
- Ocena występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w populacji polskich kobiet karmiących piersią.
- Charakterystyka wybranych właściwości bakterii należących do *Lactobacillaceae* wyizolowanych z mleka kobiecego: wpływu na komórki nowotworu piersi MCF-7 oraz antybiotykoodporności.
- Ocena przeżywalności wyizolowanych szczepów bakteryjnych w środowisku pasteryzowanego mleka kobiecego, przechowywanego w warunkach chłodniczych oraz zamrażalniczych.
- Ocena zawartości oligosacharydów w próbkach mleka kobiecego przekazanych do badań, w tym porównanie zawartości HMO w grupie próbek dodatnich pod względem występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* oraz negatywnych pod względem omawianej cechy.



## 3 Materiały

### 3.1 Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły 63 próbki mleka kobiecego pobrane od 63 kobiet karmiących piersią, które wyraziły chęć udziału w badaniu. Rekrutacja odbywała się za pomocą portali internetowych, mediów społecznościowych oraz przy okazji spotkań dotyczących karmienia piersią. Wszystkie osoby, które zgłosiły się do udziału w badaniu, wzięły w nim udział. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy o numerze KB921/2018. Kobiety biorące udział w badaniu zostały poinformowane o celu oraz przebiegu badań. Wszystkie uczestniczki zostały poproszone o wyrażenie pisemnej zgody na udział w badaniu. Dane wrażliwe pozyskane w badaniu zostały objęte klauzulą poufności zgodnie z obowiązującym systemem RODO zapewniającym ochronę danych wrażliwych. Tytuł niniejszej pracy został zmodyfikowany w trakcie trwania badań ze względu na zmiany dotyczące nomenklatury omawianych drobnoustrojów. Z uwagi na pierwotny zamysł badania różnych szczepów bakterii należących do ówczesnego rodzaju *Lactobacillus* zdecydowano o zmianie tytułu w ten sposób, aby w dalszym ciągu odnosił się do omawianych mikroorganizmów, określając je wspólną nazwą. W ten sposób zdecydowano o odniesieniu się do rodziny *Lactobacillaceae*.

Próbki mleka kobiecego pobierano w terminie od października 2020 roku do sierpnia 2021 roku. Materiał badawczy obejmował próbki pochodzące od kobiet będących na różnych etapach laktacji. Materiał pobierano w godzinach porannych z zachowaniem zasad higieny. W celu bezpiecznego pobrania próbek mleka kobiecego zastosowano laktator klasy szpitalnej (Symphony, Medela Polska Sp. z o.o.), posiadający w swoim wyposażeniu jednorazowe, sterylne zestawy do odciągania pokarmu. Próbki mleka pobierane były do kompatybilnych z laktatorem, sterylnych pojemników (Medela), a następnie część próbek umieszczana była w probówkach zapewniających warunki beztlenowe podczas transportu. W czasie transportu próbki mleka utrzymywano w warunkach chłodniczych. Materiał badawczy pobierany był w domu osób zgłaszających się do

udziału, po wcześniejszym umówieniu wizyty. Instruktaż odciągania pokarmu miał miejsce na bieżąco, podczas sesji odciągania pokarmu. Na etapie rekrutacji do badań nie zdecydowano o limitowaniu grup zgłaszających się kobiet ze względu na stopień zaawansowania laktacji. Wynikało to z ograniczonej liczby kobiet zgłaszających się do badań, chęci przebadania jak największej liczby próbek, a także oddania naturalnego stanu niemodyfikowanego przez planowanie liczebności poszczególnych grup.

Przedmiotem poszczególnych badań były próbki mleka kobiecego pozyskane na pierwszym etapie oraz izolaty bakterii należące do *Lactobacillaceae* wyizolowane z próbek mleka kobiecego pobranych od kobiet deklarujących chęć udziału w badaniach. Pobrany materiał traktowany był priorytetowo w analizie mikrobiologicznej. Na tym etapie badań przeanalizowano wszystkie 63 próbki mleka kobiecego.

Kolejne rodzaje analiz uwzględnione w pracy doktorskiej wykonywane były w zależności od możliwości ilościowych zebranego materiału. W badaniach dotyczących składu mleka kobiecego przebadano łącznie 56 próbek (w tym 14 dodatnich pod kątem obecności bakterii należących do *Lactobacillaceae*), analizie oligosacharydów występujących w składzie mleka kobiecego poddano 44 próbki (w tym 10 dodatnich pod kątem obecności bakterii należących do *Lactobacillaceae*).

Badania skoncentrowane na właściwościach szczepów bakteryjnych należących do *Lactobacillaceae* przeprowadzono na 10 z 15 szczepów należących do *Lactobacillaceae* zidentyfikowanych w przebadanych próbkach mleka kobiecego. W przypadku 5 szczepów nie udało się ich wyizolować po procesie identyfikacji.

W niniejszej pracy wykorzystano również pasteryzowane mleko kobiece pochodzące z Banku Mleka Kobiecego w Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym im. L. Rydygiera w Toruniu (łącznie ok. 450 ml). Porcje mleka, pochodzące od dawczyń mleka kobiecego, stanowiły środowisko dla szczepów bakteryjnych poddawanych badaniu przeżywalności w czasie przechowywania w warunkach obniżonej temperatury.

## 3.2 Odczynniki mikrobiologiczne

### 3.2.1 Podłoża mikrobiologiczne

Podłoża wykorzystane w badaniach to podłoża dostępne komercyjnie (podłoża sypkie oraz gotowe podłoża na płytkach Petriego), a także modyfikacje podłoży przygotowane w oparciu o dane literaturowe.

- **Agar MRS** – granulat, Merck
- **Bulion MRS** – granulat, Merck
- **Agar mleczny** – granulat, Merck
- **Podłoże Mueller-Hinton** – podłoże agarowe stałe, Graso

### 3.2.2 Krążki do oznaczania wrażliwości na antybiotyki

Oxoid

- **Ampicylina AMP** 10 µg (βlaktamy, penicyliny)
- **Erytromycyna E** 15 µg (makrolidy)
- **Gentamycyna CN** 10 µg (aminoglikozydy)
- **Kanamycyna K** 30 µg (aminoglikozydy)
- **Tetracyklina TE** 30 µg (tetracykliny)
- **Wankomycyna VA** 30 µg (antybiotyki peptydowe – glikopeptydy)
- **Jałowe krążki antybiotykowe**

### 3.2.3 ETESTY

bioMerieux

- **Amoksycylina AC** 0,016–256 µg/mL
- **Ampicylina AM** 0,016–256 µg/mL
- **Benzylopenicylina PG** 0,002–32 µg/mL
- **Klindamycyna CM** 0,016–256 µg/mL
- **Imipenem IP** 0,002–32 µg/mL

### 3.2.4 Pozostałe odczynniki wykorzystane w badaniach mikrobiologicznych

- **Wankomycyna**, Sigma Aldrich
- **L-Cysteina**, Merck
- **CaCO<sub>3</sub>**, Avantor

- **Płyn do rozcieńczeń**, BTL
- **Zestaw do barwienia Grama**, BTL
- **Roztwór nadtlenku wodoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, Chempur
- **Paski wskaźnikowe** – (Anaer indicator) do atmosfery beztlenowej, bioMérieux
- **Saszetki do inkubacji w warunkach beztlenowych** – GENbox anaer, bioMérieux
- **Microbank**® – Mix, zestaw fiolek z perełkami zanurzonymi w płynie konserwującym do przechowywania szczepów bakterii i grzybów w stanie zamrożenia, Biomaxima

### 3.3 Odczynniki do identyfikacji molekularnej

- **Zestaw do izolacji DNA z komórek bakterii** Genomic Mini AX Bacteria+ (Spin), A&A Biotechnology
- **PCR Mix** Gotowa mieszanina do PCR Taq, 2 x stężona.  
Skład mieszaniny PCR Mix: polimeraza DNA Taq 0,1 U/μL, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, dNTPs 0,5 mM każdego z DTP, barwnik, bufor obciążający A&A Biotechnology,  
**GeneRuler 100 bp DNA Ladder** – wzorzec wielkości DNA
- **Agaroza**, Promega
- **Midori Green**, Genetics
- **Bufor TBE**, EURx

### 3.4 Odczynniki i materiały do badania cytotoksyczności

- **linia komórkowa MCF-7** – (ATCC-HTB-22) Breast Adenocarcinoma; Human (Homo sapiens), Poziom BSL: ATCC BSL 1, LGC Standard
- **Medium – Minimal Essential Medium Eagle**, Sigma-Aldrich
- **FBS** – płodowa surowica bydlęca, Capricorn Scientific
- **Roztwór antybiotyków Penicylina-Streptomycyna** – Penicylina: 10,000 U/mL Streptomycyna: 10 mg/mL, Sartorius
- **Trypsyna-EDTA** – Sigma Life Science, Sartorius
- **PBS** – bufor fosforanowy, Sigma Aldrich
- **Barwnik MTT**, AppliChem
- **DMSO**, Chempur

- **Insulina**, Roztwór ludzkiej rekombinowanej insuliny 4 mg/mL, Gibco
- **Filtry strzykawkowe**, Bionovo

### 3.5 Odczynniki do oznaczania oligosacharydów

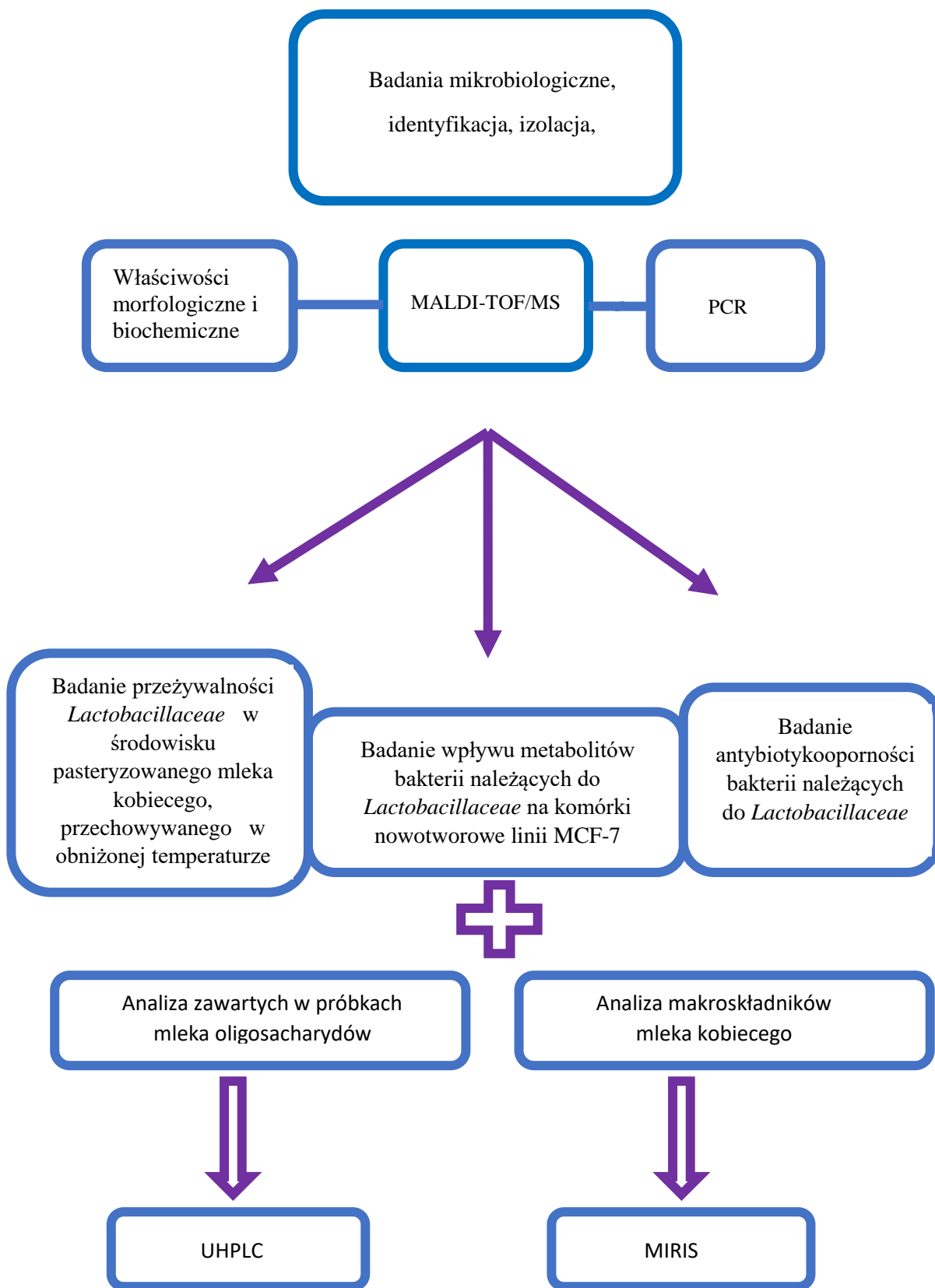
- **Acetonitryl**, Merck
- **Etanol**, Avantor

## 4 Aparatura i wyposażenie

- lodówki (4°C), zamrażarki (-20°C), Pol-Eko Aparatura
- zamrażarki głębokiego mrożenia (-80°C), New Brunswick Eppendorf
- miniwirówki laboratoryjne, Eppendorf
- waga analityczna o dokładności odczytu 0,0001 g oraz 0,01 g
- wirówka laboratoryjna z chłodzeniem, Eppendorf
- MALDI-TOF, Bruker
- termocykler, Biorad
- czytnik produktów PCR Image Gel Doc XR+, BioRad Molecular
- komory laminarne, Thermo Scientific
- laktator, Medela
- łaźnia wodna, Grant Instruments
- analizator składu mleka kobiecego, MIRIS HMA
- autoklaw, Enbio Technology
- czytnik ELISA, Biogenet
- inkubatory, Binder
- licznik komórek, Merck
- mikroskop odwrócony, Nikon
- mikroskop, Leica
- pipetor, Brand
- pipety laboratoryjne, Eppendorf, Brand
- sonifikator, MIRIS HMA
- spektrofotometr masowy Q Exactive™ Focus quadrupole-Orbitrap ((LC-Q-Orbitrap-MS/MS, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)
- system odparowywania próżniowego RapidVap (Labconco, Polska)
- system Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific™, Dionex, San Jose, CA, USA)
- wytrząsarka laboratoryjna, Heidolph
- wytrząsarka, Heidolph

## 5 Metody badawcze

Ogólny schemat postępowania z badanym materiałem przedstawiono na rysunku 2. Próbki mleka kobiecego poddane zostały badaniom mikrobiologicznym, których celem była ocena składu mikrobiologicznego mleka kobiecego. W następnym etapie badań kolonie potencjalnie należące do *Lactobacillaceae* identyfikowane były za pomocą takich metod, jak ocena właściwości morfologicznych i biochemicznych, identyfikacja z zastosowaniem techniki MALDI-IVD oraz metod molekularnych (PCR). W kolejnym kroku przeprowadzono badania dotyczące właściwości szczepów, wyizolowanych ze środowiska mleka kobiecego, bakterii należących do *Lactobacillaceae*. Określono przeżywalność bakterii w środowisku pasteryzowanego mleka kobiecego, przechowywanego w obniżonej temperaturze, wpływ metabolitów bakterii należących do *Lactobacillaceae* na komórki nowotworowe linii MCF-7 oraz wrażliwość omawianych drobnoustrojów względem antybiotyków. Dodatkowo próbki mleka kobiecego poddano analizie w celu scharakteryzowania zawartych w nich oligosacharydów oraz analizie składu pod względem makroskładników.



Rysunek 2. Schemat postępowania z próbkami mleka kobiecego uwzględniający stosowane techniki badawcze



## 5.1 Badanie ankietowe – charakterystyka kobiet biorących udział w badaniu

W celu scharakteryzowania badanej populacji oraz poznania czynników mogących oddziaływać na skład mikrobiologiczny mleka kobiecego przeprowadzono badanie ankietowe. Kwestionariusz przygotowany na potrzeby badań i zaakceptowany przez lokalną Komisję Bioetyczną przekazywany był wszystkim kobietom biorącym udział w badaniu. W celu zachowania anonimowości podczas uzupełniania ankiety wszystkie egzemplarze zostały zakodowane numerem porządkowym. Ankieta złożona była z pytań dotyczących matki, dziecka karmionego piersią, czynników okołoporodowych oraz środowiskowych. Kwestionariusz został zamieszczony jako załącznik niniejszej pracy.

## 5.2 Badanie makroskładników mleka kobiecego

W badaniu wykorzystano analizator składu mleka kobiecego MIRIS HMA (Miris AB, Uppsala, Szwecja). Analizy wykonano we współpracy z Bankiem Mleka Kobiecego w Wojewódzkim Szpitalu Zespolonym im. L. Rydygiera w Toruniu. Każda próbka mleka bezpośrednio przed analizą składu była podgrzana do temperatury 40 °C w łaźni wodnej i poddawana homogenizacji za pomocą sonifikatora (Sonifikator MIRIS [1,5 s/mL]). Analizy wykonywano w trzech powtórzeniach. Analizator składu mleka pozwala na określenie zawartości makroskładników w badanym materiale w odniesieniu do:

- tłuszczu ogółem (g/100 mL),
- białka całkowitego (g/100 mL),
- białka odżywczego (g/100 mL),
- suchej masy (g/100 mL),
- węglowodanów (g/100 mL),
- wartości energetycznej (kcal/100 mL).

Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z instrukcją urządzenia i zaleceniami producenta. Ocena składu mleka kobiecego przeprowadzana przez analizator opiera się na spektrofotometrii w paśmie podczerwieni. Analizator posiada źródło promieniowania podczerwonego oraz detektor, który odbiera

promieniowanie przenoszone przez ciecz. Filtry w detektorze pochłaniają skorelowane z nimi promieniowanie w paśmie średniej podczerwieni. Następnie analizowane są ilości promieniowania pochłoniętego przez określone grupy funkcyjne poszczególnych makroskładników. Absorbancja dla substancji/grupy funkcyjnej o określonej długości fali jest proporcjonalna do stężenia danego makroskładnika w analizowanej próbce mleka kobiecego. Detekcja ta pozwala na analizę zawartości węglowodanów, tłuszczu i białka. Długości fal charakterystyczne dla poszczególnych komponentów mleka kobiecego zastosowane w analizatorze wynoszą:

- 5,7  $\mu\text{m}$  – dla grup karbonylowych wiązań estrowych i glicerydów (przy oznaczaniu zawartości tłuszczu w badanej próbce),
- 6,5  $\mu\text{m}$  – dla drugorzędowych grup amidowych wiązań peptydowych (przy oznaczaniu zawartości białka całkowitego),
- 9,6  $\mu\text{m}$  – dla grup hydroksylowych (przy oznaczaniu zawartości węglowodanów).

Analizator składu mleka mierzy całkowitą zawartość węglowodanów łącznie z laktozą i oligosacharydami. Białko całkowite obliczane jest w oparciu o całkowitą ilość azotu w analizowanej próbce, co uwzględnia również niebiałkowe związki azotu. Z tego względu obliczana jest również zawartość białka odżywczego, która odzwierciedla rzeczywistą zawartość białka. Analizator przelicza zawartość azotu na zawartość białka, wykorzystując współczynnik 6,38, a także współczynnik 0,8, do obliczania zawartości białka odżywczego z białka ogólnego. Uzyskane wyniki służą następnie do obliczania wartości energetycznej oraz zawartości suchej masy w badanej próbce (Zhu i wsp., 2017). Badanie składu mleka kobiecego za pomocą analizatora MIRIS HMA trwa około 1 minuty.

Zakres pomiarowy analizatora:

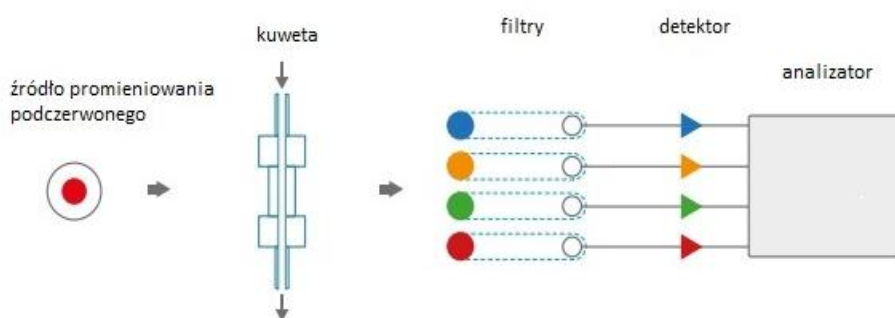
- tłuszcz 0,6–4 g/100 mL,
- białko ogólne 0,8–3 g/100 mL,
- białko odżywcze 0,6–2,4 g/100 mL,
- węglowodany 6,6–8,7 g/100 mL

(HMA User MAnnual).

Analizę przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Zdjęcie 1. przedstawia analizator składu mleka kobiecego MIRIS. Na rysunku 3. zobrazowano schematycznie zasadę działania urządzenia.



Zdjęcie 1. MIRIS – analizator składu mleka kobiecego



Rysunek 3. Schemat działania analizatora MIRIS (modyfikacja na podstawie instrukcji producenta)

### 5.3 Badanie mikrobiologiczne w kierunku oznaczenia zawartości ogólnej liczby tlenowych bakterii mezofilnych

Ilościowe oznaczanie ogólnej liczby mezofilnych bakterii tlenowych w próbkach mleka kobiecego zostało przeprowadzone z wykorzystaniem agaru mlecznego (Merck). Badany materiał posiewano metodą posiewu wgłębnego po wykonaniu szeregu dziesięciokrotnych rozcieńczeń. Badanie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Inkubację płytek prowadzono w temperaturze 30 °C

w warunkach tlenowych przez  $72\pm 2$  godziny. Po tym czasie wyrosłe kolonie zliczono, a zawartość mezofilnych bakterii tlenowych obliczono i wyrażano jako jednostki tworzące kolonie (jtk) na mL mleka kobiecego.

Równocześnie wykonywano posiew powierzchniowy na podłoże dla ogólnej liczby mezofilnych drobnoustrojów tlenowych w celu identyfikacji mikroorganizmów zawartych w badanej próbce mleka kobiecego. Badanie to wykonywano, posiewając 0,1 mL kolejnych rozcieńczeń badanego materiału na przygotowane płytki agarowe. Czas i temperatura inkubacji była taka sama jak w przypadku posiewu wgłębnego. Wyrosłe kolonie analizowano następnie przy użyciu spektrometrii mas z wykorzystaniem urządzenia MALDI Biotyper (Bruker).

#### 5.4 Badanie mikrobiologiczne w kierunku wykrycia obecności bakterii należących do *Lactobacillaceae*

##### 5.4.1 Posiew mikrobiologiczny

W celu wykrycia obecności oraz wyizolowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* wykorzystano posiew na podłoże stałe De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) oraz jego modyfikacje. Zastosowano następujące modyfikacje pożywki MRS:

- pożywka MRS z dodatkiem wankomycyny (10 mg/L) (Colombo i wsp., 2014),
- pożywka MRS z L-cysteiną (0,5 g/L) (Soto i wsp., 2014),
- pożywka MRS z dodatkiem 3% CaCO<sub>3</sub> (Meiling Jiang i wsp., 2016)
- standardowa wersja pożywki MRS bez żadnych dodatków.

Badany materiał oraz jego dziesięciokrotne rozcieńczenia w ilości 0,1 mL rozprowadzano na płytkach Petriego z podłożem MRS w dwóch powtórzeniach. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C w warunkach beztlenowych przez  $72\pm 2$  godziny. Po inkubacji wyrosłe kolonie bakteryjne poddawane były dalszej analizie.

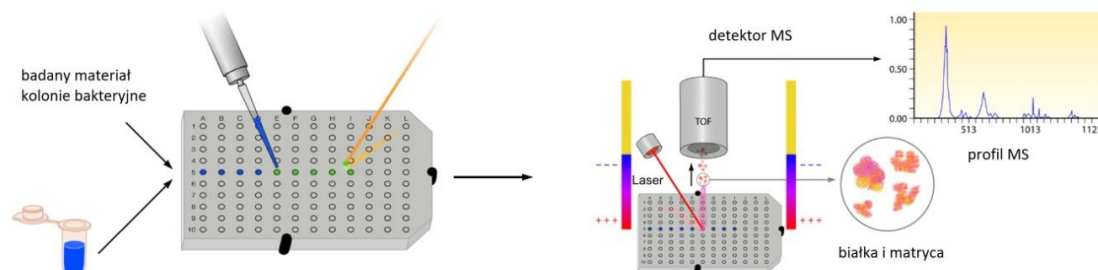
#### 5.4.2 Ocena makroskopowa

Wyroste kolonie bakteryjne były kwalifikowane jako potencjalnie przynależne do *Lactobacillaceae* na podstawie cech morfologicznych, takich jak: wielkość, kształt, brzeg, powierzchnia, barwa, przejrzystość.

#### 5.4.3 Identyfikacja z zastosowaniem spektrometrii mas MALDI-TOF

Kolonie zakwalifikowane do dalszej analizy poddano identyfikacji metodą spektrofotometrii mas przy użyciu urządzenia MALDI Biotyper IVD (Bruker). Badania przeprowadzono we współpracy z Zakładem Diagnostyki Mikrobiologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu. Identyfikację przeprowadzono zgodnie z metodyką spektrometrii mas MALDI-TOF/MS oraz wytycznymi producenta.

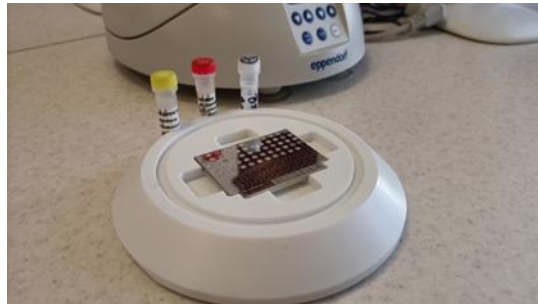
Identyfikacja drobnoustrojów przeprowadzana przez urządzenie MALDI opiera się na analizie ekspresji białek bakteryjnych i porównaniu ich z referencyjną bazą danych, która jest sukcesywnie uaktualniana przez producenta. Na podstawie różnic w masie poszczególnych białek i peptydów, a co za tym idzie, czasu przelotu, spektrometr mas oblicza masę cząsteczkową. Powstające widmo mas charakteryzuje się określonym wzorcem dla danego drobnoustroju. Jest ono nazywane „molekularnym odciskiem palca”, charakterystycznym dla danego mikroorganizmu. Kryteria identyfikacji analizowanych drobnoustrojów za pomocą MALDI-TOF/MS obejmowały: wartość wskaźnika interpretacji  $\geq 2$  – wynik o wysokiej pewności, zakres pomiędzy 1,99 a 1,70 – identyfikacja o niższej



Rysunek 4. Procedura diagnostyki z zastosowaniem MALDI-TOF/MS (modyfikacja na podstawie Clark i wsp., 2013)

pewności, wartość mniejsza niż 1,70 – brak identyfikacji analizowanych drobnoustrojów. Rysunek 4. przedstawia zasadę działania MALDI-TOF/MS.

Podczas badania materiał pobrany z badanych kolonii bakteryjnych nanoszono punktowo na stalową płytkę (zdjęcie 2.), a następnie pokrywano go matrycą. Po wysuszeniu płytki w temperaturze pokojowej płytkę poddawano analizie w komorze urządzenia, którą przedstawia zdjęcie 3. Po identyfikacji szczepy bakteryjne zidentyfikowane jako należące do *Lactobacillaceae* izolowano, namnożono i kolekcjonowano w kriobankach. Rysunek 5. przedstawia schemat postępowania.



Zdjęcie 2. Stalowa płytką, na którą nanoszony jest badany materiał



Zdjęcie 3. Komora urządzenia MALDI-TOF/MS



Zdjęcie 4. MALDI-TOF/MS



Rysunek 5. Schemat dotyczący procedury identyfikacji bakterii za pomocą MALDI-TOF/MS

#### 5.4.4 Identyfikacja genetyczna za pomocą techniki biologii molekularnej

Dodatkowym etapem identyfikacji wyizolowanych szczepów było zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

##### ➤ Izolacja bakteryjnego DNA

Szczepy bakteryjne inkubowano przez 18 godzin w bulionie MRS (Merck) w 37°C. Po inkubacji 1,5 ml każdej próbki poddawano wirowaniu przy 6000 obr./min, w temp. 4°C przez 10 minut. Do izolacji DNA bakteryjnego zastosowano zestaw do izolacji genomowego DNA Genomic Mini AX Bacteria + Spin (A&A Biotechnology). Izolację genomowego DNA wykonano zgodnie z zaleceniami producenta zestawu do izolacji.

- 1 mL nocnej hodowli bakteryjnej poddano wirowaniu.
- Po odrzuceniu supernatantu zawiesinę bakteryjną zawieszono w 200 µL buforu zawiesinowego BS. Dodawano także 10 µL lizozymu oraz 5 µL mutanolizyny.
- Po wymieszaniu prowadzono 20-minutową inkubację w temperaturze 50°C.
- Następnie dodano 200 µL roztworu do lizy L1.4 oraz 20 µl Proteinyzy K.

- Po zworteksowaniu próbki ponownie prowadzono inkubację przez 10 minut w temperaturze 50°C.
- W kolejnym etapie próbki poddano worteksowaniu, a następnie odwirowywano je w czasie 10 s przy 8000–14 000 x g.
- Otrzymany supernatant umieszczono wewnątrz kolumny Mini AX Spin włożonej do 2 ml próbek. Całość wirowano przez 30–60 s przy obrotach 8000–14 000 x g.
- Po wirowaniu kolumny Mini AX Spin przeniesiono do nowych 2-mililitrowych próbek i dodano do ich wnętrza 600 µL roztworu do przemywania W1. Całość poddano wirowaniu, a następnie przeniesiono kolumny do kolejnych czystych 2-mililitrowych próbek.
- Kolejnym krokiem było dodanie 500 µL drugiego roztworu do płukania W2 i odwirowanie zawartości. Do elucji posłużyły 1,5-mililitrowe próbki, do których na dno dodano po 5 µL buforu neutralizującego N. Kolumnienki przeniesiono do próbek elucyjnych i dodano do nich po 100–150 µL buforu do elucji E.
- Po upływie 2 minut kolumny wraz z próbkami poddano wirowaniu przez 30-60 s przy 14 000–21 000 x g. Po tym etapie kolumny usunięto, a próbki z oczyszczonym DNA bakteryjnym przechowywano w temperaturze –20°C.

#### ➤ Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Otrzymane DNA bakteryjne stosowano jako matrycę do amplifikacji fragmentów genów

W reakcji PCR użyto następujących starterów:

- R16-1 (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3'),
- LbLMA1-rev (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3')

Użyte startery, zaprojektowane na podstawie danych literaturowych dotyczących badań przeprowadzonych przez Dubernet i wsp. (2002), zostały pozyskane z firmy Oligo.pl. W badaniach wykorzystano termocykler BioRad C1000 Touch (Biorad).

W reakcji PCR zastosowano następujące warunki:

- denaturacja początkowa 95°C, 5 min
- 30 cykli składających się z:



- denaturacji 95°C, 30 s
  - hybrydyzacji 55°C, 30 s
  - elongacji 72°C, 30 s
  - wydłużanie końcowe przeprowadzono w 72°C przez 7 min
  - schładzanie produktów PCR do 4°C
- Elektroforeza oraz odczyt
- Analiza uzyskanych amplikonów została przeprowadzona z zastosowaniem rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym w buforze 1xTBE (EURx) wybarwionym Midori green umożliwiającym wizualizację w świetle UV. Po elektroforezie produkty PCR wizualizowano w świetle UV czytnika produktów PCR BioRad Molecular Image Gel Doc XR+. Do określenia wielkości otrzymanych produktów reakcji PCR zastosowano marker wielkości DNA GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Zdjęcia 5. i 6. przedstawiają aparaturę wykorzystaną w badaniach biologii molekularnej.



Zdjęcie 5. Termocykler, BioRad



Zdjęcie 6. Czytnik produktów PCR

#### 5.4.5 Ocena mikroskopowa - barwienie metodą Grama

Z wyizolowanego materiału przygotowano preparaty mikroskopowe. Przynależność do badanych drobnoustrojów do grupy bakterii Gram-dodatnich potwierdzono, wykonując barwienie Grama. Na utrwalony preparat mikroskopowy nanoszono fiolet krystaliczny, płyn Lugola, aceton oraz fuksynę zasadową. Ocenę barwienia przeprowadzono przy użyciu mikroskopu Leica w powiększeniu 100 x.

#### 5.4.6 Ocena właściwości biochemicznych

W ocenie właściwości biochemicznych badanych drobnoustrojów analizowano zdolność wyizolowanych drobnoustrojów do wytwarzania katalazy. W badaniu tym zastosowano 3% roztwór nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ). W celu przeprowadzenia badania do kilku kropeł hodowli badanych mikroorganizmów, naniesionych na szkiełko, dodawano kilka kropeł roztworu nadtlenku wodoru. Wynik badania zależny był od wytwarzania tlenu podczas reakcji katalizowanej przez enzym – katalazę. Dla bakterii należących do *Lactobacillaceae* wynik reakcji był ujemny. Nie dochodziło do obfitego wytwarzania tlenu po kontakcie nadtlenku wodoru z wyizolowanymi drobnoustrojami.

## 5.5 Oznaczenie wrażliwości na wybrane antybiotyki

### 5.5.1 Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki z wykorzystaniem krążków antybiotykowych

Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki wyizolowanych szczepów bakteryjnych przeprowadzono z zastosowaniem metody dyfuzji krążkowej. W badaniu wykorzystano krążki antybiotykowe dostępne komercyjnie. W tabeli 4. przedstawiono wykaz zastosowanych krążków antybiotykowych.

Tabela 4. Wykaz zastosowanych krążków antybiotykowych

Antybiotyk	Skrót	Stężenie	Rodzaj antybiotyku
Ampicylina	AMP	10 µg	βlaktamy, penicyliny
Wankomycyna	VA	30 µg	antybiotyki peptydowe (glikopeptydy)
Gentamycyna	CN	10 µg	aminoglikozydy
Kanamycyna	K	30 µg	aminoglikozydy
Erytromycyna	E	15 µg	makrolidy
Tetracyklina	TE	30 µg	tetracykliny

Badaniu poddano 10 szczepów bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowanych z mleka kobiecego na wcześniejszych etapach badań. Przebadano oddziaływanie sześciu antybiotyków w postaci komercyjnie dostępnych krążków nasączonych substancją czynną. W badaniu zastosowano zarówno podłoże MRS, standardową pożywkę przeznaczoną do wzrostu bakterii należących do *Lactobacillaceae*, jak i podłoże rekomendowane do oznaczania antybiotykoodporności drobnoustrojów Mueller-Hinton. Podłoże MRS wybrano ze względu na wysokie wymagania odżywcze bakterii kwasu mlekowego. W klasycznej wersji badania antybiotykoodporności na podłożu Mueller-Hinton wzrost bakterii należących do *Lactobacillaceae* nie zawsze jest w pełni zadowalający. Płytki Petriego z przygotowanym podłożem MRS oraz podłożem Mueller-Hinton były inokulowane zawiesiną komórek bakteryjnych o wartości 1 w skali McFarlanda. Zawiesina bakteryjna rozprowadzana była w trzech płaszczyznach na powierzchni agaru. Krążki antybiotykowe nanoszono sterylnie na powierzchnię podłoża mikrobiologicznego,

umieszczając pojedyncze krążki w równych odległościach od siebie. Badanie wykonywano w dwóch powtórzeniach. Kontrolę negatywną stanowiła reakcja na krążki pozbawione antybiotyku, nasączone roztworem NaCl. Płytki pozostawiono w temperaturze pokojowej przez godzinę, a następnie umieszczono w inkubatorze o temperaturze 37°C, zapewniając warunki beztlenowe. Inkubacja prowadzona była przez 48 godzin (Mayrhofer i wsp., 2008). Po zakończonej inkubacji mierzono średnicę stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów, podając wynik w milimetrach [mm]. W pomiarze uwzględniano średnicę zastosowanych krążków antybiotykowych. Wyniki interpretowano zgodnie z wartościami granicznymi uwzględnionymi przez Sharma i wsp. (2017). Podziału stopnia wrażliwości badanych szczepów dokonano w następujący sposób:

- odporne (R) – izolaty ze strefą zahamowania wzrostu mniejszą lub równą 14 mm,
- wrażliwe (S) – izolaty o średnicy strefy zahamowania wzrostu większej lub równej 20 mm,
- pośrednie (M) – izolaty, których strefa zahamowania wzrostu mieściła się w przedziale między 15 a 19 mm.

Badanie wykonano w dwóch powtórzeniach.

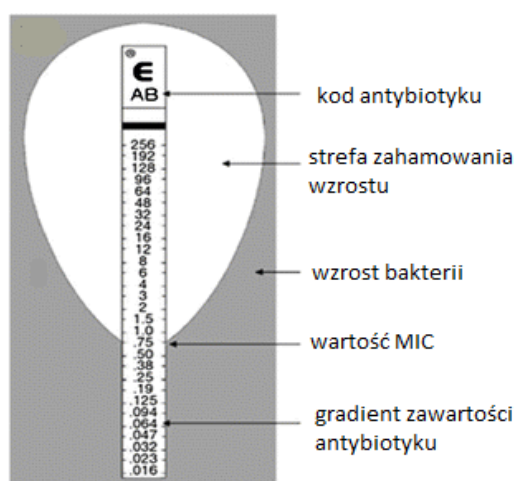
#### 5.5.2 Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego MIC – metoda z wykorzystaniem ETEST-ów

Test wrażliwości na antybiotyki wykonano z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych testów paskowych (Etest, bioMerieux), których istotą działania jest wskazanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) określonego chemioterapeutyku wpływającego na badany szczep bakteryjny. Wartość wyrażana jest w µg/ml. Płytki Petriego z przygotowanym podłożem MRS były inokulowane zawiesiną komórek bakteryjnych o wartości 1 w skali McFarlanda. Zawiesina bakteryjna rozprowadzana była na powierzchni agaru w trzech płaszczyznach, tak aby uzyskać jednolity wzrost na powierzchni pożywki. Kolejnym etapem było umieszczenie na powierzchni przygotowanych płytek testów paskowych nasączonych gradientowo badanym antybiotykiem. Płytki inkubowano w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Po okresie inkubacji odczytywano wynik poprzez wskazanie miejsca przecięcia strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów z paskiem nasączonym

antybiotykiem (Danielsen i Wind, 2003). Paski zawierają skalę ze wskazaniem poziomu nasączenia danego miejsca chemioterapeutykami. Badanie wykonano powtórnie z wykorzystaniem pożywki Mueller-Hinton, standardowo wykorzystywanej do oznaczania lekowrażliwości szczepów bakteryjnych. W porównaniu z pożywką MRS uzyskano zdecydowanie słabszy wzrost bakterii. Paski testowe użyte w badaniu wyszczególnione zostały w tabeli 5. Na rysunku 6. przedstawiono schemat oznaczania wartości MIC na płycie agarowej.

Tabela 5. Paski testowe zastosowane w badaniu dotyczącym wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego MIC

Antybiotyk	Oznaczenie	Zakres
Amoksycylina	AC	0,016–256 µg/mL
Ampicylina	AM	0,016–256 µg/mL
Benzylopenicylina	PG	0,002–32 µg/mL
Klindamycyna	CM	0,016–256 µg/mL
Imipenem	IP	0,002–32 µg/mL



Rysunek 6. Oznaczania MIC za pomocą ETESST-ów (modyfikacja na podstawie Schumacher i wsp., 2018)

## 5.6 Ocena wpływu metabolitów postbiotycznych pochodzących ze szczepów bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowanych z mleka kobiecego, na komórki nowotworu piersi linii MCF-7 w warunkach in vitro

Bakterie należące do *Lactobacillaceae*, jako przedstawiciele bakterii kwasu mlekowego (LAB), są zdolne do produkcji metabolitów postbiotycznych (Moradi i wsp.,

2021). W badaniu oceniono cytotoksyczność metabolitów postbiotycznych, zawartych w supernatancie pochodzącym z hodowli szczepów bakteryjnych należących do *Lactobacillaceae* wyizolowanych z próbek mleka kobiecego, względem komórek nowotworowych MCF-7. Zdjęcie 7. przedstawia omawiane komórki widziane pod mikroskopem.



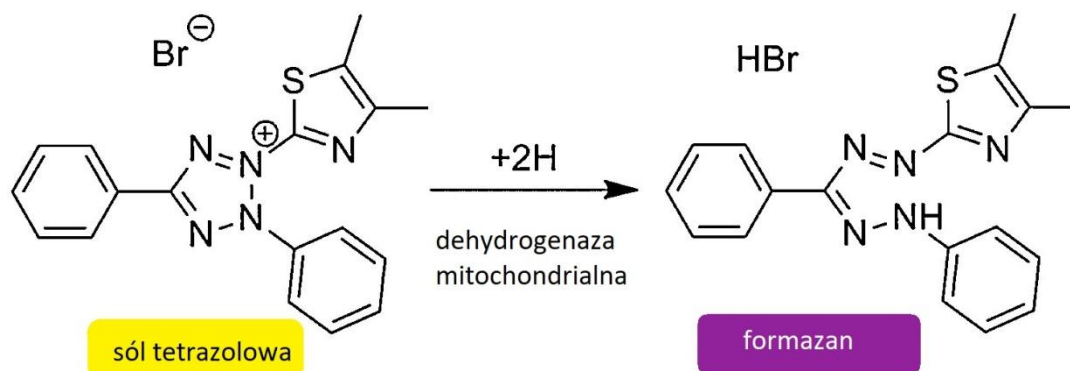
Zdjęcie 7. Komórki MCF-7 w hodowli (modyfikacja na podstawie Ninomiya i wsp., 2013)

Cytotoksyczność określona została na podstawie przeprowadzonych testów MTT. Szczepy bakteryjne biorące udział w badaniu namnażano początkowo na podłożu MRS (Merck, Niemcy). W czasie 24 godzin przed eksperymentem zawieszono je i namnażano w bulionie MRS w temperaturze 37°C. Po inkubacji bulion MRS poddawany był wirowaniu przy obrotach 10 000 x g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Supernatant uzyskany po odwirowaniu został zebrany, a jego odczyn pH doprowadzono do wartości pH fizjologicznego w zakresie 7,2–7,4 za pomocą 5M wodorotlenku sodu. Uzyskane porcje supernatantu filtrowano z zastosowaniem filtrów strzykawkowych o wielkości porów 0,22 µm. Komórki nowotworu piersi MCF-7 (ATCC-HTB-22, Breast Adenocarcinoma; Human) zostały zakupione w firmie LGC Standards Sp. z o.o. Komórki hodowano w inkubatorze o temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. W hodowli zastosowano medium wzbogacone o 10% (v/v) bydlęcą surowicę płodową (FCS), insulinę w ilości 0,1 mg/ml oraz roztwór antybiotyków penicylina-streptomycyna w ilości 100 IU/mL. Zawiesinę komórek MCF-7 uzyskiwano z hodowli będącej w logarytmicznej fazie wzrostu.

Komórki nowotworu piersi linii MCF-7 wysiewano na trzy mikromianowane płytki 96-dołkowe w ilości  $1 \times 10^5$  komórek na 1 ml medium. Płytki zawierające zawiesinę

komórek inkubowane były następnie w temperaturze 37°C przez 24 godziny w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Po upływie 24 godzin do posianych wcześniej komórek dodawano rozcieńczenia supernatantów zawierających metabolity postbiotyczne badanych szczepów bakteryjnych. Zastosowano stężenia supernatantów w przedziale od 50% do 3,13% (v/v). Płytki zawierające komórki nowotworu piersi MCF-7 oraz odpowiednie rozcieńczenia zastosowanych supernatantów bakteryjnych inkubowano w temperaturze 37 °C oraz dostępie 5% CO<sub>2</sub> przez okres 24, 48 oraz 72 godzin. Pierwsza płytka została poddana testowi MTT po upływie 24 godzin. Do dołków płytki dodano 20 µL roztworu bromku 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenyłu (MTT) o stężeniu 5 mg/mL PBS. Po dodaniu odczynnika płytkę inkubowano przez 4 godziny w inkubatorze o temperaturze 37°C oraz 5% udziale CO<sub>2</sub>. Po upływie wyznaczonego czasu zawartość dołków była usuwana próżniowo. W celu uwidocznienia reakcji barwnej, będącej istotą testu MTT, do dołków dodawano po 100 µl sulfotlenku dimetylu (DMSO). Kontrolę stanowiły komórki niepoddane działaniu supernatantu. Badaniu poddano również płynną pożywkę MRS bez dodatku supernatantu bakteryjnego. Kolejne płytki zawierające komórki nowotworu piersi MCF-7 inkubowane razem z metabolitami bakteryjnymi poddawano testowi MTT po 48 i 72 godzinach. Działanie testu oparte jest na enzymatycznej redukcji jasno zabarwionej soli tetrazoliowej do formazanu, który charakteryzuje się intensywnym fioletowoniebieskim zabarwieniem. Schemat reakcji przedstawiono na rysunku 7. Intensywność zmian można odczytać za pomocą spektrofotometru. Absorbancja wyznaczana była na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego przy użyciu czytnika płytek Elisa. Uzyskana wartość absorbancji jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek (Grwaela i wsp., 2018). Odczytu dokonywano przy długości fali 492 nm (Zhang i wsp., 2015). Wartość IC<sub>50</sub> dla poszczególnych supernatantów określano na podstawie żywotności komórek mierzonej jako stosunek absorbancji danego układu (danego stężenia objętościowego supernatantu) do średniej absorbancji kontroli. Wyznaczony wynik określał procent objętości supernatantu powodujący śmierć 50% komórek nowotworowych użytych w badaniu (Chuah i wsp., 2019). Ciemnofioletowa barwa w przypadku kontroli świadczy o aktywności metabolicznej obecnych w niej komórek. W dołkach zawierających materiał o działaniu cytotoksycznym barwa jest mniej intensywna lub jej brak. Wartości absorbancji w pomiarze

spektrofotometrycznym poniżej 50% aktywności świadczą o efekcie cytotoksycznym badanej substancji (Twarużek i wsp., 2018).



Rysunek 7. Przekształcenie żółtej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej do nierozpuszczalnych ciemnofioletowych kryształków formazanu dokonywane w wyniku działania dehydrogenazy mitochondrialnej (modyfikacja na podstawie Grell i wsp., 2018)

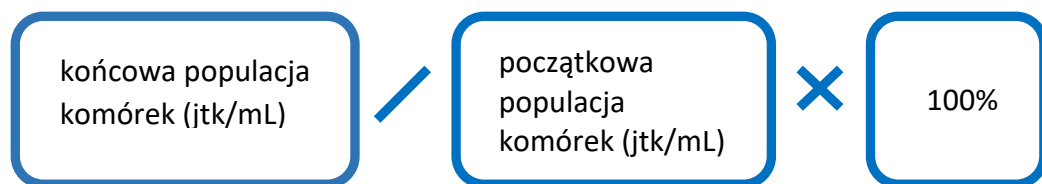
## 5.7 Ocena przeżywalności bakterii należących do *Lactobacillaceae* w warunkach obniżonej temperatury

Porcje mleka kobycego poddane pasteryzacji (próbki mleka kobycego pozyskane z banku mleka kobycego), o objętości 20 mL, zaszczepiano bakteriami należącymi do *Lactobacillaceae*, uzyskanymi na wcześniejszym etapie badań. Szczepy bakteryjne zostały pobrane z podłoża MRS, na którym wzrastały, zawieszono je w jałowym płynie fizjologicznym i dwukrotnie przemyto, odwirowując za każdym razem supernatant przy obrotach 1300 rpm w czasie 6 minut. Badanie ilościowe, wykonane bezpośrednio po zaszczepieniu mleka, wykazało zawartość wprowadzonych drobnoustrojów na poziomie  $10^7$ – $10^8$  jtk/mL. Dokonano również posiewu mleka przepasteryzowanego, niezaszczepionego bakteriami, w celu wykazania początkowego obciążenia mikrobiologicznego materiału. Kolejnym etapem badań był podział zaszczepionych bakteriami porcji mleka na mniejsze objętości (2,5 mL) i umieszczenie ich w określonych warunkach temperaturowych (4°C dla badania w warunkach chłodniczych oraz –20°C dla przechowywania w warunkach zamrażalniczych). Przygotowane porcje mleka kobycego były sukcesywnie poddawane mikrobiologicznym badaniom ilościowym w celu wykazania zmian w populacji bakterii należących do *Lactobacillaceae* zasiedlających dane środowisko. Dla przechowywania



chłodniczego w temperaturze 4°C posiewy wykonano po 24, 48, 72, 96 godzinach przechowywania. Dla przechowywania próbek zaszczepionego mleka kobiecego w temperaturze zamrażalniczej (-20°C) posiewy wykonywano po 7, 30, 60 oraz 90 dniach. Badania przeprowadzono, wykonując posiew wgłębnym z wykorzystaniem podłoża mikrobiologicznego MRS (Merck). Każdy posiew mikrobiologiczny wykonany został w dwóch powtórzeniach. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 72 godziny w atmosferze beztlenowej. Warunki beztlenowe uzyskano za pomocą saszetek Genbox (bioMerieux).

Wskaźnik przeżywalności mikroorganizmów obliczono zgodnie ze wzorem:



Wskaźnik przeżywalności (P) po określonym czasie przechowywania w warunkach chłodniczych oraz zamrażalniczych wyznaczano jako % liczby żywych komórek bakteryjnych, oznaczonych jako C (warunki chłodnicze) lub Z (warunki zamrażalnicze), w stosunku do liczby komórek żywych przed okresem przechowywania, bezpośrednio po zaszczepieniu badanego materiału.

Liczby żywych komórek bakteryjnych przechowywanych w warunkach chłodniczych określono odpowiednio jako:

C<sub>0</sub> – liczba żywych komórek bakteryjnych bezpośrednio po zaszczepieniu porcji mleka kobiecego poddanego wcześniej pasteryzacji [jtk/mL],

C<sub>1</sub> – liczba żywych komórek bakteryjnych po 24 godzinach przechowywania w temperaturze +4°C [jtk/mL],

C<sub>2</sub> – liczba żywych komórek bakteryjnych po 48 godzinach przechowywania w temperaturze +4°C [jtk/mL],

C<sub>3</sub> – liczba żywych komórek bakteryjnych po 72 godzinach przechowywania w temperaturze +4°C [jtk/mL],

C<sub>4</sub> – liczba żywych komórek bakteryjnych po 96 godzinach przechowywania w temperaturze +4°C [jtk/mL].

Liczby żywych komórek bakteryjnych przechowywanych w warunkach zamrażalniczych określono odpowiednio jako:

$Z_0$  – liczba żywych komórek bakteryjnych bezpośrednio po zaszczepieniu porcji mleka kobiecego poddanego wcześniej pasteryzacji [jtk/mL],

$Z_1$  – liczba żywych komórek bakteryjnych po 30 dniach przechowywania w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  [jtk/mL],

$Z_2$  – liczba żywych komórek bakteryjnych po 60 dniach przechowywania w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  [jtk/mL],

$Z_3$  – liczba żywych komórek bakteryjnych po 90 dniach przechowywania w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  [jtk/mL].

Przykładowo:

$$P = (Z_1/Z_0) \times 100\%$$

Odstępy czasowe uwzględnione w trakcie badania przeżywalności bakterii podczas przechowywania chłodniczego wyznaczono, opierając się na czasie przydatności do spożycia mleka kobiecego przechowywanego chłodniczo. Według protokołu *The Academy of Breastfeeding Medicine* czas przechowywania mleka kobiecego w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  powinien wynosić optymalnie do 4 dni. Dla przechowywania w warunkach zamrażalniczych optymalny czas wynosi do 6 miesięcy (ABM Protocol, 2017).

## 5.8 Analiza oligosacharydów mleka kobiecego

Badanie zawartości oligosacharydów w próbkach mleka kobiecego zostało wykonane we współpracy z dr hab. inż. Dorotą Martysiak-Żurowską oraz dr hab. inż. Barbarą Kusznierewicz z Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej. Zawartość oligosacharydów w próbkach mleka kobiecego zbadana została zgodnie z metodą opisaną przez Remoroza i wsp. (2018) oraz Jarzynka i wsp. (2022). Badaniu poddano 44 próbki mleka kobiecego, były to próbki, w przypadku których ilość pozyskanego materiału pozwalała na przeprowadzenie dodatkowych analiz. Wśród przebadanych próbek 10 było pozytywnych pod względem obecności bakterii należących do *Lactobacillaceae*.

W celu wykonania analizy HMO z badanych próbek usunięto tłuszcz oraz białko. Odtłuszczenie uzyskano poprzez ich odwirowanie (12 000 obr./min, w temp. 4°C, przez 15 min).

Górne frakcje, składające się głównie z tłuszczu, usunięto, a fazy wodne zebrano do oddzielnych fiolek. Do pozostałych frakcji z osadem dodano 1 ml 99,6% etanolu i po wymieszaniu próbki ponownie odwirowano. Białka wytrącono przez dodanie kolejnego 1 ml 99,6% etanolu do połączonego supernatantu, inkubację w temperaturze chłodniczej (4°C) przez noc, a następnie wirowanie przy 12 000 obr./min w temperaturze 4°C przez 15 min.

Zdekantowane płyny zawierające węglowodany odparowywano do sucha za pomocą systemu odparowywania próżniowego RapidVap (Labconco, Polska), a sacharydy w postaci sproszkowanej przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

Frakcje HMO zastosowano w postaci natywnej, niederywatyzowanej. Przed analizą przygotowywano roztwór sacharydów o stężeniu 20 mg/ml w roztworze acetonitryl : woda (50:50, v:v).

Po przygotowaniu próbki oligosacharydy zostały poddane analizie za pomocą ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (HRMS). W badaniu wykorzystano System Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific TM, Dionex, San Jose, CA, USA) sprzężony ze spektrometrem masowym Q Exactive TM Focus kwadrupol-Orbitrap (LC-Q-Orbitrap-MS/MS, Thermo Fisher Scientific, Brema, Niemcy) z podgrzewanym elektrorozpylaniem. Do analizy próbek zastosowano źródło jonizacji (HESI II). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie ACQUITY Glycoprotein BEH Amid (300 Å, 1,7 µm, 2,1 mm × 150 mm, Waters Corporation, Milford, MA, USA) utrzymywanej w temperaturze 25°C.

Faza ruchoma składała się z:

- A: 5 mmol/L mrówczanu amonu z 0,1% (v/v) kwasem mrówkowym w wodzie,
- B: 5 mmol/L mrówczanu amonu z 0,1% (v/v) kwasem mrówkowym w 90% acetonitrylu.

Program elucji przeprowadzono w następujący sposób:

- 2 min izokratyczny 95% B
- 5 min gradient liniowy do 80% B
- 30 min gradient liniowy od 80% do 50% B
- 3 min płukania kolumny gradientem liniowym od 50% do 2% B i równoważenia kolumny od 2% do 95% B w ciągu 5 min.

Czas akwizycji wynosił 45 minut, a faza ruchoma miała szybkość przepływu ok. 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Objętość wstrzyknięcia wynosiła 10  $\mu\text{L}$ . Jako wzorców w badaniu użyto komercyjnie dostępnych standardów oligosacharydów mleka, w tym izomery niefukozylowane, fukozylowane i sjalowane.

Detekcja elektrorozpylania MS została przeprowadzona w trybie detekcji dodatniej i ujemnej przy:

- napięciu źródła jonów ustawionym na  $\pm 3,5$  kV;
- temperaturze gazu suszącego  $350^{\circ}\text{C}$ ;
- skanowaniu od 200 do 2000 m/z;
- rozdzielczości 280 000;
- temperaturze kapilarnej  $250^{\circ}\text{C}$ .

Dodatkowo, zależnie od danych, parametry MS2 były następujące:

- zakres skanowania: 200–2000 m/z;
- rozdzielczość, 35 000;
- okienko izolacyjne 2,0 m/z (świeci: 1, 2).

Piki zidentyfikowano przez porównanie widm MS standardów (2'FL, 3'SL, 6'SL, DNF i LNT) oraz z danymi literaturowymi (Auer i wsp. 2021; Remoroza i wsp. 2018). Oznaczenie ilościowe HMO przeprowadzono z zewnętrznymi krzywymi kalibracyjnymi wygenerowanymi przez integrację obszarów pików MS wzorców odniesienia. Dla każdej próbki przeprowadzono dwie równoległe ekstrakcje i analizy. Aparaturę wykorzystaną podczas analiz przedstawia zdjęcie 8.

Zidentyfikowano i oznaczono ilościowo 19 następujących HMO:

- 2'-fukozylolaktoza (2'FL),
- 3'-fukozylolaktoza (3'FL),
- lakto-N-trioza (LN-Tri),
- galaktozylolaktoza (GL),
- 3'-sialilolaktoza (3'SL),

- 6'-sialilolaktoza (6'SL),
- difukozylolaktoza (DFL),
- lakto-N-neotetraoza (LNnT),
- lakto-N-tetraoza (LNT),
- lakto-N-fukopentaoza (LNFP),
- sialilakto-N-tetraoza b (LSTb),
- sialilakto-N-tetraoza c (LSTc),
- lakto-N-heksaoza (para-lakto-N-neoheksaoza LNH),
- difukozylo-lakto-N-tetraoza (DFLNT),
- difukozylolakto-N-heksaoza (DFLNH ),
- disialilolakto-N-tetraoza (DSLNT),
- trifukoparalakto-N-heksaoza (TFpLNH (TFpLNH a)),
- fukozylo-lakto-N-heksaoza (FLNH),
- fukodisialillakto-N-heksaoza (FDSLNH).



Zdjęcie 8. Aparatura badawcza – oznaczanie HMO (Politechnika Gdańska)

## 5.9 Analiza statystyczna

W analizie statystycznej zastosowano jednoczynnikowe analizy wpływu wielu zmiennych na zmienną dwustanową za pomocą metody regresji logistycznej. Wyniki przedstawiono w postaci wartości parametrów OR z 95-procentowym przedziałem ufności. W analizie przyjęto poziom istotności 0,05. A więc wszystkie wartości p poniżej 0,05 interpretowano jako świadczące o istotnych zależnościach.

Analizę wykonano w programie R, wersja 4.2.2. (R Core Team, 2022)

## 6 Wyniki

### 6.1 Charakterystyka badanej populacji na podstawie badania ankietowego

Równoległe z badaniami mikrobiologicznymi oraz analizą składu pobranych próbek mleka kobiecego przeprowadzono badanie ankietowe kobiet biorących udział w badaniu. Informacje uzyskane dzięki uzupełnieniu ankiety przez kobiety biorące udział w badaniu podsumowano w tabeli 6., gdzie uwzględniono dane dotyczące całej badanej populacji, jak i grup kobiet, w mleku których zidentyfikowano bakterie należące do *Lactobacillaceae* oraz kobiet, w mleku których nie zidentyfikowano omawianych drobnoustrojów. Średni wiek kobiet karmiących, których próbki mleka zostały włączone do badań, wynosił 31 lat, a średni wiek dzieci karmionych piersią 10,4 miesiąca. Średni wiek kobiet, w których mleku zidentyfikowano badane drobnoustroje, wyniósł 31,7 lat, a wiek karmionego piersią dziecka 9 miesięcy. Większość kobiet, biorących udział w badaniu, urodziła dziecko siłami natury (71,4%). Pozostałe kobiety poddane zostały cięciu cesarskiemu (28,6%). Wśród kobiet, w których mleku zidentyfikowano bakterie *Lactobacillaceae*, częściej dochodziło do porodu drogą cięcia cesarskiego (35,7%). Kobiety te częściej karmiły dzieci w tandemie (karmienie piersią zarówno młodszego, jak i starszego dziecka), a większa ich liczba mieszkała na obszarach wiejskich. Dzieci kobiet, w mleku których zidentyfikowano omawiane bakterie kwasu mlekowego, rzadziej były dokarmiane mlekiem modyfikowanym w porównaniu z dziećmi kobiet całej badanej populacji. W obu wyszczególnionych grupach (zarówno cała badana populacja, jak i grupa dodatnia pod kątem *Lactobacillaceae*) niewiele kobiet wykazywało aktywność zawodową (14,3%). W obu grupach porównywalny był również odsetek kobiet dotkniętych nadwagą bądź otyłością przed zajściem w ciążę. Po urodzeniu dziecka problem ten dotyczył w większym stopniu kobiet, w mleku których zidentyfikowano bakterie *Lactobacillaceae* (28,6%). Większość kobiet karmiących piersią w obu grupach stosowało dietę ogólną. Dietę wykluczającą określoną grupę żywności pochodzenia zwierzęcego (dieta wegańska, wegetariańska, semiwegetariańska) stosowało 6,3% wszystkich kobiet poddanych badaniu oraz 7,14% kobiet, których mleko było dodatnie pod kątem występowania *Lactobacillaceae*. W badaniu znalazły się również kobiety będące na diecie eliminacyjnej (12,7% v 14,3%) oraz niskowęglowodanowej

(4,8% v 7,14%). Za dietę eliminacyjną przyjęto dietę wykluczającą z jadłospisu określone produkty spożywcze, mogące wywołać alergię i nietolerancje pokarmowe.

Tabela 6. Charakterystyka badanej populacji na podstawie wypełnionych kwestionariuszy

Badana cecha	Średnia $\pm$ SD		
	dla całej badanej populacji N = 63	dla kobiet, w których mleku zidentyfikowano bakterie <i>Lactobacillaceae</i> N = 14	dla kobiet, w których mleku nie zidentyfikowano bakterii <i>Lactobacillaceae</i> N = 49
Wiek matki (lata)	31 $\pm$ 3,9	31,7 $\pm$ 4,4	31,1 $\pm$ 3,8
Liczba posiadanych dzieci	1,8	2,2	1,7
Wiek ciążowy w momencie urodzenia (tydzień)	39,4 $\pm$ 1,7	39,2 $\pm$ 2,4	39,5 $\pm$ 1,5
Częstotliwość karmienia piersią w ciągu 24 godz.	8,3 $\pm$ 3,8	9,4 $\pm$ 4,4	8,0 $\pm$ 3,5
<b>Aktywność zawodowa matki</b>	<b>N = 63</b>	<b>N = 14</b>	<b>N = 49</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Tak	14,3%	14,3%	14,3%
Nie	85,7%	85,7%	85,7%
<b>Miejsce zamieszkania</b>	<b>N = 63</b>	<b>N = 14</b>	<b>N = 49</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Miasto	77,8%	71,4%	81,6%
Wieś	22,2%	28,6%	18,4%
<b>Karmienie piersią w tandemie</b>	<b>N = 63</b>	<b>N = 14</b>	<b>N = 49</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Tak	9,5%	21,4%	6,1%
Nie	90,5%	78,6%	93,9%
<b>Rodzaj porodu</b>	<b>N = 63</b>	<b>N = 14</b>	<b>N = 49</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Siłami natury	71,4%	64,3%	71,4%
Cięcie cesarskie	28,6%	35,7%	28,6%

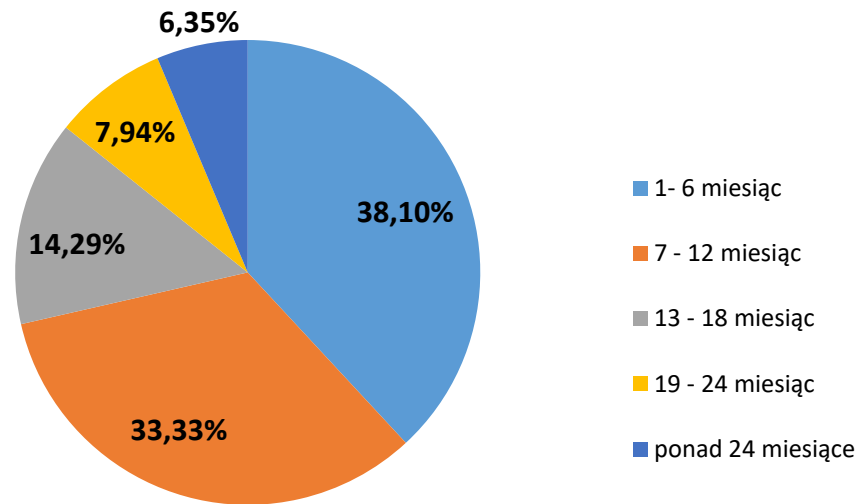
<b>Kontakt skóra do skóry</b>	<b>N = 63</b>	<b>N = 14</b>	<b>N = 49</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Tak	95,2%	92,8%	95,9%
Nie	4,8%	7,1%	4,1%
<b>Dokarmianie dziecka mlekiem modyfikowanym</b>	<b>N = 63</b>	<b>N = 14</b>	<b>N = 49</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Tak	39,7%	28,6%	42,9%
Nie	60,3%	71,4%	57,1%
<b>Nadwaga/otyłość matki przed ciążą</b>	<b>N = 63</b>	<b>N = 14</b>	<b>N = 49</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Tak	27%	28,6%	24,5%
Nie	73%	71,4%	75,5%
<b>Nadwaga/otyłość matki po urodzeniu dziecka</b>	<b>N = 63</b>	<b>N = 14</b>	<b>N = 49</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Tak	34,9%	42,9%	30,6%
Nie	65,1%	57,1%	69,4%
<b>Rodzaj diety stosowanej przez matkę</b>	<b>N = 63</b>	<b>N = 14</b>	<b>N = 49</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Ogólna	76,2%	71,43 %	77,55%
Eliminacyjna	12,7%	14,29%	12,24%
Niskowęglowodanowa	4,8%	7,14%	4,08%
Wegetariańska/semiwegetariańska/ wegańska	6,3%	7,14%	6,12%
<b>Badana cecha dziecka</b>	<b>N = 64</b>	<b>N = 15</b>	<b>N = 49</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Płeć żeńska	62,5%	46,7%	67,3%
Płeć męska	37,5%	53,3%	32,7%
Wiek dziecka (miesiące)	10,4 ±9,2	9,0 ±9,6	10,9 ±9,1

Wyniki przedstawiono jako średnią ±odchylenie standardowe lub wartość procentową

W badaniach wzięły udział kobiety na różnych etapach laktacji. Na wykresie 1. przedstawiono procentowy udział kobiet z poszczególnych przedziałów

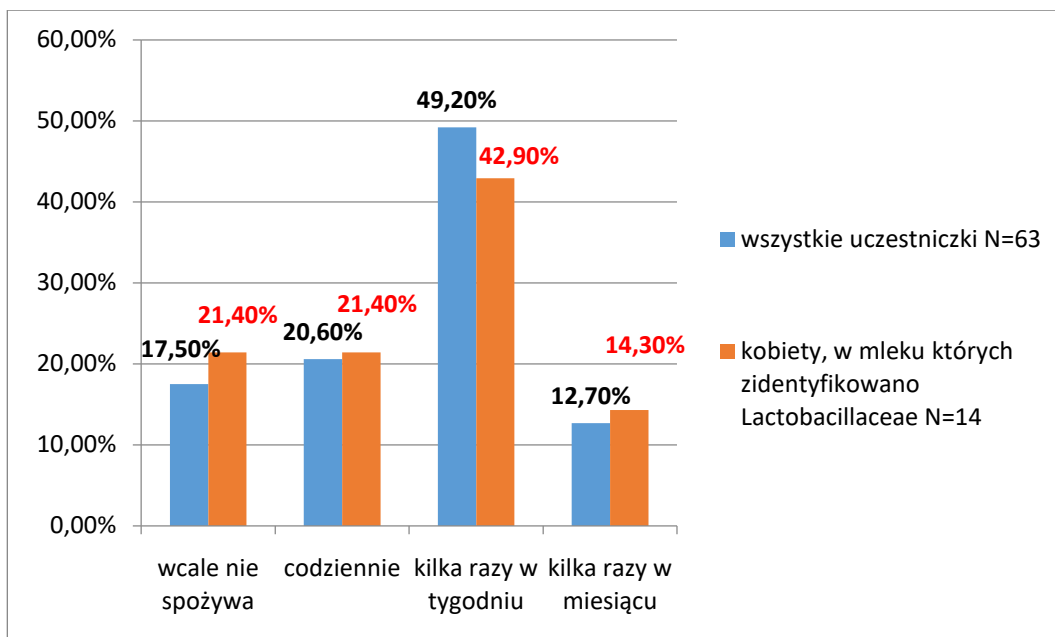


laktacji. Wśród kobiet, których próbki mleka kobiecego zostały przeanalizowane na potrzeby niniejszej pracy, dominowały kobiety karmiące dzieci od urodzenia do 12. miesiąca życia. Wśród przebadanych kobiet znalazły się również kobiety długo karmiące piersią (powyżej roku).

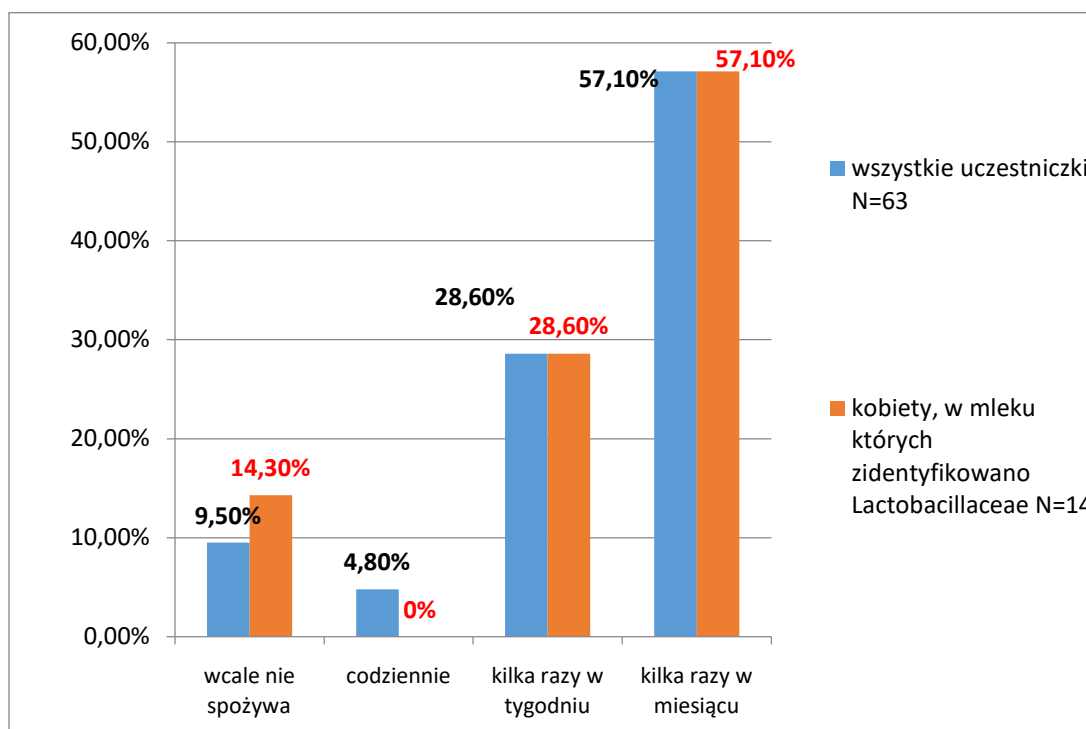


Wykres 1. Procentowy udział kobiet biorących udział w badaniu, będących na poszczególnych etapach laktacji.

Wykresy 2. oraz 3. zawierają informacje dotyczące nawyków żywieniowych kobiet biorących udział w badaniu, zarówno w odniesieniu do całej badanej populacji, jak i kobiet, w których mleku zidentyfikowano bakterie należące do *Lactobacillaceae*.



Wykres 2. Procentowa częstotliwość spożywania mlecznych produktów fermentowanych (np. kefir)



Wykres 3. Częstotliwość spożywania produktów kiszonych

Obie badane grupy charakteryzowały się podobnymi nawykami żywieniowymi dotyczącymi spożywania mlecznych produktów fermentowanych. Dominowało spożywanie produktów żywnościowych należących do tej grupy kilka razy w tygodniu.

Produkty kiszone były spożywane w obu grupach zdecydowanie rzadziej. Większość badanych spożywała je kilka razy w miesiącu. Produkty kiszone i fermentowane produkty mleczne mogą być źródłem bakterii probiotycznych dla organizmu dostarczanych w diecie. Na stan zdrowia mogą mieć wpływ nie tylko spożywane pokarmy, ale także stosowane leki oraz suplementy diety w postaci preparatów witaminowych czy probiotycznych. Tabela 7. zawiera informacje o przyjmowanych lekach i suplementach diety.

Tabela 7. Dane ankietowe dotyczące leków i suplementów przyjmowanych w okresie ciąży i laktacji przez kobiety biorące udział w badaniu

Rodzaj przyjmowanego leku lub suplementu diety	Cała badana populacja N = 63 (%)	Kobiety, których mleko zawierało <i>Lactobacillaceae</i> N = 14 (%)	Kobiety, których mleko nie zawierało <i>Lactobacillaceae</i> N = 49 (%)
antybiotyki podczas ciąży	15,87%	7,1%	18,4%
antybiotyki podczas laktacji	23,81%	28,6%	22,4%
probiotyki podczas ciąży	20,63%	21,4%	20,4%
probiotyki podczas laktacji	33,33%	35,7%	32,7%

Kobiety, których mleko zawierało zidentyfikowane bakterie należące do *Lactobacillaceae*, rzadziej przyjmowały antybiotyki w czasie ciąży, w porównaniu z ogółem badanej populacji. Odwrotna sytuacja dotyczyła okresu laktacji. Kobiety ze zidentyfikowanymi bakteriami należącymi do *Lactobacillaceae* częściej przyjmowały probiotyki zarówno w czasie ciąży, jak i trwania laktacji. Preparaty witaminowe były spożywane przez większość kobiet karmiących piersią zarówno w czasie ciąży, jak i w okresie karmienia piersią. Z racji dysproporcji liczbowej obu omawianych grup nie określano istotności statystycznej.

## 6.2 Badanie składu mleka kobiecego

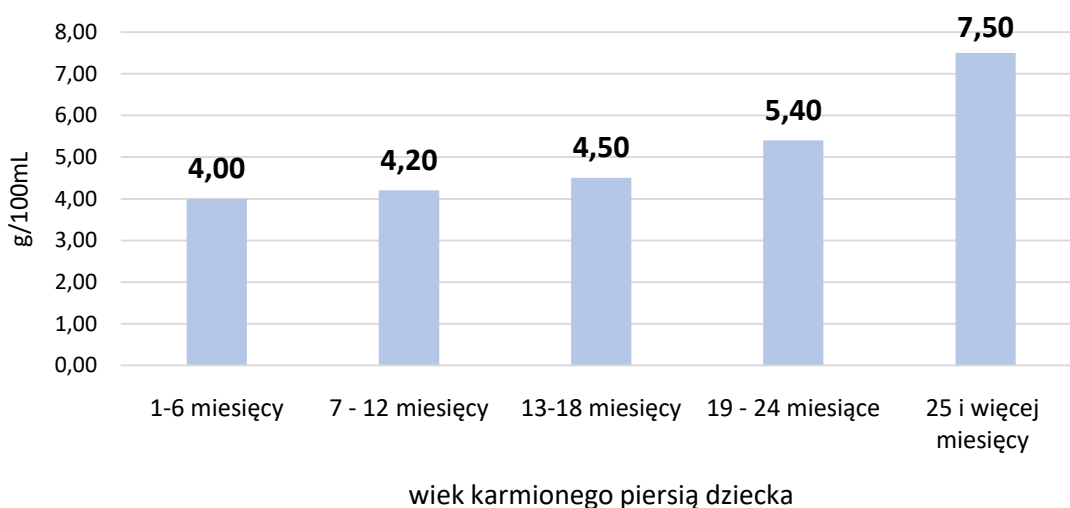
Próbki przeznaczone do badań zostały przeanalizowane pod kątem zawartości makroskładników. W przypadku badania dotyczącego składu mleka kobiecego przeanalizowano 56 próbek. Ograniczenie liczebności próbek mleka kobiecego, w stosunku do liczby wszystkich próbek włączonych do badań, związane było z ograniczeniami ilościowymi pobranego materiału. Niektóre z kobiet biorących udział w badaniu miały trudności z uzyskaniem wystarczającej ilości mleka i w tych przypadkach próbki te traktowano priorytetowo w badaniach mikrobiologicznych. Wśród próbek poddanych analizie składu mleka, w których zidentyfikowano bakterie należące do *Lactobacillaceae*, znalazło się 13 próbek. W tabeli 8. przedstawiono średnie wartości makroskładników dla wszystkich próbek oraz dla grupy próbek, w których zidentyfikowano bakterie należące do *Lactobacillaceae*. Obie badane grupy charakteryzują się zbliżonym składem pod względem makroskładników.

Tabela 8. Zawartość makroskładników oraz wartość energetyczna analizowanych próbek mleka kobiecego

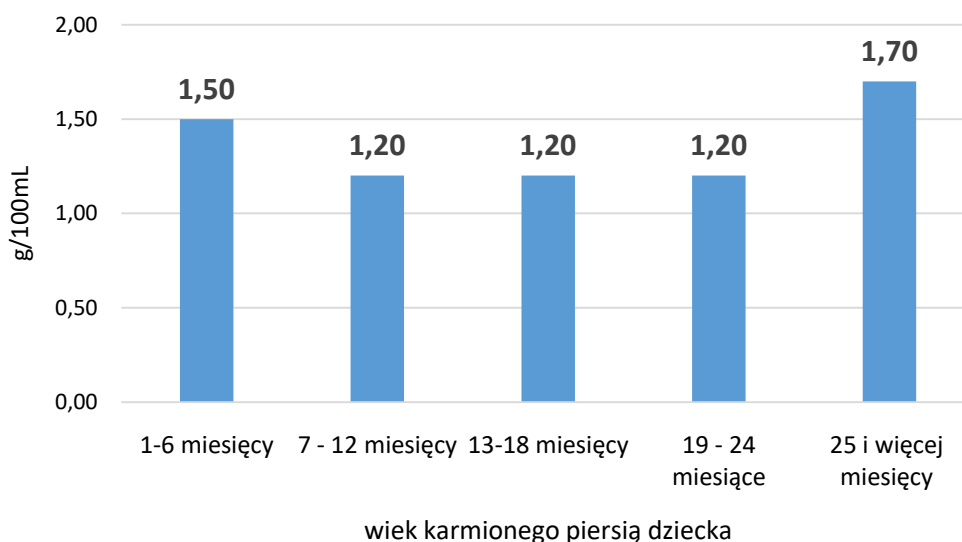
Oznaczany parametr	Wszystkie badane	Próbki mleka, w których
	próbki mleka kobiecego N = 56	zidentyfikowano bakterie należące do <i>Lactobacillaceae</i> N = 13
tłuszcz ogólny (g/100 mL)	4,4 ±1,7 3,9	4,7 ±1,4 4,5
białko całkowite (g/100 mL)	1,3 ±0,5 1,2	1,3 ±0,3 1,3
białko odżywcze (g/100mL)	1,1 ±0,4 1,0	1,1 ±0,2 1,0
węglowodany (g/100 mL)	7,9 ±0,6 8,1	8 ±0,3 8,0
sucha masa (g/100 mL)	13,9 ±2,0 13,5	14,5 ±1,6 14,3
wartość energetyczna (kcal/100 mL)	78,7 ±16,9 74,0	81,8 ±13,3 80

Wyniki przedstawiono jako średnią ±odchylenie standardowe ze wskazaniem mediany

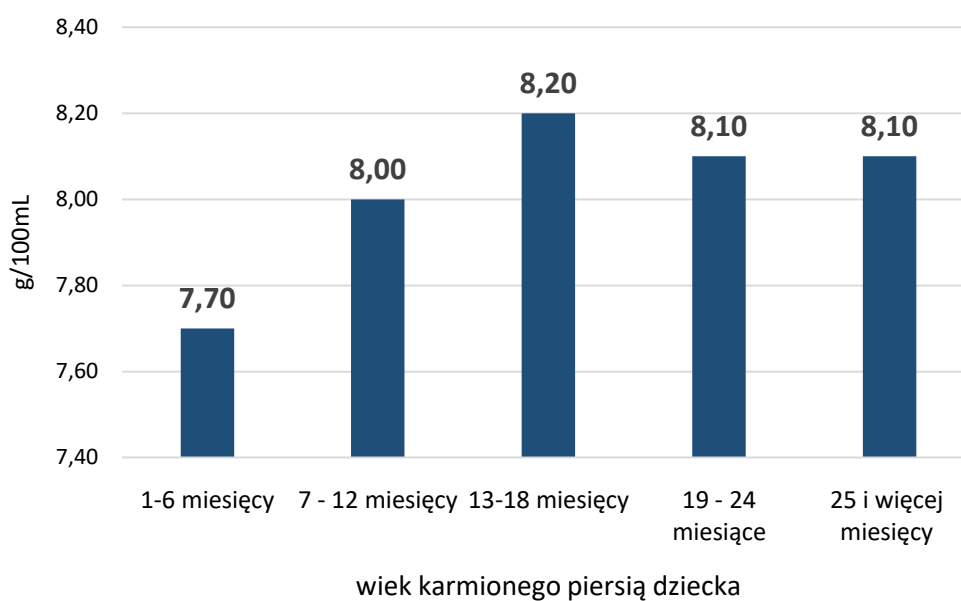
Na wykresach 4.–9. przedstawiono zawartość składników pokarmowych w przebadanych próbkach z podziałem na poszczególne okresy laktacji. Uwzględniono przedziały co sześć miesięcy, aby zaobserwować zmiany w składzie mleka kobiecego pod względem makroskładników wraz z postępem laktacji. Badanie przeprowadzono na 56 próbkach (N=56).



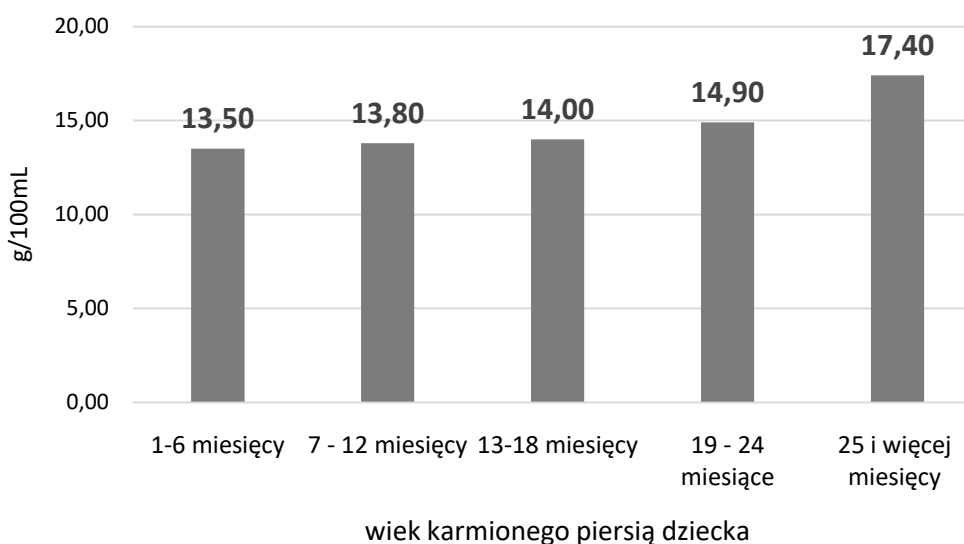
Wykres 4. Średnia zawartość tłuszczu w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych



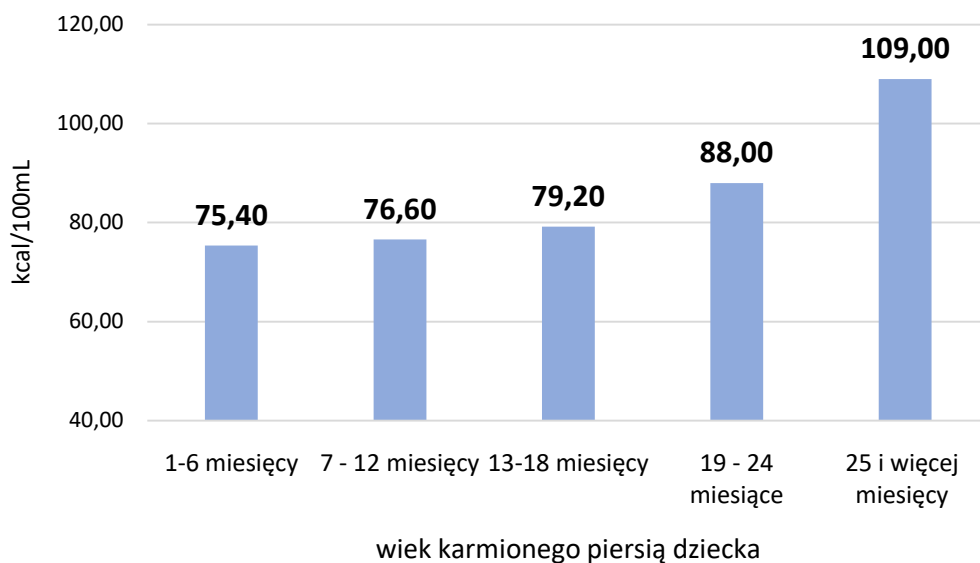
Wykres 5. Średnia zawartość białka całkowitego w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych



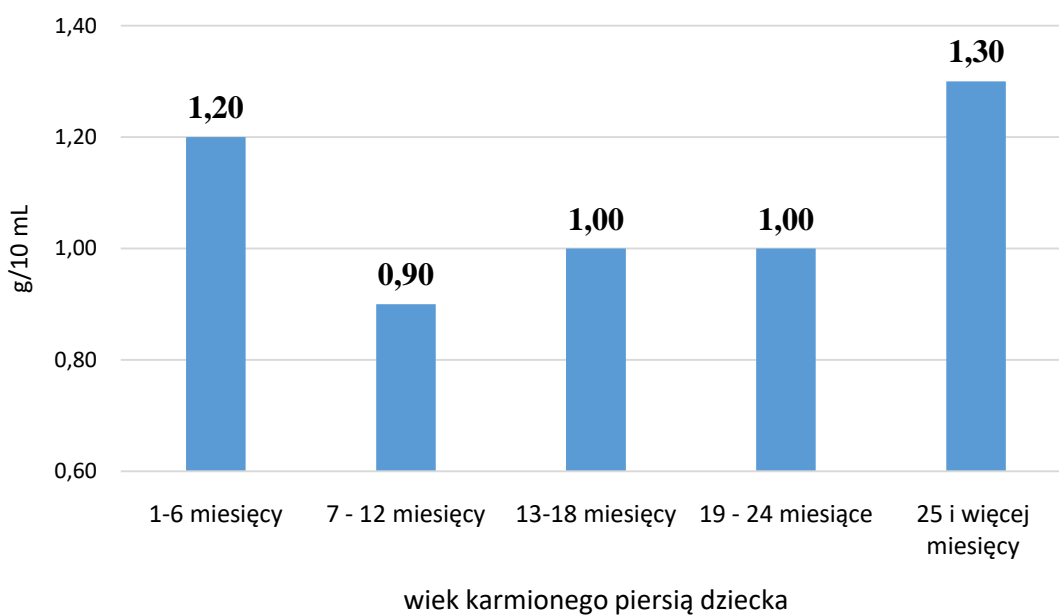
Wykres 6. Średnia zawartość węglowodanów w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych



Wykres 7. Średnia zawartość suchej masy w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych



Wykres 8. Średnia wartość energetyczna próbek mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych



Wykres 9. Średnia zawartość białka odżywczego w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych

Na podstawie przeprowadzonych analiz można zaobserwować wzrastającą, wraz z postępowaniem laktacji, zawartość tłuszczu oraz suchej masy w mleku kobiecym, a także zwiększającą się wartość energetyczną. W populacji przebadanych próbek zaobserwowano tendencję spadkową zawartości białka całkowitego oraz odżywczego,

trwającą między 6 a 24 miesiącem laktacji. U kobiet karmiących ponad dwa lata zawartość białka w składzie mleka kobiecego znacząco wzrosła i przekroczyła wartość początkową obserwowaną w pierwszym półroczu laktacji. Odwrotną tendencję można zaobserwować dla zawartości węglowodanów w składzie mleka kobiecego. Największą zawartością węglowodanów charakteryzowało się mleko kobiece pochodzące od kobiet karmiących piersią, między 13 a 18 miesiącem laktacji. Z uwagi na podobny skład, pod względem makroskładników, całej grupy poddanej badaniu, jak i grupy próbek, w których zidentyfikowano bakterie należące do *Lactobacillaceae*, oraz znaczące dysproporcje dotyczące liczebności obu grup, nie analizowano ich oddzielnie. Na podstawie analizy statystycznej wykazano, że zawartość tłuszczu, suchej masy oraz wartość energetyczna były istotnie wyższe po 25 mies. niż w 1.–6., 7.–12. i 13.–28. mies. Tabela 9. przedstawia dane statystyczne dotyczące analizy składu mleka kobiecego w poszczególnych przedziałach czasowych.

Tabela 9. Dane statystyczne dotyczące analizy składu mleka kobiecego w poszczególnych przedziałach czasowych

Parametr		p
tłuszcz	p = 0,018 *;	25 m+ > 1–6 m, 7–12 m, 13–18 m
białko całkowite		p = 0,053
węglowodany		p = 0,54
sucha masa	p = 0,02*;	25 m+ > 1–6 m, 7–12 m, 13–18 m
wartość energetyczna	p = 0,021*;	25 m+ > 1–6 m, 7–12 m, 13–18 m
białko odżywcze		p = 0,105

\* istotne statystycznie (p<0,05)

p – test Kruskala-Wallisa + analiza post-hoc (test Dunna)



### 6.3 Ogólna liczba mezofilnych bakterii tlenowych oraz różnorodność mikrobiologiczna przebadanych próbek mleka kobiecego

#### 6.3.1 Ogólna liczba tlenowych bakterii mezofilnych

Badaniu na ogólną liczbę mezofilnych drobnoustrojów tlenowych poddano wszystkie próbki mleka kobiecego uzyskane na etapie pobierania próbek (N = 63). Wyniki badań mikrobiologicznych wykazały, że średnia zawartość bakterii w badanych próbkach wyniosła  $4,4 \times 10^3$  jtk/mL. Wyniki mieściły się w przedziale od  $1,6 \times 10^2$  do  $1,7 \times 10^4$  jtk/mL. Ze względu na przeznaczenie pobieranego materiału do badań mikrobiologicznych pozyskiwany był on z dbałością o wysoki poziom higieny oraz sterylność końcówek urządzenia do pobierania pokarmu, jak i pojemników transportowych. Stąd też uzyskane wyniki badań mikrobiologicznych pod względem ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych potwierdziły niską kontaminację mikrobiologiczną pobranych próbek mleka kobiecego.

W grupie próbek mleka kobiecego, w których zidentyfikowano obecność bakterii z rodzaju *Lactobacillaceae* (N = 14), średnia ilość mezofilnych bakterii tlenowych również wyniosła  $4,4 \times 10^3$  jtk/mL. Badanie wykonano w dwóch powtórzeniach.

#### 6.3.2 Różnorodność mikrobiologiczna próbek mleka kobiecego

Przeprowadzone badania oprócz ogólnej liczby bakterii tlenowych oraz identyfikacji bakterii należących do *Lactobacillaceae* wykazały również obecność innych gatunków bakterii zasiedlających środowisko mleka kobiecego. Wyniki analizy MALDI wykazały, że dominującym mikroorganizmem obecnym w mleku kobiecym był *Staphylococcus epidermidis*, izolowany z 80,95% badanych próbek mleka kobiecego. Wśród zidentyfikowanych drobnoustrojów często pojawiały się również bakterie z rodzaju *Streptococcus* (*S.mitis*, *S.oralis*, *S.vestibularis*, *S.parasanguinis*, *S.pneumoniae*). Tabela 10. przedstawia mikroorganizmy najczęściej identyfikowane w badanych próbkach (>10%), odzwierciedlając procentową częstość ich występowania.

Tabela 10. Drobnoustroje najczęściej identyfikowane w przebadanych próbkach mleka kobiecego

Zidentyfikowane drobnoustroje	Procentowa częstotliwość występowania w przebadanych próbkach mleka kobiecego N = 63
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	80,95%
<i>Streptococcus mitis</i>	31,75%
<i>Streptococcus oralis</i>	26,98%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	20,63%
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	19,05%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15,87%
<i>Veillonella atypica</i>	11,11%
<i>Veillonella parvula</i>	11,11%

#### 6.4 Ocena występowania bakterii należących do rodziny *Lactobacillaceae*

Bakterie zidentyfikowane na podstawie cech fenotypowych jako przynależne do *Lactobacillaceae* wzrastały na podłożu MRS w postaci małych lub średnich kolonii o barwie kremowej lub białej, lekko przejrzystej lub opalizującej. Kolonie charakteryzowały się okrągłym kształtem o brzegu gładkim lub lekko poszarpanym, powierzchni płaskiej lub lekko wypukłej. Powierzchnia wyrostłych kolonii była błyszcząca lub matowa.

##### 6.4.1 Identyfikacja kolonii bakteryjnych z zastosowaniem spektrometrii mas

###### MALDI-TOF/MS

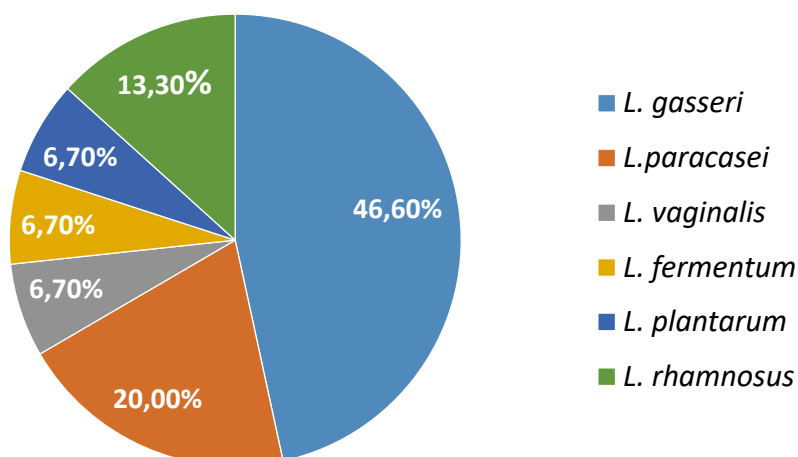
Przeprowadzone badania wykazały obecność bakterii należących do *Lactobacillaceae* w 22,2% badanych próbek mleka kobiecego. Obecność bakterii *Lactobacillaceae* stwierdzono w czternastu przebadanych próbkach mleka. W próbkach, w których wykryto obecność badanych bakterii, występował zwykle tylko jeden rodzaj (93,3%). W jednej z przebadanych próbek zidentyfikowano dwa rodzaje bakterii należące do *Lactobacillaceae*. Tabela 11. przedstawia zidentyfikowane szczepy należące do *Lactobacillaceae*. Wyniki badań uwzględniają nową nomenklaturę poprzedniego rodzaju *Lactobacillus*, który został podzielony na 25 odrębnych rodzajów, spokrewnionych filogenetycznie. W tabeli ujęto numer porządkowy, który był nadawany próbce mleka kobiecego w momencie włączania do badań. Określa

on numer próbki mleka kobiecego, z której pochodziły wyizolowane szczepy bakteryjne.

Tabela 11. Wykaz szczepów należących do *Lactobacillaceae* zidentyfikowanych w przebadanych próbkach mleka kobiecego

Szczep bakteryjny	Numer porządkowy próbki
<i>Lacticasibacillus paracasei</i>	4
<i>Lactobacillus gasseri</i>	6
<i>Lactiplintibacillus plantarum</i>	6
<i>Lactobacillus gasseri</i>	9
<i>Lacticasibacillus paracasei</i>	15
<i>Lactobacillus gasseri</i>	17
<i>Lactobacillus gasseri</i>	18
<i>Lacticasibacillus rhamnosus</i>	24
<i>Lacticasibacillus paracasei</i>	25
<i>Lactobacillus gasseri</i>	38
<i>Limosilactobacillus vaginalis</i>	48
<i>Lacticasibacillus rhamnosus</i>	49
<i>Lactobacillus gasseri</i>	51
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	52
<i>Lactobacillus gasseri</i>	63

Najczęściej izolowanym szczepem bakterii należącym do *Lactobacillaceae* był *L. gasseri* (46,60%). Procentowe występowanie zidentyfikowanych bakterii *Lactobacillaceae* w badanych próbkach mleka kobiecego przedstawiono na wykresie 10.



Wykres 10. Procentowy udział poszczególnych szczepów wyizolowanych z przebadanych próbek mleka kobiecego wśród wszystkich zidentyfikowanych szczepów bakteryjnych należących do *Lactobacillaceae*

#### 6.4.2 Identyfikacja genetyczna z wykorzystaniem metody biologii molekularnej

Szczepy zidentyfikowane za pomocą spektrometrii mas, przy użyciu urządzenia MALDI Biotyper, zostały następnie poddane identyfikacji na poziomie molekularnym. Analiza ampliconów (wielkości ok. 250 pz), otrzymanych w wyniku przeprowadzonych reakcji PCR z zastosowaniem starterów charakterystycznych dla fragmentów analizowanych w badaniu, wykazała poprawność identyfikacji wszystkich poddanych analizie szczepów bakteryjnych jako przynależnych do *Lactobacillaceae*.

#### 6.4.3 Ocena mikroskopowa - barwienie metodą Grama

Badanie mikroskopowe z wykorzystaniem barwienia Grama pozwoliło na przyporządkowanie wyizolowanych szczepów do grupy bakterii Gram-dodatnich o kształcie pałeczek. Komórki bakteryjne, uwidocznione na preparatach mikroskopowych, barwiły się na kolor fioletowy. Badaniu poddano wszystkie wyizolowane szczepy bakteryjne.

#### 6.4.4 Ocena zdolności do wytwarzania katalazy

Bakterie należące do *Lactobacillaceae* charakteryzuje brak wytwarzania katalazy, enzymu katalizującego proces rozkładu nadtlenu wodoru do wody i tlenu. Przeprowadzone badanie pozwoliło na ocenę badanych szczepów pod kątem wytwarzania katalazy. We wszystkich przypadkach uzyskano wynik negatywny.

## 6.5 Ocena wrażliwości szczepów należących do *Lactobacillaceae* wyizolowanych z mleka kobiecego na wybrane antybiotyki

### 6.5.1 Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki z wykorzystaniem krążków antybiotykowych

Badanie przeprowadzono z użyciem 10 szczepów bakterii należących do *Lactobacillaceae* wyizolowanych z próbek mleka kobiecego na wcześniejszym etapie badań. Uzyskane wyniki z podziałem na wrażliwość względem chemioterapeutyków przedstawiono w tabeli nr 12. oraz 13. Badanie wykonano z zastosowaniem podłoża MRS, jak i dedykowanego dla badania wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki podłoża Mueller-Hinton. Na podłożu Mueller-Hinton nie wszystkie szczepy uzyskały wzrost pozwalający na miarodajny odczyt wyników. Badanie wykonano w dwóch powtórzeniach. Badane szczepy, pozyskane ze środowiska mleka kobiecego, wykazywały zróżnicowaną wrażliwość względem poszczególnych antybiotyków. Różnice dotyczyły wrażliwości na wankomycynę oraz, w przypadku badania przeprowadzonego na podłożu Mueller-Hinton, gentamycynę, erytromycynę, tetracyklinę oraz wankomycynę.

Przebadane szczepy należące do *Lactobacillaceae* wykazywały oporność na kanamycynę oraz w badaniu z wykorzystaniem podłoża MRS na gentamycynę. Równocześnie charakteryzowały się wrażliwością względem erytromycyny, tetracykliny oraz ampicyliny. W badaniu z zastosowaniem podłoża Mueller-Hinton szczep *L. fermentum* charakteryzował się umiarkowaną wrażliwością względem erytromycyny i tetracykliny, podczas gdy badanie z zastosowaniem podłoża MRS wykazało jego wrażliwość względem wymienionych antybiotyków. Zdjęcie 9. przedstawia wynik badania wrażliwości na antybiotyki wykonanego na podłożu MRS.

Tabela 12. Wrażliwość szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka kobiecego względem antybiotyków. Badanie z zastosowaniem krążków antybiotykowych na podłożu MRS. S – sensitive (wrażliwe), M – medium sensitive (średnio wrażliwe), R – resistant

<b>Szczep</b> <b>Antybiotyk</b>	<b><i>L.paracasei</i></b> <b>(4)</b>	<b><i>L.gasseri</i></b> <b>(6)</b>	<b><i>L.gasseri</i></b> <b>(9)</b>	<b><i>L.paracasei</i></b> <b>(15)</b>	<b><i>L.gasseri</i></b> <b>(17)</b>
Erytromycyna 15 µg E	S	S	S	S	S
Wankomycyna 30 µg VA	S	S	R	R	S
Gentamycyna 10 µg CN	R	R	R	R	R
Kanamycyna 30 µg K	R	R	R	R	R
Tetracyklina 30 µg TE	S	S	S	S	S
Ampicylina 10 µg AMP	S	S	S	S	S
<b>Szczep</b> <b>Antybiotyk</b>	<b><i>L.gasseri</i></b> <b>(38)</b>	<b><i>L.vaginalis</i></b> <b>(48)</b>	<b><i>L.rhamnosus</i></b> <b>(49)</b>	<b><i>L.gasseri</i></b> <b>(51)</b>	<b><i>L.fermentum</i></b> <b>(52)</b>
Erytromycyna 15 µg E	S	S	S	S	S
Wankomycyna 30 µg VA	S	R	R	R	R
Gentamycyna 10 µg CN	R	R	R	R	R
Kanamycyna 30 µg K	R	R	R	R	R
Tetracyklina 30 µg TE	S	S	S	S	S
Ampicylina 10 µg AMP	S	S	S	S	S

Tabela 13. Wrażliwość szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka kobiecego względem antybiotyków. Badanie z zastosowaniem krążków antybiotykowych na podłożu Mueller-Hinton. S – sensitive (wrażliwe), M – medium sensitive (średnio wrażliwe), R – resistant

Szczep Antybiotyk	<i>L.paracasei</i> (4)	<i>L.gasseri</i> (9)	<i>L.paracasei</i> (15)	<i>L.gasseri</i> (17)
Erytromycyna 15 µg E	S	S	S	S
Wankomycyna 30 µg VA	S	R	R	R
Gentamycyna 10 µg CN	M	M	M	M
Kanamycyna 30 µg K	R	R	R	M
Tetracyklina 30 µg TE	S	S	S	S
Ampicylina 10 µg AMP	S	S	S	S
Szczep Antybiotyk	<i>L.vaginalis</i> (48)	<i>L.rhamnosus</i> (49)	<i>L.gasseri</i> (51)	<i>L.fermentum</i> (52)
Erytromycyna 15 µg E	S	S	S	M
Wankomycyna 30 µg VA	R	R	S	R
Gentamycyna 10 µg CN	M	M	S	R
Kanamycyna 30 µg K	R	R	M	M
Tetracyklina 30 µg TE	S	S	S	M
Ampicylina 10 µg AMP	S	S	S	S

## 6.5.2 Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego MIC – metoda z wykorzystaniem ETEST-ów

Badanie mające na celu wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego przeprowadzono z wykorzystaniem 10 szczepów bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowanych z próbek mleka kobiecego. Badanie wykonano w dwóch wersjach. W pierwszej wersji użyto standardowego podłoża Mueller-Hinton, w drugiej podłoża w większym stopniu zaspokajającego wymagania wzrostowe bakterii należących do *Lactobacillaceae* (MRS). Na podłożu Mueller-Hinton wzrost badanych szczepów był słaby, jednak w większości przypadków wynik badania możliwy był do odczytu. Wzrost bakteryjny na agarze MRS charakteryzował się większą intensywnością. Uzyskane wyniki zamieszczone zostały w tabelach 14. oraz 15.

Wyniki badania z zastosowaniem ETEST-ów wykazały, że wrażliwość na środki przeciwdrobnoustrojowe jest zależna od rodzaju bakterii. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było wyznaczenie minimalnych stężeń hamujących (MIC) dla poszczególnych izolatów bakteryjnych. Zaobserwowano różnice w otrzymanych wynikach pomiędzy wersją z zastosowaniem podłoża MRS oraz podłoża Mueller-Hinton. Ponieważ doświadczenia innych badaczy sugerują wpływ podłoża MRS na wynik badania dotyczącego minimalnego stężenia hamującego oraz powszechne wykorzystywanie podłoża Mueller-Hinton w badaniu antybiotykooporności, wyniki otrzymane w tej wersji badania są bardziej wiarygodne.

Tabela 14. Zestawienie wyników dotyczących minimalnego stężenia hamującego antybiotyków uzyskanych na podłożu Muller-Hinton

Szczep	Badany antybiotyk na podłożu Muller-Hinton				
	AC	AM	PG	CM	IP
4 <i>L.paracasei</i>	0,5	0,25	0,032	0,064	0,75
6 <i>L.gasseri</i>	-	-	-	-	-
9 <i>L.gasseri</i>	1	1	0,38	0,25	4
15 <i>L.paracasei</i>	0,75	0,75	0,5	0,19	1,5
17 <i>L.gasseri</i>	0,75	0,5	0,38	0,19	3
38 <i>L.gasseri</i>	-	-	-	-	0,032
48 <i>L.vaginalis</i>	1,5	0,75	0,25	0,25	6
49 <i>L.rhamnosus</i>	0,75	0,5	0,25	0,25	3
51 <i>L.gasseri</i>	0,5	0,5	0,38	0,19	3
52 <i>L.fermentum</i>	-	0,023	-	0,016	0,16



Tabela 15. Zestawienie wyników dotyczących minimalnego stężenia hamującego antybiotyków uzyskanych na podłożu MRS

Szczep	Badany antybiotyk na podłożu MRS				
	AC	AM	PG	CM	IP
4 <i>L.paracasei</i>	0,38	0,38	0,32	0,19	1,5
6 <i>L.gasseri</i>	0,047	0,064	0,016	8	0,19
9 <i>L.gasseri</i>	0,5	0,5	0,125	0,25	3
15 <i>L.paracasei</i>	0,15	0,25	0,125	0,125	4
17 <i>L.gasseri</i>	0,75	0,25	0,125	0,19	12
38 <i>L.gasseri</i>	0,094	0,25	0,04	6	0,19
48 <i>L.vaginalis</i>	0,5	0,75	0,125	0,25	2
49 <i>L.rhamnosus</i>	0,25	0,38	0,094	0,25	3
51 <i>L.gasseri</i>	0,5	0,38	0,094	0,25	4
52 <i>L.fermentum</i>	0,19	0,094	0,032	0,064	0,094

Przeprowadzone badania wykazały wrażliwość szczepów *Lactobacillaceae* wyizolowanych z mleka kobiecego w stosunku do zastosowanych antybiotyków. Otrzymane wyniki, pochodzące z dwóch wersji badania, różnią się między sobą. W przypadku zastosowania standardowej pożywki do oznaczania antybiotykooporności – pożywki Mueller-Hinton – wzrost drobnoustrojów w kilku przypadkach był niewystarczający do odczytu wyniku. Na pożywce MRS obserwowano intensywny wzrost drobnoustrojów.

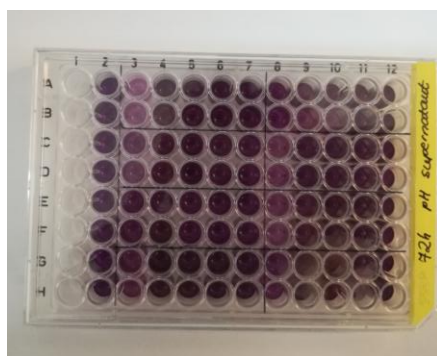
#### 6.6 Ocena wpływu szczepów bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowanych z mleka kobiecego na komórki nowotworu piersi linii MCF-7 w warunkach in vitro

Stężenie, przy którym hamowany jest wzrost 50% komórek wykorzystanych w badaniu (IC<sub>50</sub>), został wyznaczony dla metabolitów postbiotycznych 10 szczepów bakteryjnych należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowanych z mleka kobiecego. Cytotoksyczność metabolitów postbiotycznych badanych szczepów bakteryjnych zależna była od czasu oddziaływania na komórki nowotworowe, jak i od zastosowanego stężenia. Po upływie 24 godzin nie odnotowano działania cytotoksycznego względem komórek nowotworowych. Test MTT przeprowadzony po 48 godzinach wykazał cytotoksyczność metabolitów *Lacticasibacillus paracasei* oraz *Lacticasibacillus rhamnosus* przy stężeniu 50% v/v. Na podstawie danych dotyczących

wartości absorbancji wyznaczono  $IC_{50}$ . Dla wymienionych szczepów wartości te wyniosły odpowiednio 48,1% oraz 42,6%. Kolejny test MTT wykonany po 72 godzinach inkubacji wskazał na działanie cytotoksyczne również metabolitów postbiotycznych pochodzących od *Limosilactobacillus vaginalis* oraz *Limosilactobacillus fermentum*. Kontrola oddziaływania podłoża, na którym pierwotnie wzrastały badane szczepy bakteryjne (bulion MRS), nie wykazała wpływu cytotoksycznego na komórki nowotworu piersi MCF-7 wykorzystane w teście MTT. Tabela 16. przedstawia uzyskane wartości  $IC_{50}$  szczepów bakteryjnych, dla których odnotowano działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych MCF-7. Wśród przebadanych metabolitów postbiotycznych największą cytotoksycznością charakteryzowały się metabolity pochodzące ze szczepu *L. rhamnosus*. Zdjęcie 10. przedstawia płytkę wykorzystaną w badaniu.

Tabela 16. Wartość  $IC_{50}$  dla metabolitów postbiotycznych wytwarzanych przez szczepy bakteryjne należące do Lactobacillaceae, po 48 oraz 72 godzinach inkubacji

Wartość $IC_{50}$ po 48 godz. inkubacji	
<i>L. paracasei</i> (4)	48,1%
<i>L. rhamnosus</i> (49)	42,6%
Wartość $IC_{50}$ po 72 godz. inkubacji	
<i>L. paracasei</i> (4)	41,2%
<i>L. rhamnosus</i> (49)	37,4%
<i>L. vaginalis</i> (48)	42,3%
<i>L. fermentum</i> (52)	48,6%



Zdjęcie 9 Płytkę testu MTT. Badanie cytotoksyczności supernatantu pochodzącego ze szczepów należących do Lactobacillaceae na komórki nowotworowe MCF-7 (72godz. inkubacji)

## 6.7 Ocena przeżywalności badanych izolatów w środowisku pasteryzowanego mleka kobycego, w warunkach obniżonej temperatury

Badanie, dotyczące przeżywalności szczepów bakteryjnych należących do *Lactobacillaceae* w warunkach obniżonej temperatury, przeprowadzono z wykorzystaniem 10 szczepów wyizolowanych na wcześniejszych etapach badań. Tabele 17. oraz 18. przedstawiają uzyskane wyniki badań.

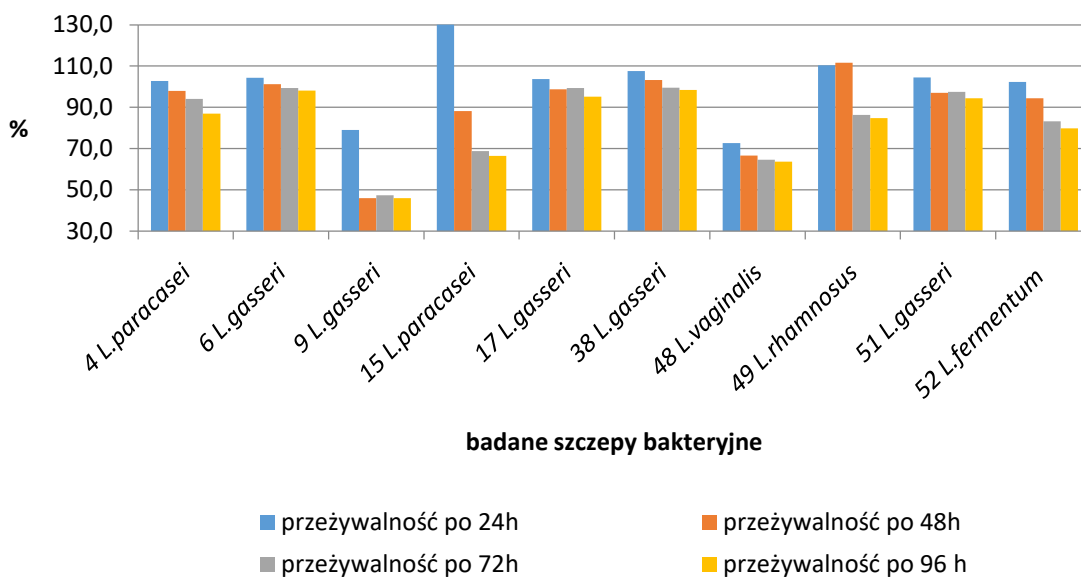
Tabela 17. Przeżywalność szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka kobycego, przechowywanych w temp. 4°C

Przeżywalność szczepów w temperaturze chłodniczej (%)				
Badany szczep (numer porządkowy)	C <sub>1</sub> po 24 godz.	C <sub>2</sub> po 48 godz.	C <sub>3</sub> po 72 godz.	C <sub>4</sub> po 96 godz.
<i>L. paracasei</i> (4)	102,8	97,9	94,0	87,0
<i>L. gasseri</i> (6)	104,3	101,2	99,4	98,2
<i>L. gasseri</i> (9)	79,1	45,9	47,3	45,9
<i>L. paracasei</i> (15)	130,1	88,2	68,8	66,5
<i>L.gasseri</i> (17)	103,7	98,8	99,4	95,1
<i>L.gasseri</i> (38)	107,6	103,2	99,5	98,4
<i>L. vaginalis</i> (48)	72,7	66,7	64,6	63,6
<i>L.rhamnosus</i> (49)	110,3	111,6	86,4	84,7
<i>L.gasseri</i> (51)	104,5	97,0	97,5	94,4
<i>L. fermentum</i> (52)	102,2	94,4	83,1	79,8

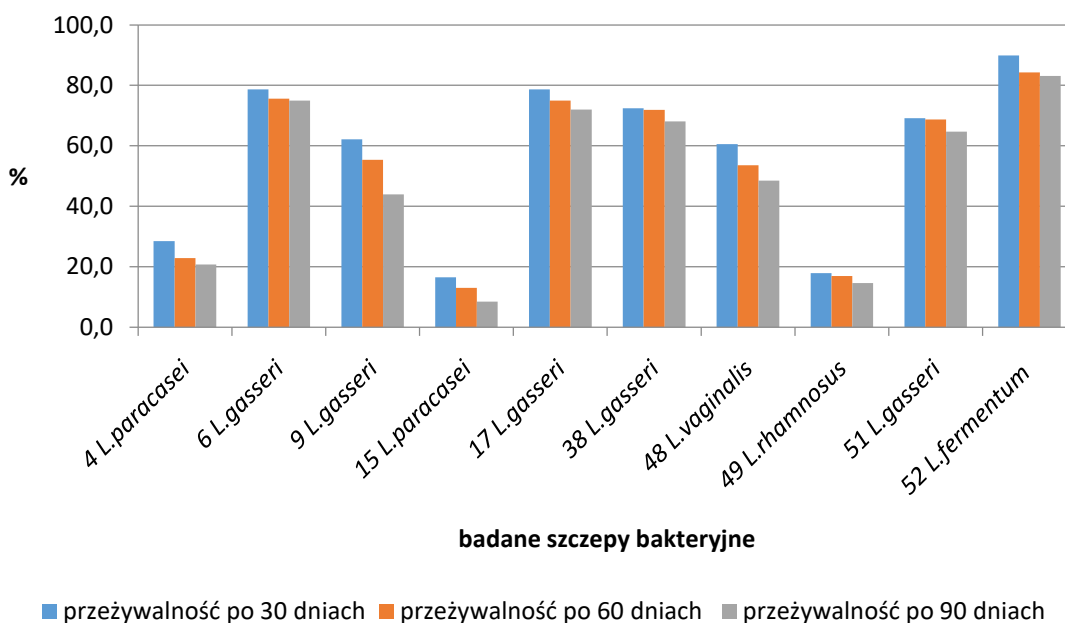
Tabela 18. Przeżywalność szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka kobiecego, przechowywanych w temp. – 20°C

Przeżywalność szczepów w temperaturze zamrażalniczej (%)			
Badany szczep (numer porządkowy)	Z <sub>1</sub> po 30 dniach	Z <sub>2</sub> po 60 dniach	Z <sub>3</sub> po 90 dniach
<i>L.paracasei</i> (4)	28,5	22,9	20,8
<i>L. gasseri</i> (6)	78,7	75,6	75,0
<i>L. gasseri</i> (9)	62,2	55,4	43,9
<i>L. paracasei</i> (15)	16,5	13,0	8,5
<i>L.gasseri</i> (17)	78,7	75,0	72,0
<i>L.gasseri</i> (38)	72,4	71,9	68,1
<i>L. vaginalis</i> (48)	60,6	53,5	48,5
<i>L.rhamnosus</i> (49)	17,9	16,9	14,6
<i>L.gasseri</i> (51)	69,2	68,7	64,6
<i>L. fermentum</i> (52)	89,9	84,3	83,1

Wykresy 11. oraz 12. przedstawiają graficznie procentową przeżywalność poszczególnych szczepów bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowanych z mleka kobiecego, przechowywanych w warunkach chłodniczych (wykres 11.) oraz zamrażalniczych (wykres 12.). Uwzględniono numery porządkowe próbek mleka kobiecego, z których badane szczepy bakteryjne zostały wyizolowane. Najmniejszym spadkiem przeżywalności, w badanych okresach przechowywania, charakteryzowały się szczepy *L. gasseri* (6) oraz *L. fermentum* (52). Największe zmiany obserwowane były podczas przechowywania w warunkach chłodniczych *L. paracasei* (15) oraz *L. gasseri* (9).



Wykres 11. Przeżywalność szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka kobiecego, przechowywanych w temp. 4°C



Wykres 12. Przeżywalność szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka kobiecego, przechowywanych w temp. - 20°C

Uzyskane wyniki wskazują na zdolność bakterii należących do *Lactobacillaceae* do przeżywania w warunkach obniżonej temperatury, w środowisku pasteryzowanego mleka kobiecego. Zgodnie z uzyskanymi wynikami, zarówno przechowywanie chłodnicze, jak i zamrażalnicze łączy się z obniżaniem ilości żywych komórek bakteryjnych, jednak szybkość obniżania przeżywalności nie jest intensywna.

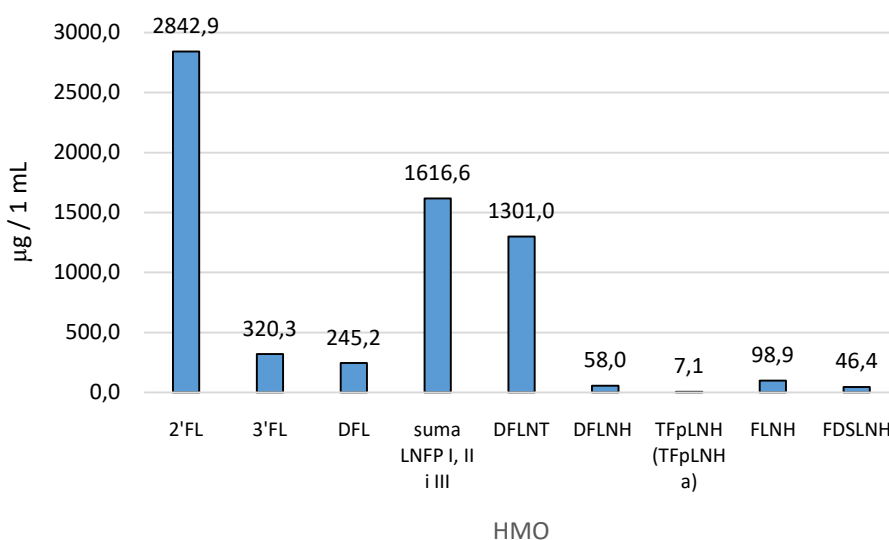
## 6.8 Ocena zawartości oligosacharydów w badanych próbkach mleka kobiecego

Badaniu zawartości oligosacharydów poddano 44 próbki mleka kobiecego. Ilość materiału uzyskana od pozostałych uczestniczek nie była wystarczająca na wykonanie wszystkich rodzajów badań. W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano 20 rodzajów oligosacharydów. Tabela nr 19. przedstawia zidentyfikowane HMO, wielkość zarejestrowanych pików oraz oszacowaną koncentrację w analizowanym materiale. Wyniki odnoszą się do mleka kobiecego w ujęciu populacyjnym.

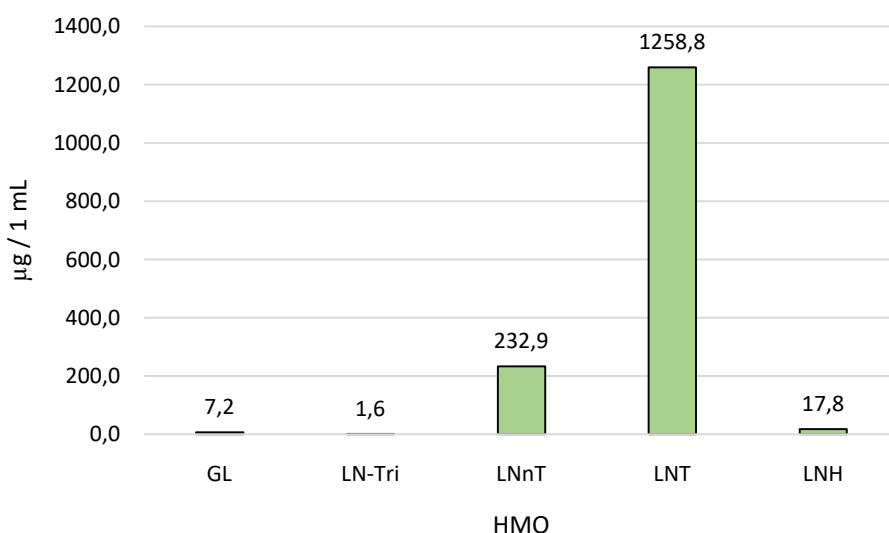
Tabela 19. Zidentyfikowane oligosacharydy mleka kobiecego w badanych próbkach wraz z oszacowaną zawartością

HMO	Nazwa	Wzór	Masa cząsteczkowa	Wartość średnia pików	Wartość median pików	Oszacowana koncentracja w mleku ( $\mu\text{g}/1\text{ mL}$ )
2'FL	2'fucosyllactose	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	488,174	8,43E+07	8,92E+07	2842,9
3'FL	3'fucosyllactose	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	488,174	9,49E+06	8,88E+06	320,3
GL	galactosyllactose	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	504,169	2,14E+05	2,07E+05	7,2
LN-Tri	lacto-N-triaose	$\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{NO}_{16}$	545,196	4,80E+04	2,48E+05	1,6
3'SL	3'sialyllactose	$\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NO}_{19}$	633,211	3,03E+07	2,97E+07	1022,8
6'SL	6'sialyllactose	$\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NO}_{19}$	633,211	3,05E+06	6,45E+06	103,0
DFL	difukozyllactose	$\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{19}$	634,232	7,27E+06	3,31E+06	245,2
LNnT	lacto-N-neotetraose	$\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{O}_{21}\text{N}$	707,248	6,90E+06	4,82E+06	232,9
LNT	lacto-N-tetraose	$\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{O}_{21}\text{N}$	707,248	3,73E+07	3,83E+07	1258,8
sum LNFP I, II i III	lacto-N-fucopentaose	$\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{NO}_{25}$	853,306	4,79E+07	3,40E+07	1616,6
LSTc	sialyllacto-N-tetraose c	$\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_{29}$	998,344	3,45E+06	2,32E+06	116,4
LSTb	sialyllacto-N-tetraose b	$\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_{29}$	998,344	1,59E+06	7,25E+05	53,8
DFLNT	difucosyl-lacto-N-tetraose	$\text{C}_{38}\text{H}_{65}\text{NO}_{29}$	999,364	3,86E+07	4,16E+07	1301,0
LNH	Lacto-N-hexaose (para-Lacto-N-neohexaose)	$\text{C}_{40}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{O}_{31}$	1072,381	5,27E+05	1,72E+06	17,8
FLNH	fucosyl-lacto-N-hexaose	$\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_{45}$	1218,4385	2,93E+06	9,48E+05	98,9
DSLNT	disialyllacto-N-tetraose	$\text{C}_{48}\text{H}_{79}\text{N}_3\text{O}_{37}$	1289,439	1,12E+07	1,43E+07	377,8
DFLNH	difucosyllacto-N-hexaose	$\text{C}_{52}\text{H}_{88}\text{N}_2\text{O}_{39}$	1364,496	1,72E+06	4,97E+05	58,0
TFpLNH (TFpLNHa)	trifucoparalacto-N-hexaose	$\text{C}_{58}\text{H}_{98}\text{N}_2\text{O}_{43}$	1510,554	2,11E+05	6,35E+05	7,1
DSLNH (DSLNI)	disialyllacto-N-hexaose	$\text{C}_{62}\text{H}_{102}\text{N}_4\text{O}_4$	1654,5721	1,08E+06	1,72E+06	36,6
FDSLNH	fucodisialyl-lacto-N-hexaose	$\text{C}_{72}\text{H}_{112}\text{N}_4\text{O}_5$	1848,6294	1,38E+06	1,18E+06	46,4

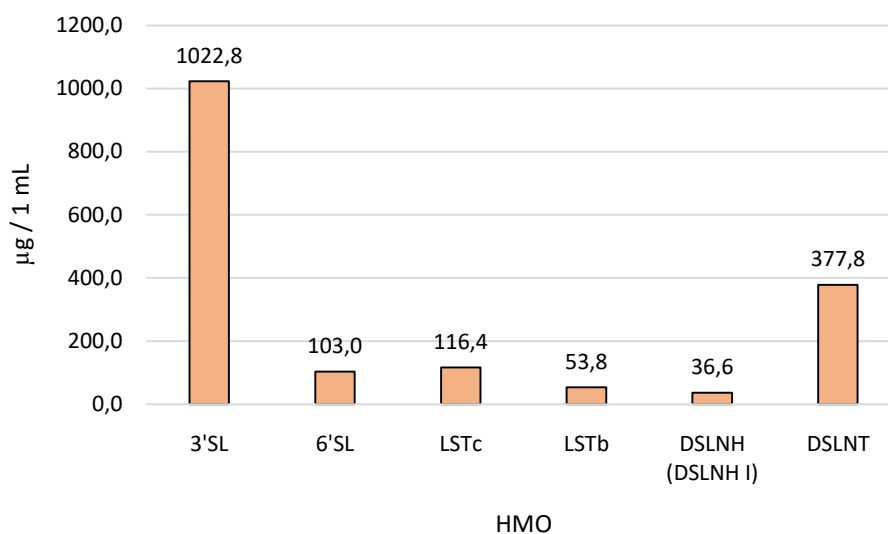
Otrzymane wyniki zawartości oligosacharydów, w grupie próbek poddanych badaniu, podzielono ze względu na rodzaj omawianych związków. Wyróżniono grupę oligosacharydów neutralnych fukozylowanych, neutralnych niefukozylowanych oraz grupę oligosacharydów kwaśnych, sjałowanych. Wyniki HMO przynależnych do wyszczególnionych grup zamieszczono w tabeli 20. Wyniki omawianych grup HMOs przedstawiają wykresy 13.–15.



Wykres 13. Zawartość oligosacharydów neutralnych, fukozylowanych wyizolowanych z próbek mleka kobiecego przeznaczonych do badań



Wykres 14. Zawartość oligosacharydów neutralnych, niefukozylowanych wyizolowanych z próbek mleka kobiecego przeznaczonych do badań



Wykres 15. Zawartość oligosacharydów kwaśnych, sjałowanych wyizolowanych z próbek mleka kobiecego przeznaczonych do badań

Tabela 20. Sumaryczna zawartość poszczególnych grup oligosacharydów w przebadanych próbkach mleka kobiecego

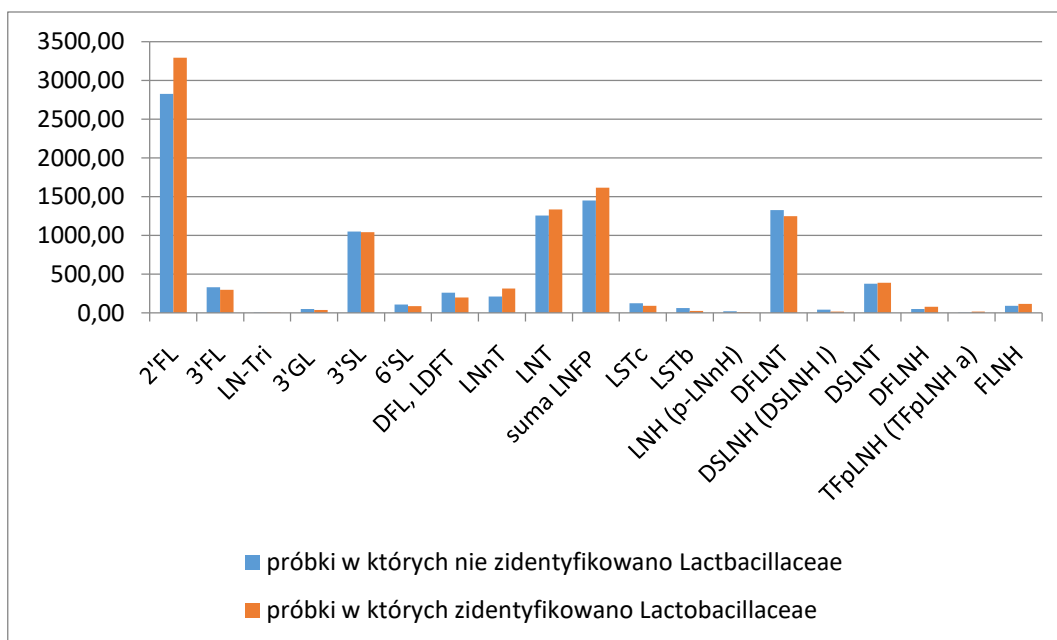
Rodzaj HMO	µg/1 mL
HMO neutralne, fukozylowane	6536,3
HMO neutralne, niefukozylowane	1518,3
HMO kwaśne, sjałowane	1710,5

Wśród grup oligosacharydów mleka kobiecego dominują oligosacharydy neutralne, fukozylowane. Oligosacharydem o największej zawartości, należącym do grupy HMO neutralnych, fukozylowanych, zidentyfikowanych w pozyskanych próbkach mleka kobiecego jest 2'FL. Odnotowano również wysoką koncentrację DFLNT oraz sumę LNFP. W grupie oligosacharydów neutralnych niefukozylowanych dominowała zawartość LNnT oraz LNT. Oligosacharydem o wysokiej koncentracji w grupie HMO sjałowanych był 3'-SL.

Próbki mleka kobiecego przeznaczone do badań podzielono na dwie grupy. Grupa próbek dodatnich pod względem obecności bakterii należących do *Lactobacillaceae* oraz grupa próbek, w których nie zidentyfikowano omawianych drobnoustrojów. Wykres 16. przedstawia porównanie wielkości odnotowanych pików



poszczególnych HMO w grupie próbek mleka kobiecego, w których nie zidentyfikowano bakterii należących do *Lactobacillaceae* oraz w grupie próbek gdzie ww. drobnoustroje były obecne.



Wykres 16. Zawartość poszczególnych oligosacharydów zidentyfikowanych w grupie próbek mleka kobiecego dodatnich pod względem obecności bakterii należących do *Lactobacillaceae* oraz próbek ujemnych pod względem tej cechy

Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano większą zawartość oligosacharydu 2'-FL w próbkach mleka kobiecego, w których zidentyfikowano bakterie należące do *Lactobacillaceae*. Nieco wyższą koncentracją charakteryzowała się również suma oligosacharydów LNFPI, II oraz III, a także LNT. Próbkami mleka kobiecego, w których nie zidentyfikowano *Lactobacillaceae*, odznaczały się nieco wyższą koncentracją oligosacharydu DFLNT. Z uwagi na dysproporcje dotyczące omawianych grup próbek mleka kobiecego (dodatnie pod kątem występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* oraz ujemne) nie przeprowadzono badania istotności statystycznej uzyskanych wyników badań.

Oligosacharydami, które występowały w analizowanych próbkach w dużej ilości oprócz dominującego oligosacharydu 2'-FL, były:

- 3'-SL
- LNT
- LNFPI
- DFLNT

## 6.9 Ocena zależności występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae*, w grupie kobiet karmiących piersią poddanej badaniu, od analizowanych czynników

W ocenie zależności wystąpienia bakterii należących do *Lactobacillaceae* wzięto pod uwagę różne czynniki, które potencjalnie mogłyby wpłynąć na skład mleka kobiecego. W analizie zestawiono informacje uzyskane z kwestionariuszy będących integralną częścią badania.

### 6.9.1 Czynniki matczyne

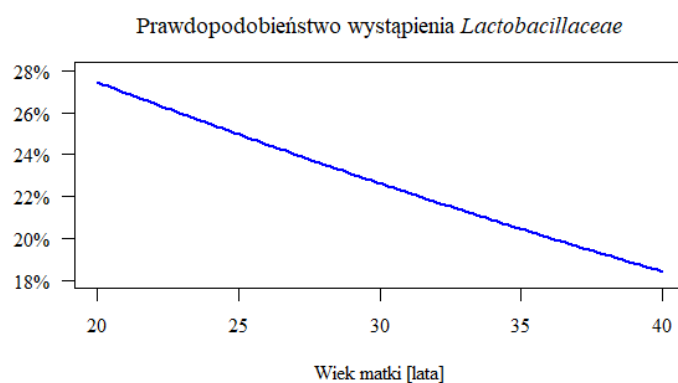
- **Wiek matki**

Na wykresie 17. oraz w tabeli 21. przedstawiono zależność pomiędzy występowaniem bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym a wiekiem kobiety karmiącej piersią. Zaobserwowano zmniejszające się prawdopodobieństwo występowania *Lactobacillaceae* w mleku wraz z wiekiem kobiety w okresie laktacji. Wynik nie był istotny statystycznie.

Tabela 21. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od wieku kobiety karmiącej piersią

Cecha	OR	95%CI	p
Wiek matki lata	0,974	0,835 1,137	0,742

p - jednoczynnikowa regresja logistyczna, zależność nieistotna statystycznie ( $p > 0,05$ ).



Wykres 17. Prawdopodobieństwo występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od wieku kobiety karmiącej piersią

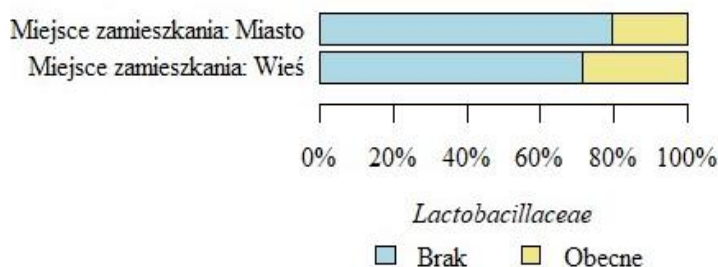
- **Miejsce zamieszkania**

Wykres 18. oraz tabela 22. przedstawiają zależność występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* od miejsca zamieszkania.

Tabela 22. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od miejsca zamieszkania

Miejsce zamieszkania	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI	p
Miasto (N = 49)	10 (20,41%)	1	ref.	
Wieś (N = 14)	4 (28,57%)	1,56	0,404 6,028	0,519

p - jednoczynnikowa regresja logistyczna, zależność nieistotna statystycznie ( $p > 0,05$ ).



Wykres 18. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w odniesieniu do miejsca zamieszkania kobiety karmiącej piersią

Na podstawie przeprowadzonych badań odnotowano wpływ miejsca zamieszkania kobiety karmiącej piersią na częstość występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae*. Wśród przebadanych próbek mleka kobiecego bakterie należące do *Lactobacillaceae* występowały częściej u kobiet mieszkających na terenach wiejskich. Wyniki nie były istotne statystycznie.

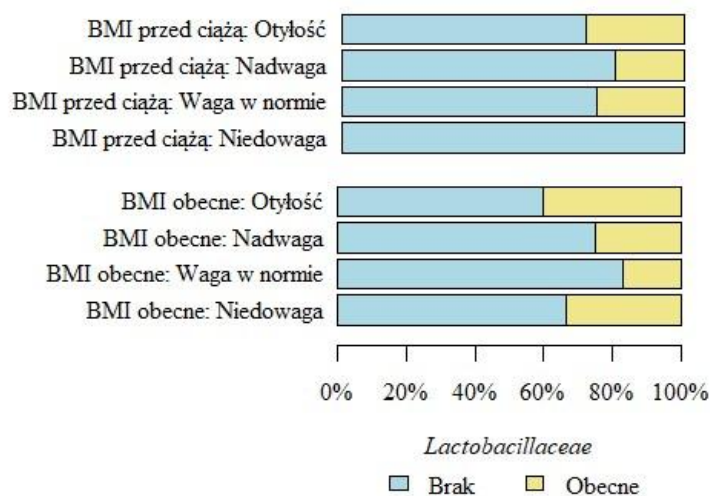
- **BMI matki przed ciążą i w trakcie badania**

Wykres 19. oraz tabela 23. przedstawiają procentowe występowanie bakterii należących do *Lactobacillaceae* zależnie od wskaźnika BMI (ang. *Body Mass Index*) wśród kobiet karmiących piersią w odniesieniu do wagi sprzed ciąży oraz po urodzeniu dziecka.

Tabela 23. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od wskaźnika BMI kobiety karmiącej piersią przed ciążą i w okresie prowadzenia badań

BMI przed ciążą wskazujące na:	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI	p
Otyłość (N = 7)	2 (28,57%)	1	ref.	
Nadwaga (N = 10)	2 (20,00%)	0,625	0,065	5,966
Waga w normie (N = 39)	10 (25,64%)	0,862	0,144	5,166
Niedowaga (N = 7)	0 (0,00%)	---	---	---
BMI w trakcie badania	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI	p
Otyłość (N = 5)	2 (40,00%)	1	ref.	
Nadwaga (N = 16)	4 (25,00%)	0,5	0,06	4,153
Waga w normie (N = 36)	6 (16,67%)	0,3	0,041	2,2
Niedowaga (N = 6)	2 (33,33%)	0,75	0,064	8,834

p – jednoczynnikowa regresja logistyczna, zależność nieistotna statystycznie (p>0,05)



Wykres 19. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od wskaźnika BMI kobiety karmiącej piersią przed ciążą i w okresie prowadzenia badań

W próbkach mleka kobiecego pochodzących od kobiet charakteryzujących się niedowagą przed zajściem w ciążę nie zidentyfikowano bakterii należących do *Lactobacillaceae*. Wśród próbek mleka pochodzącego od kobiet, których BMI wskazywało na otyłość w okresie laktacji, odnotowywano najwięcej wyników dodatnich pod kątem występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae*. Wyniki nie były istotne statystycznie.

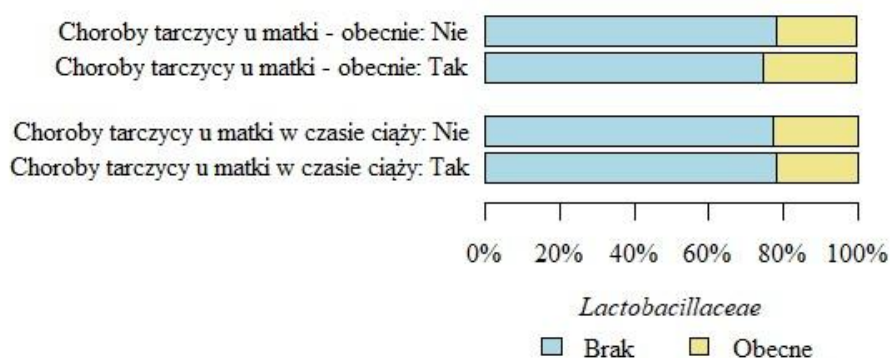
- **Choroby tarczycy u matki w czasie ciąży i laktacji**

Wykres 20. oraz tabela 24. przedstawiają wyniki badań w odniesieniu do chorób tarczycy zdiagnozowanych u matki w okresie ciąży oraz w okresie laktacji. Uzyskane dane wskazują na podobną częstotliwość występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* zarówno wśród kobiet zdrowych, jak i kobiet ze zdiagnozowaną chorobą tarczycy. Wyniki nie były istotne statystycznie.

Tabela 24. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od występowania chorób tarczycy u kobiety karmiącej piersią w okresie ciąży i laktacji

Choroby tarczycy u matki w czasie ciąży	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI	p
Nie (N = 40)	9 (22,50%)	1	ref.	
Tak (N = 23)	5 (21,74%)	0,957	0,277	3,299
Choroby tarczycy u matki – obecnie	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI	p
Nie (N = 51)	11 (21,57%)	1	ref.	
Tak (N = 12)	3 (25,00%)	1,212	0,279	5,257

p - jednoczynnikowa regresja logistyczna, zależność nieistotna statystycznie ( $p > 0,05$ )



Wykres 20. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od występowania chorób tarczycy u kobiety karmiącej piersią w okresie ciąży i laktacji

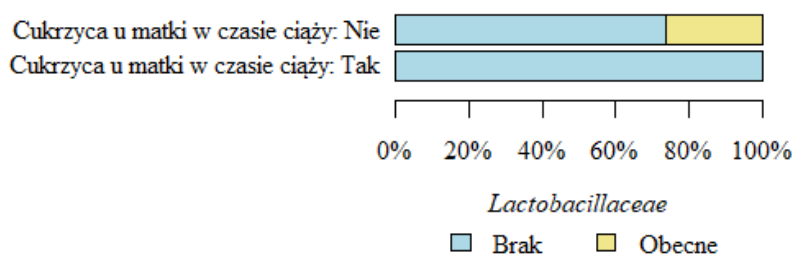
- **Cukrzyca u matki w czasie ciąży**

Wykres 21. oraz tabela 25. przedstawiają dane dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od występowania cukrzycy ciążowej u matki. Wyniki wskazują na większe prawdopodobieństwo występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* wśród kobiet zdrowych w trakcie ciąży. Wyniki nie były istotne statystycznie.

Tabela 25. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od występowania cukrzycy ciążowej

Cukrzyca u matki w czasie ciąży	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI	p
Nie (N = 53)	14 (26,42%)	1	ref.	
Tak (N = 10)	0 (0,00%)	---	---	---

p - jednoczynnikowa regresja logistyczna, zależność nieistotna statystycznie (p>0,05)



Wykres 21. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od występowania chorób tarczycy u kobiety karmiącej piersią w zależności od występowania cukrzycy ciążowej

## 6.9.2 Czynniki okołoporodowe

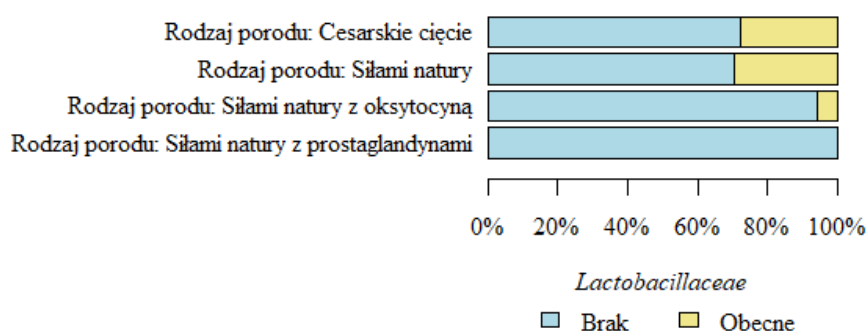
- **Rodzaj porodu**

Wykres 22. oraz tabela 26. przedstawiają zależność występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* od rodzaju porodu. Nie zaobserwowano znacznych różnic pomiędzy próbkami mleka kobiecego pochodzącymi od kobiet, które urodziły siłami natury, w porównaniu z kobietami, które przeszły cięcie cesarskie. Wyniki nie były istotne statystycznie.

Tabela 26. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od rodzaju porodu

Rodzaj porodu	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI		p
Cesarskie cięcie (N = 18)	5 (27,78%)	1	ref.		
Siłami natury (N = 27)	8 (29,63%)	1,095	0,292	4,104	0,893
Siłami natury z oksytocyną (N = 17)	1 (5,88%)	0,163	0,017	1,57	0,116
Siłami natury z prostaglandynami (N = 1)	0 (0,00%)	---	---	---	---

p - jednoczynnikowa regresja logistyczna, Zależność nieistotna statystycznie (p>0,05)



Wykres 22. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od rodzaju porodu

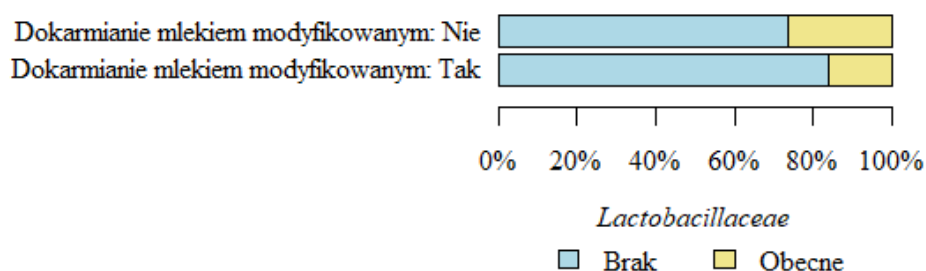
#### • Dokarmianie dziecka mlekiem modyfikowanym

Na wykresie 23. oraz w tabeli 27. ujęto dane dotyczące dokarmiania dzieci mlekiem modyfikowanym. Na podstawie uzyskanych wyników można zauważyć częstsze występowanie *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym pochodzącym od matek, których dziecko nie było dokarmiane mlekiem modyfikowanym. Wyniki nie były istotne statystycznie.

Tabela 27. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od dokarmiania dziecka mlekiem modyfikowanym

Dokarmianie mlekiem modyfikowanym	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI		p
Nie (N = 38)	10 (26,32%)	1	ref.		
Tak (N = 25)	4 (16,00%)	0,533	0,147	1,938	0,34

p - jednoczynnikowa regresja logistyczna, zależność nieistotna statystycznie (p>0,05)



Wykres 23. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od dokarmiania dziecka mlekiem modyfikowanym

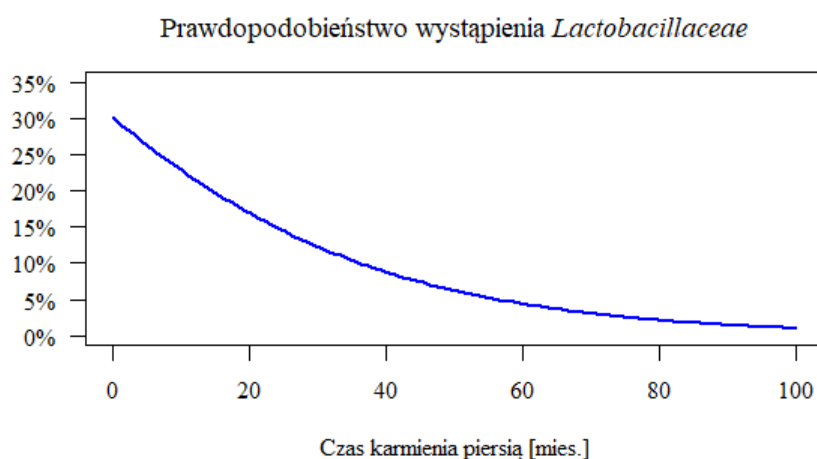
- Czas karmienia piersią

Wykres 24. oraz tabela 28 przedstawiają prawdopodobieństwo wystąpienia bakterii należących do *Lactobacillaceae* w odniesieniu do czasu karmienia piersią (długości laktacji). Zaobserwowano tendencję spadkową w odniesieniu do analizowanej cechy. Wraz z upływem czasu prawdopodobieństwo występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* ulegało zmniejszeniu. Wyniki nie były istotne statystycznie.

Tabela 28. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od czasu karmienia piersią

Cecha		OR	95%CI	p
Czas karmienia piersią	mies.	0,963	0,902 - 1,029	0,268

p - jednoczynnikowa regresja logistyczna, zależność nieistotna statystycznie ( $p > 0,05$ )



Wykres 24. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od czasu karmienia piersią



### 6.9.3 Czynniki środowiskowe

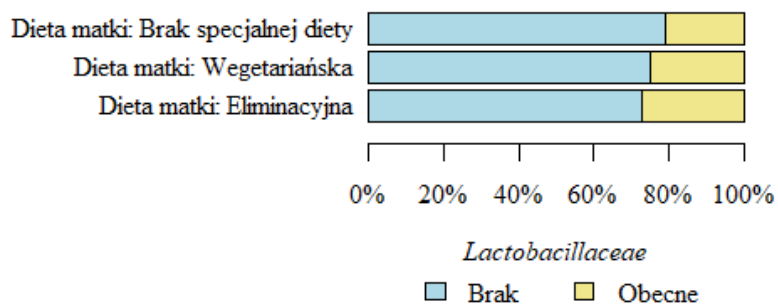
- Dieta matki oraz nawyki żywieniowe

Na wykresach 25.–28. oraz w tabeli 29. zamieszczono dane dotyczące prawdopodobieństwa wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od diety stosowanej przez matkę.

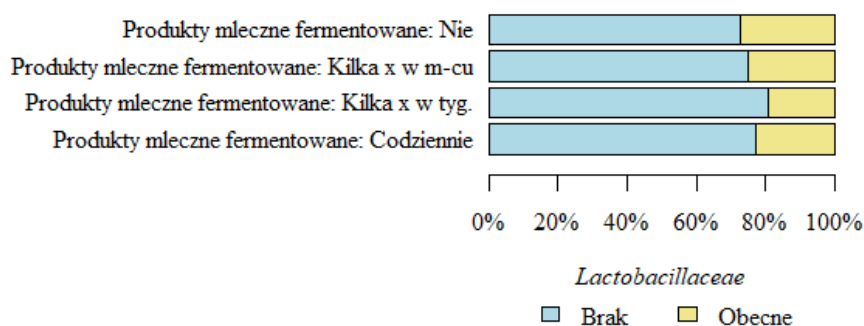
Tabela 29. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od stosowanej diety i nawyków żywieniowych

<b>Dieta matki</b>	<b><i>Lactobacillaceae</i></b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>		<b>p</b>
Brak specjalnej diety (N = 48)	10 (20,83%)	1	ref.		
Wegetariańska (N = 4)	1 (25,00%)	1,267	0,119	13,522	0,845
Eliminacyjna (N = 11)	3 (27,27%)	1,425	0,318	6,378	0,643
<b>Produkty mleczne fermentowane</b>	<b><i>Lactobacillaceae</i></b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>		<b>p</b>
Nie (N = 11)	3 (27,27%)	1	ref.		
Kilka x w m-cu (N = 8)	2 (25,00%)	0,889	0,111	7,107	0,912
Kilka x w tyg. (N = 31)	6 (19,35%)	0,64	0,129	3,165	0,584
Codziennie (N = 13)	3 (23,08%)	0,8	0,126	5,092	0,813
<b>Żywność wysokoprzetworzona</b>	<b><i>Lactobacillaceae</i></b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>		<b>p</b>
Nie (N = 31)	6 (19,35%)	1	ref.		
Kilka x w m-cu (N = 17)	6 (35,29%)	2,273	0,598	8,64	0,228
Kilka x w tyg. (N = 14)	2 (14,29%)	0,694	0,122	3,965	0,682
Codziennie (N = 1)	0 (0,00%)	---	---	---	---
<b>Produkty kiszone</b>	<b><i>Lactobacillaceae</i></b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>		<b>p</b>
Nie (N = 6)	2 (33,33%)	1	ref.		
Kilka x w tyg. (N = 18)	4 (22,22%)	0,571	0,075	4,345	0,589
Kilka x w m-cu (N = 36)	8 (22,22%)	0,571	0,088	3,709	0,558
Codziennie (N = 3)	0 (0,00%)	---	---	---	---

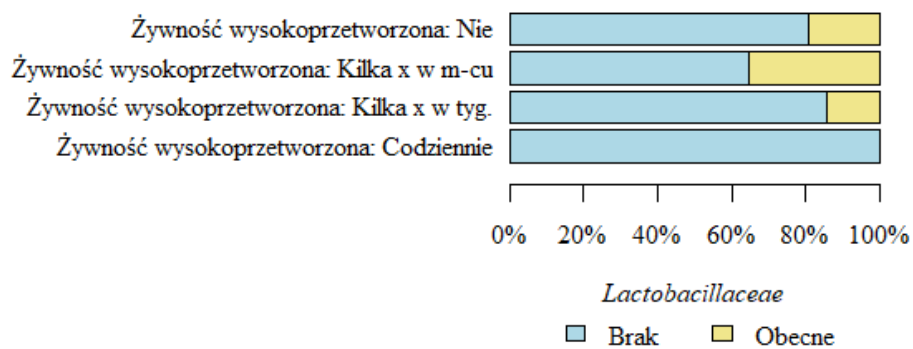
p - jednoczynnikowa regresja logistyczna, zależność nieistotna statystycznie ( $p > 0,05$ )



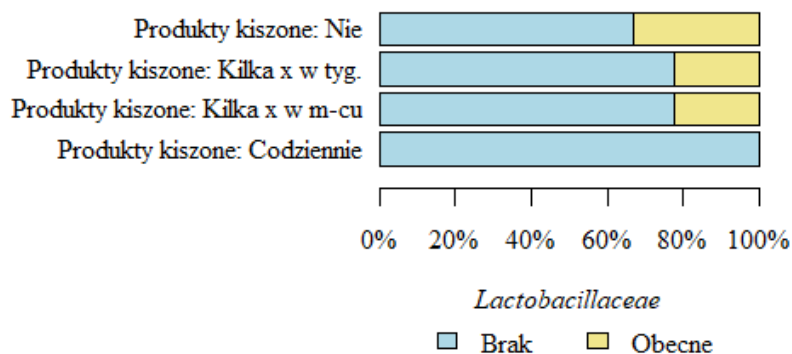
Wykres 25. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od stosowanej przez matkę diety



Wykres 26. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od częstotliwości spożycia przez matkę mlecznych produktów fermentowanych



Wykres 27. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od częstotliwości spożycia przez matkę żywności wysokoprzetworzonej



Wykres 28. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od częstotliwości spożywania przez matkę produktów kiszonych

Na podstawie uzyskanych wyników nie zaobserwowano znaczących różnic w występowaniu bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiet stosujących różne rodzaje diety. Na wyniki nie wpłynęła również częstotliwość spożywania mlecznych produktów fermentowanych. Bakterie należące do *Lactobacillaceae* izolowane były częściej z próbek mleka pochodzących od kobiet rzadko spożywających wysokoprzetworzoną żywność (kilka razy w miesiącu) oraz niestosujących w swojej diecie produktów kiszonych. Wyniki nie były istotne statystycznie.

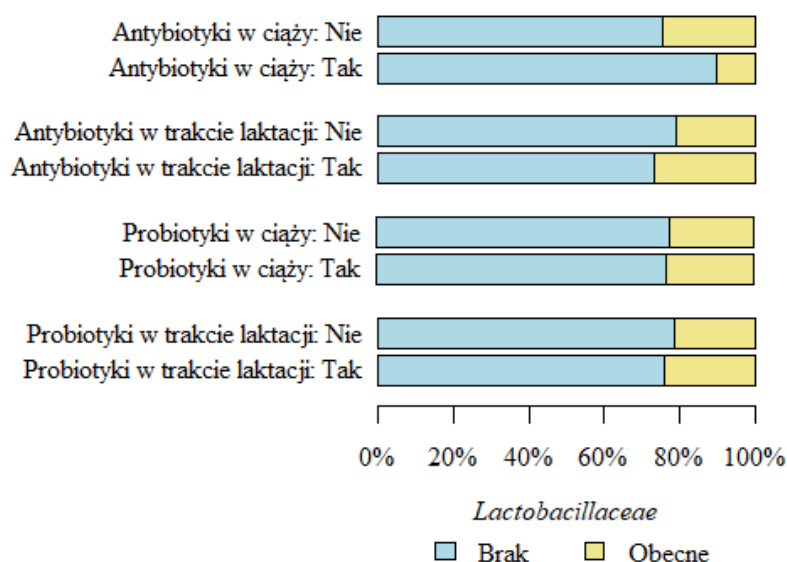
- Stosowanie przez matkę probiotyków i antybiotyków w ciąży oraz w okresie laktacji

W ankiecie uwzględniono stosowanie, przez kobiety biorące udział w badaniu, antybiotyków oraz preparatów probiotycznych jako potencjalnego źródła bakterii o charakterze probiotycznym. Wykres 29. oraz tabela 30. przedstawiają prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od przyjmowania antybiotyków oraz probiotyków, zarówno w trakcie trwania ciąży, jak i okresie laktacji.

Tabela 30. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od przyjmowania antybiotyków i preparatów probiotycznych w czasie trwania ciąży i w okresie laktacji

Probiotyki w ciąży	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI	p
Nie (N = 50)	11 (22,00%)	1	ref.	
Tak (N = 13)	3 (23,08%)	1,064	0,249	4,55
Probiotyki w trakcie laktacji	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI	p
Nie (N = 42)	9 (21,43%)	1	ref.	
Tak (N = 21)	5 (23,81%)	1,146	0,33	3,982
Antybiotyki w ciąży	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI	p
Nie (N = 53)	13 (24,53%)	1	ref.	
Tak (N = 10)	1 (10,00%)	0,342	0,039 2,96	0,33
Antybiotyki w trakcie laktacji	<i>Lactobacillaceae</i>	OR	95% CI	p
Nie (N = 48)	10 (20,83%)	1	ref.	
Tak (N = 15)	4 (26,67%)	1,382	0,362	5,276

p - jednoczynnikowa regresja logistyczna, zależność nieistotna statystycznie (p>0,05)



Wykres 29. Prawdopodobieństwo występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od przyjmowania antybiotyków i preparatów probiotycznych w czasie trwania ciąży i w okresie laktacji

Uzyskane wyniki pozwalają wskazać tendencję do częstszego identyfikowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w próbkach mleka pochodzących od kobiet

niestosujących antybiotykoterapii w trakcie trwania ciąży. W przypadku pozostałych zmiennych (stosowanie antybiotyków w okresie laktacji oraz probiotyków w czasie trwania ciąży i okresie laktacji) nie obserwuje się wyraźnych zmian. Wyniki nie były istotne statystycznie.

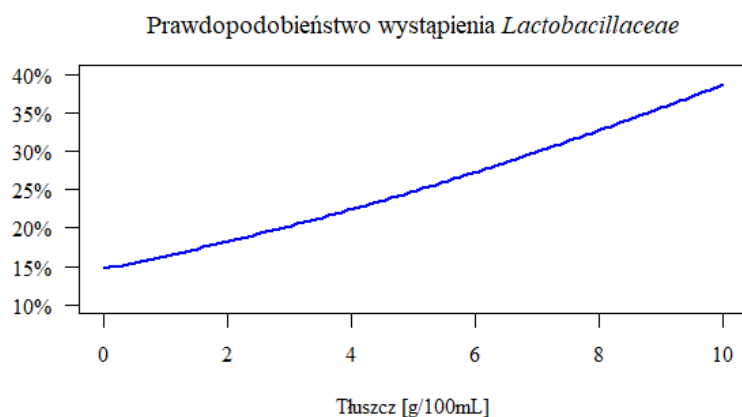
#### 6.9.4 Ocena zależności występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w grupie kobiet karmiących piersią poddanej badaniu składu mleka kobiecego

Częstotliwość identyfikowania *Lactobacillaceae* w próbkach mleka kobiecego przeanalizowano w korelacji z makroskładnikami (tabela 31.). Na wykresie 30. uwzględniono zależność pomiędzy ilością tłuszczu w mleku kobiecym a występowaniem omawianych drobnoustrojów. Zaobserwowano tendencję do częstszego występowania *Lactobacillaceae* w próbkach mleka kobiecego o większym udziale tłuszczu w swoim składzie. Podobna zależność została odnotowana w nawiązaniu do zawartości suchej masy, węglowodanów oraz wartości energetycznej mleka kobiecego, co zostało przedstawione na wykresach 33.–35. Odwrotna sytuacja miała miejsce w przypadku zawartości białka całkowitego oraz odżywczego w składzie mleka kobiecego. Większy udział białka wiązał się z mniejszym prawdopodobieństwem wystąpienia bakterii należących do *Lactobacillaceae*. Sytuację tę obrazują wykresy 31. oraz 32. Wyniki nie były istotne statystycznie.

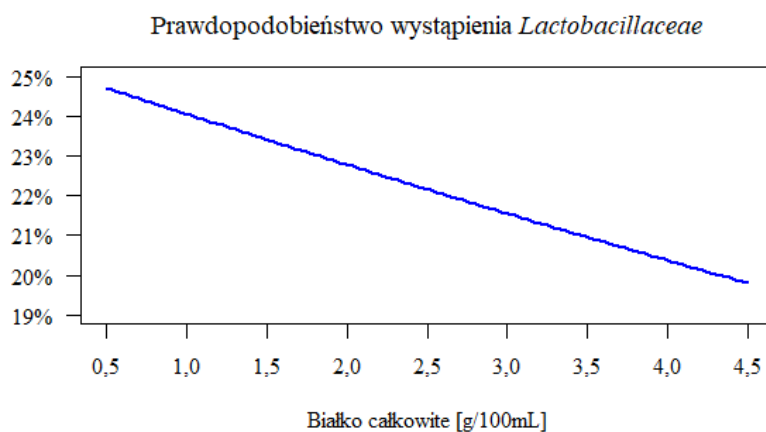
Tabela 31. Dane statystyczne dotyczące prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od składu mleka kobiecego

Cecha		OR	95%CI		p
Tłuszcz	g/100 mL	1,139	0,796	1,629	0,477
Węglowodany	g/100 mL	2,477	0,361	16,976	0,356
Sucha masa	g/100 mL	1,223	0,889	1,683	0,217
Białko całkowite	g/100 mL	0,931	0,234	3,709	0,919
Białko odżywcze	g/100 mL	0,892	0,155	5,128	0,898
Wartość energetyczna	kcal/100 mL	1,014	0,977	1,052	0,46

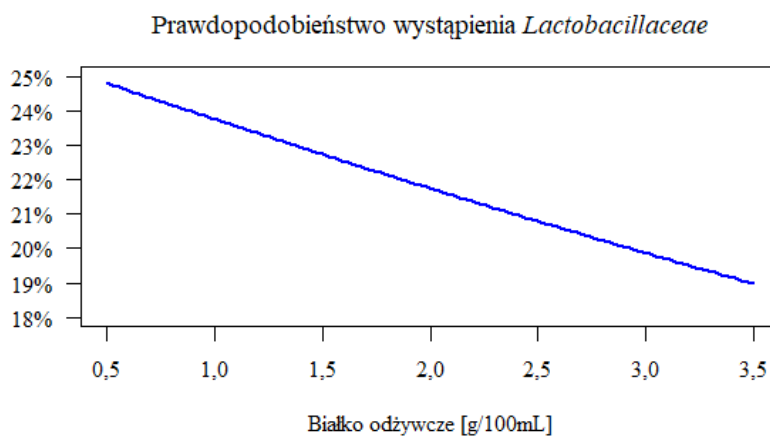
p - jednoczynnikowa regresja logistyczna, zależność nieistotna statystycznie ( $p > 0,05$ )



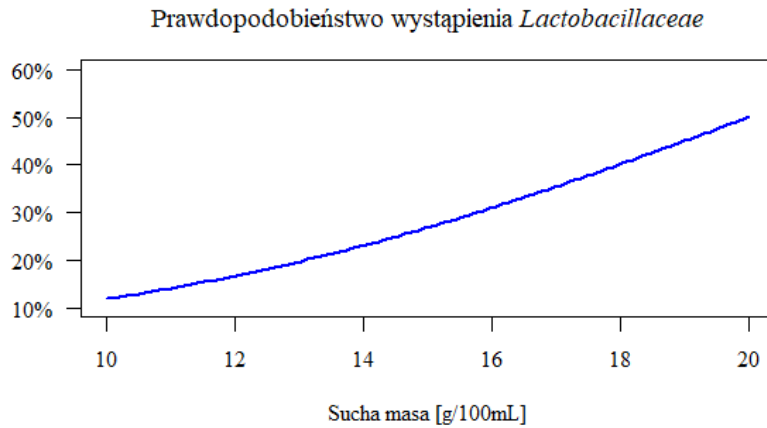
Wykres 30. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od zawartości tłuszczu w mleku kobiecym



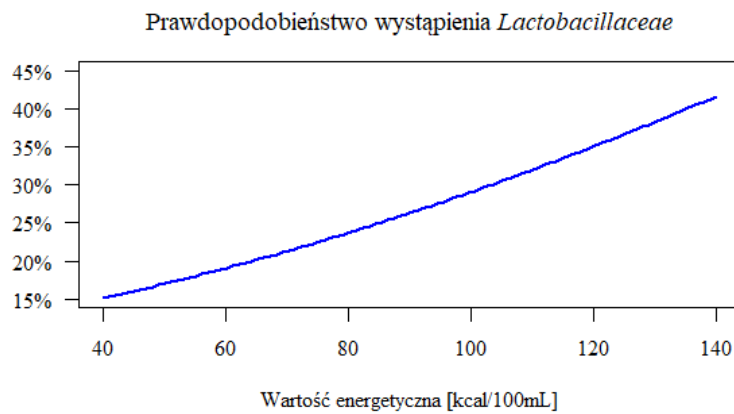
Wykres 31. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od zawartości białka całkowitego w mleku kobiecym



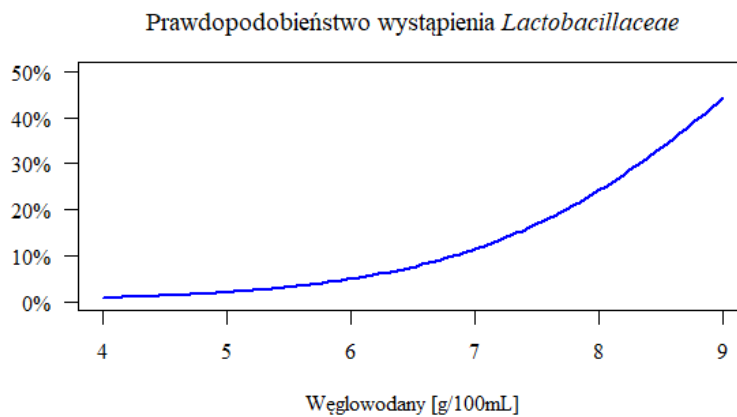
Wykres 32. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od zawartości białka odżywczego w mleku kobiecym



Wykres 33. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od zawartości suchej masy w mleku kobiecym



Wykres 34. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od wartości energetycznej mleka kobiecego



Wykres 35. Prawdopodobieństwo wystąpienia *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od zawartości węglowodanów w mleku kobiecym

## 7 Dyskusja

### 7.1 Mikrobiota mleka kobiecego – liczebność i zróżnicowanie

Do końca XX wieku mleko kobiece było uznawane za środowisko wolne od mikroorganizmów, a ich pojawianie się utożsamiano ze stanem patologicznym (Kim i wsp. 2000; Lyons i wsp. 2020). Rozwój technik diagnostycznych oraz wzrastające zainteresowanie badaczy biologią mleka kobiecego doprowadziły do identyfikacji szerokiego spektrum bakterii komensalnych zasiedlających tę niszę. Dalsze badania pozwoliły na lepsze zrozumienie roli mikroorganizmów zasiedlających środowisko mleka kobiecego, wśród których wymienić można m.in. wpływ na kształtowanie mikrobiomu jelitowego dziecka karmionego piersią, a co za tym idzie, wielokierunkowe oddziaływanie na ogólny stan zdrowia organizmu (Civardi i wsp. 2013; Martin i wsp. 2007). Ogólna liczba drobnoustrojów w mleku kobiecym jest zróżnicowana i zależy od wielu czynników, zarówno matczynych, jak i środowiskowych. Mleko pochodzące od zdrowych kobiet karmiących piersią może zawierać  $10^3$ – $10^5$  jtk/mL (Li i wsp., 2017). Inne dane literaturowe wskazują na rozpiętość w przedziale od  $10^1$  do  $10^7$  jtk/mL (Sakwinska, 2016).

Badania, będące przedmiotem niniejszej pracy, wykazały obecność drobnoustrojów na poziomie  $10^3$  jtk/mL. Stosunkowo niska liczebność bakterii zawartych w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu wynikać może ze specyfiki prowadzenia badań mikrobiologicznych oraz konieczności zachowania wysokiego poziomu higieny w czasie pobierania próbek mleka do badań.

Dotychczasowe badania potwierdziły obecność ponad 800 gatunków bakterii zasiedlających środowisko mleka kobiecego (Notarabło i wsp., 2022). Badania wykonane na potrzeby niniejszej pracy również potwierdziły zróżnicowanie mikrobiologiczne poszczególnych próbek mleka kobiecego. Wśród najczęściej identyfikowanych bakterii znalazły się gronkowce *Staphylococcus epidermidis* identyfikowane w przypadku 80,95% próbek mleka kobiecego poddanych analizie mikrobiologicznej oraz paciorkowce: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus vestibularis* oraz *Streptococcus parasanguinis* identyfikowane odpowiednio w 31,75%, 26,98%, 20,63%, 19,05% oraz 15,87% próbek mleka kobiecego. Badania przeprowadzone przez Rosiak i wsp. (2020) związane z określaniem



wpływu procesu mrożenia na bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka kobiecego wiązały się również z identyfikacją mikroorganizmów komensalnych w próbkach mleka kobiecego. W wyniku analiz zidentyfikowano bakterie należące do *Staphylococcus* spp. i *Streptococcus* spp., które dominowały w badanych próbkach. Zidentyfikowane gatunki to: *Streptococcus cristatus*, *S. mitis*., *S. peroris*, *S. parasanguis* oraz *S. salivarius*.

## 7.2 Obecność bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym i ocena jej zależności od różnorodnych czynników

Liczne badania wskazują na obecność w składzie mleka kobiecego bakterii o potencjalnym oddziaływaniu probiotycznym. Mikrobiota mleka kobiecego jest złożona i podlega wielu czynnikom determinującym jej skład zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym. Oprócz rdzenia mikrobiologicznego danego ekosystemu, powtarzającego się w większości próbek poddawanych analizie mikrobiologicznej, dużą część mikrobiomu stanowią drobnoustroje, których obecność w mleku kobiecym nie jest stała. Do grupy drobnoustrojów, których obecność jest zmienna osobniczo, należą bakterie zaliczane do *Lactobacillaceae* (Jost i wsp., 2013). Zidentyfikowano wiele bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* oraz poprzedniego rodzaju *Lactobacillus*, m.in.: *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* oraz *L. salivarius*, *L. casei*, *L. gastricus*, *L. reuteri* oraz *L. vaginalis*. Wśród bakterii należących do *Lactobacillaceae* najczęściej izolowane są: *L. salivarius*, *L. fermentum* oraz *L. gasseri* (Olivieres i wsp. 2006; Li i wsp. 2020; Martin i wsp., 2005; Martin i wsp., 2007).

Wyniki badań przeprowadzonych na odmiennych grupach badawczych znacząco różnią się między sobą. Wynika to z naturalnej zmienności składu mleka kobiecego oraz różnorodnych czynników oddziałujących na organizm kobiety w okresie laktacji. Badania przeprowadzone przez Soto i wsp. (2014) potwierdziły obecność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w 40,91% badanych próbek mleka kobiecego. W badaniu tym najczęściej izolowano *L. salivarius* (35%), *L. fermentum* (25%) oraz *L. gasseri* (21,88%). W wielu badaniach dotyczących składu mikrobiologicznego mleka wyniki wskazywały na bardzo wąskie spektrum poszczególnych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w mleku kobiecym. W próbkach mleka kobiecego, w których

identyfikowano bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, przeważnie występował tylko jeden określony szczep bakteryjny. Zdarzały się także próbki mleka kobiecego, w których można było zidentyfikować jednocześnie dwa szczepy bakterii z ówczesnego rodzaju *Lactobacillus* (Martin i in., 2007). Badania przeprowadzone na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej również wskazują na ograniczoną różnorodność bakterii należących do *Lactobacillaceae* identyfikowanych w pojedynczej próbce mleka kobiecego. Tylko jedna próbka mleka włączona do badań zawierała dwa rodzaje bakterii, były nimi *Lactobacillus gasseri* oraz *Lactiplantibacillus plantarum*. Pozostałe próbki mleka kobiecego, w których zidentyfikowano bakterie należące do *Lactobacillaceae*, zawierały tylko jeden rodzaj.

Chociaż całkowita liczba uczestniczek (63) oraz pozyskanych od nich próbek mleka kobiecego (63) była znacząca, próbki dodatnie pod kątem występowania w nich bakterii należących do *Lactobacillaceae* nie stanowiły wystarczająco dużej grupy, aby móc wskazać zależności pomiędzy badanym czynnikiem a wskazaną cechą. Stanowi to ograniczenie przeprowadzonych badań, wskazując dalszy kierunek badawczy. Częstotliwość występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym jest zróżnicowana. W niniejszej pracy uzyskano wynik 22,2% próbek dodatnich pod względem obecności omawianych drobnoustrojów. Soto i wsp. (2014) uzyskali wynik 40,91% próbek zawierających bakterie należące do ówczesnego rodzaju *Lactobacillus*. Aby móc zaobserwować istotne statystycznie zależności pomiędzy obecnością ww. bakterii a czynnikami towarzyszącymi, potrzebna jest większa grupa próbek mleka kobiecego dodatnich pod względem obecności *Lactobacillaceae*.

### 7.2.1 Czynniki matczyne

- **Wiek matki**

Wyniki badań podjętych przez Taghizadeh i wsp. (2015) wykazały, że wraz ze wzrostem wieku kobiety karmiącej piersią o rok średnia liczebność bakterii należących do *Lactobacillaceae* w jej mleku maleje o współczynnik  $\exp(-0,068) = 0,93$ . W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej również zaobserwowano zmniejszające się prawdopodobieństwo występowania *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym wraz z zaawansowaniem wieku kobiety będącej w okresie laktacji. Wyniki nie były jednak istotne statystycznie.

- **Miejsce zamieszkania**

Wyniki badań przeprowadzonych przez Sinkiewicz i Nordström (2005) wykazały, że mleko kobiece pozyskane od kobiet pochodzących z obszarów wiejskich zawiera więcej bakterii kwasu mlekowego niż mleko pozyskane od kobiet mieszkających w aglomeracjach miejskich. W badaniu tym skupiono się również nad różnicami w składzie mikrobiologicznym mleka w zależności od kraju pochodzenia kobiet karmiących piersią. Naukowcy wykazali, że mleko japońskich kobiet wykazuje najwyższą częstotliwość kolonizacji *L. reuteri* w porównaniu z kobietami z innych krajów poddanych badaniu. Z kolei praca badawcza wykonana przez Sinkiewicz i Ljunggren (2008) wykazała obecność *L. reuteri* w około 15% przebadanych próbek mleka kobiecego. W badaniu tym nie stwierdzono różnic pomiędzy obecnością badanych bakterii w próbkach mleka kobiecego pochodzących z obszarów wiejskich vs. z obszarów miejskich, natomiast duże różnice dotyczyły regionu geograficznego, z którego pochodziły badane kobiety. Wykazano większą częstość występowania bakterii *L. reuteri* w mleku kobiet karmiących piersią pochodzących z Japonii oraz Szwecji w porównaniu z kobietami mieszkającymi w południowej Afryce, Izraelu oraz Danii. W badaniach dotyczących pracy doktorskiej bakterie należące do *Lactobacillaceae* występowały częściej u kobiet zamieszkujących tereny wiejskie (28,57%). Z racji niejednorodności grup uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie.

- **BMI**

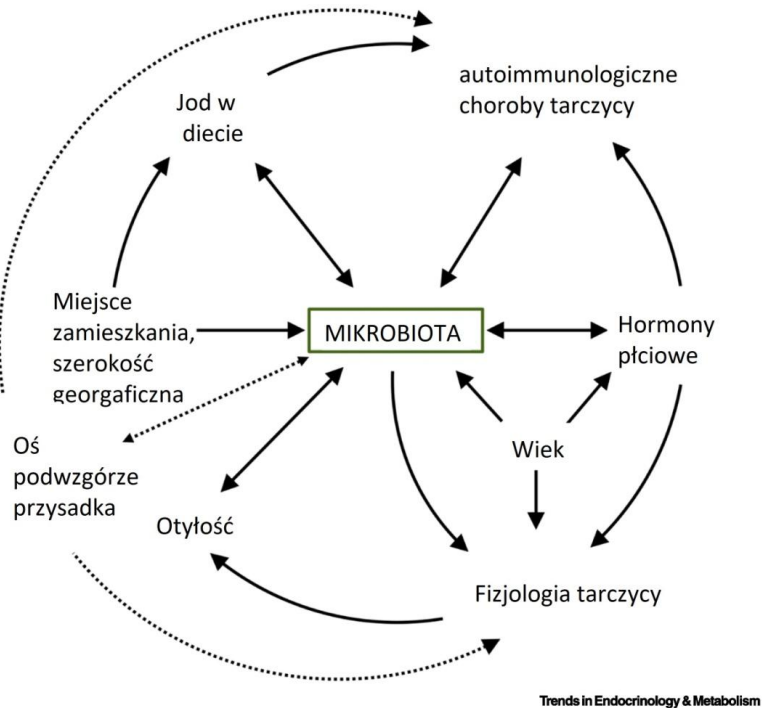
Badania wykonane przez Cabrera-Rubio i wsp. (2012) dowodzą, że mleko kobiece pochodzące od matek o BMI wskazującym na otyłość charakteryzowało się wyższą ogólną liczbą bakterii w swoim składzie. Zaobserwowano również różnice dotyczące poszczególnych drobnoustrojów. W próbkach mleka kobiecego pochodzących od kobiet o wysokim wskaźniku BMI, > 25, zidentyfikowano większą liczbę bakterii należących do *Staphylococcus* oraz dawnego rodzaju *Lactobacillus*. Jednocześnie próbki te charakteryzowały się mniejszą zawartością *Bifidobacterium*. Zmiany, o których mowa, obserwowane były w ciągu pierwszych sześciu miesięcy laktacji (Cabrera-Rubio i wsp., 2012). W badaniach przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy nie zauważono wpływu masy ciała kobiety przed zajściem w ciążę na obecność *Lactobacillaceae* w składzie mleka kobiecego w okresie laktacji. W badaniu

dotyczącym częstotliwości występowania ww. drobnoustrojów w mleku kobiecym w odniesieniu do wskaźnika BMI w okresie laktacji zaobserwowano większą częstotliwość izolowania *Lactobacillaceae* z próbek mleka kobiecego pochodzącego od kobiet o indeksie BMI wskazującym na otyłość, jak również w grupie kobiet o wskaźniku BMI poniżej normy.

- **Choroby tarczycy**

Tarczyca, poprzez wytwarzane hormony, ma wpływ na różne aspekty związane z funkcjonowaniem organizmu. Prawidłowy poziom hormonów tarczycy istotny jest m.in. dla zachowania optymalnego poziomu metabolizmu, samopoczucia czy też gospodarki mineralnej organizmu. Badania dowodzą, że funkcjonowanie tarczycy wywiera wpływ również na mikrobiotę jelitową. Dzieje się tak za sprawą pobudzania do różnicowania enterocytów, jak również wzmacniania połączeń międzykomórkowych w błonie śluzowej jelita (Fröhlich i Wahl, 2019). Pochodzenie bakterii zawartych w mleku kobiecym jest w dalszym ciągu przedmiotem badań. Przyjmuje się, że głównymi źródłami identyfikowanych w mleku kobiecym drobnoustrojów jest mikrobiom jelitowy matki, drobnoustroje pochodzenia skórnoo oraz mikroflora jamy ustnej dziecka karmionego piersią. Z tego względu można przypuszczać, że zaburzenia mikrobioty przewodu pokarmowego, wywołane schorzeniami tarczycy kobiety karmiącej piersią, mogą przekładać się na kompozycję mikrobiologiczną mleka kobiecego. Rysunek 8. przedstawia zależności pomiędzy mikrobiomem organizmu a różnorodnymi czynnikami, w tym funkcjonowaniem gruczołu tarczycy. Z drugiej strony to zaburzenia w homeostazie mikrobiomu jelitowego mogą wtórnie indukować stany patologiczne tarczycy. Oddziaływanie to uwarunkowane jest wpływem na dostępność mikroelementów koniecznych dla prawidłowego funkcjonowania tarczycy. Drugi mechanizm biorący udział w tej zależności to, powodowane dysbiozą jelitową, uszkodzenie bariery jelitowej, co skutkuje wzrostem jej przepuszczalności. Sprzyja to przenikaniu antygenów i nadmiernej aktywacji układu odpornościowego, skutkującego wyzwoleniem chorób autoimmunologicznych, wśród których wyróżnić można choroby tarczycy. Zależności pomiędzy mikrobiotą a czynnikami, takimi jak zaburzenia pracy tarczycy, przedstawiono na rysunku 8. W dostępnej literaturze nie ma danych odnoszących się bezpośrednio do zależności pomiędzy stanem klinicznym

gruczołu tarczycy a składem mikrobiologicznym mleka kobiecego. W badaniach dotyczących niniejszej pracy, ze względu na ograniczenia liczebności grupy kobiet, w mleku których zidentyfikowano bakterie należące do *Lactobacillaceae*, nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy grupami kobiet różniących się obecnością *Lactobacillaceae* w składzie mleka.



Rysunek 8. Zależności pomiędzy mikrobiomem organizmu a różnorodnymi czynnikami, w tym funkcjonowaniem tarczycy (modyfikacja własna na podstawie Fröhlich i Wahl, 2019)

- **Cukrzyca**

W badaniach przeprowadzonych przez Wang i wsp. (2018) zaobserwowano różnice między mikrobiomem kobiet, które cierpiały na cukrzycę ciążową, oraz ich dzieci a mikrobiomem zdrowych kobiet oraz dzieci przez nie urodzonych. Stwierdzono, że występowanie cukrzycy ciążowej może zmienić mikrobiom kobiety będącej w ciąży, jak również jej dziecka. W takim przypadku można przypuszczać, że obserwowana dysbioza jelitowa, powiązana z występowaniem choroby u kobiety karmiącej piersią, może oddziaływać na mikrobiologiczny skład mleka kobiecego. Literatura dysponuje ograniczonymi danymi w tym zakresie. W badaniach przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy zaobserwowano występowanie bakterii należących do *Lactobacillaceae* tylko wśród kobiet, które nie cierpiały

na cukrzycę w trakcie ciąży. Wyniki te z uwagi na niską liczebność grupy nie były istotne statystycznie.

## 7.2.2 Czynniki okołoporodowe

- **Rodzaj porodu**

Naukowcy, w przeprowadzanych badaniach, uzyskują niejednoznaczne wyniki dotyczące wpływu rodzaju porodu na skład mikrobioty mleka kobiecego. Wyniki części badań wskazują, że poród siłami natury skorelowany jest z dużą różnorodnością drobnoustrojów w mleku kobiecym, a także wysoką częstotliwością występowania *Bifidobacterium* spp. i bakterii należących do *Lactobacillaceae* w składzie mleka kobiecego. Badania podjęte przez Lyons i wsp. (2022) na grupie 80 kobiet karmiących piersią koncentrowały się na składzie mikrobiologicznym mleka kobiecego oraz jego ewolucją w czasie od urodzenia dziecka do 6. miesiąca po porodzie. W badaniu tym nie odnotowano wpływu rodzaju porodu na mikrobiom mleka kobiecego za to czynnikiem, który istotnie przyczyniał się do zmiany jego składu, był etap laktacji. Badania przeprowadzone przez Soto i wsp. (2014) wskazały, że przebycie ciąży cesarskiego wiąże się z niższą częstotliwością występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym, jednak wyniki te nie były istotne statystycznie. W badaniach wykonanych na potrzeby pracy doktorskiej nie zaobserwowano różnic w występowaniu *Lactobacillaceae* w próbkach mleka kobiecego w zależności od sposobu porodu. Wyniki nie były istotne statystycznie.

- **Dokarmianie dziecka mlekiem modyfikowanym**

Badania podjęte przez Li i wsp. (2018) wskazały na wpływ wyłącznego karmienia piersią na skład mikrobioty mleka kobiecego. Dominujący udział karmienia piersią związany był z większą liczebnością bakterii należących do *Corynebacteriaceae*, *Lactobacillaceae* oraz *Rhodobacteraceae* w porównaniu z mieszanym sposobem karmienia dziecka. W badaniach przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy również zaobserwowano częstsze występowanie bakterii przynależnych do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym pochodzącym od matek, których dziecko nie było dokarmiane mlekiem modyfikowanym, chociaż wyniki nie były istotne statystycznie.

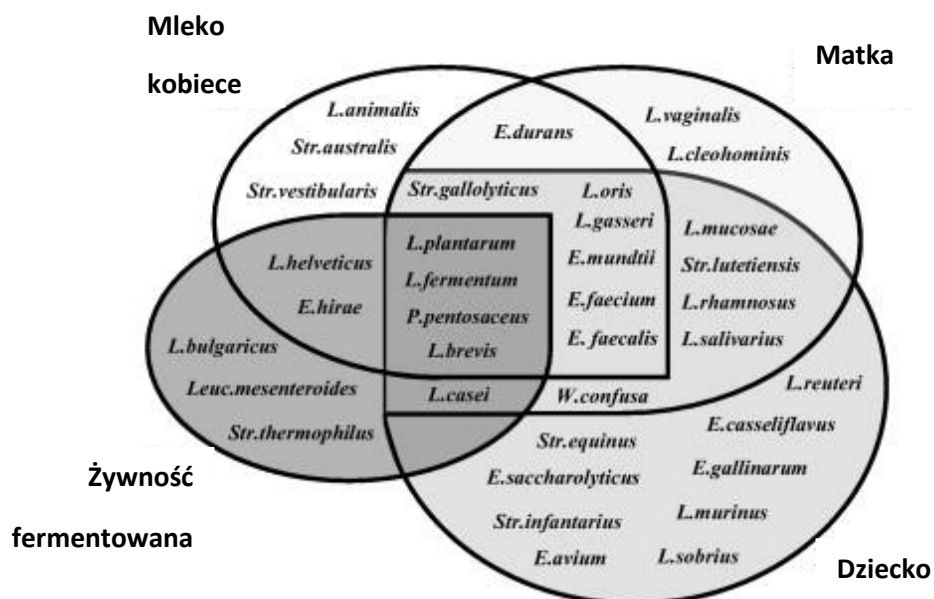
- **Czas karmienia piersią / długość laktacji**

W badaniach przeprowadzonych przez Lopez Leyva i wsp. (2021) bakterie należące do *Lactobacillaceae* występowały w środowisku mleka kobiecego w większej ilości na etapie wczesnej laktacji niż w okresach późniejszych. W niniejszej pracy również zaobserwowano tendencję spadkową w odniesieniu do prawdopodobieństw wystąpienia bakterii należących do *Lactobacillaceae* w odniesieniu do czasu karmienia piersią (długości laktacji). Wraz z upływem czasu prawdopodobieństwo występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* malało. Wyniki nie były istotne statystycznie.

### 7.2.3 Czynniki środowiskowe

- **Dieta matki**

W badaniu przeprowadzonym przez Albesharat i wsp. (2011) izolowano bakterie kwasu mlekowego z próbek kału kobiet karmiących piersią mieszkających w Syrii, kału dzieci karmionych piersią w wieku niemowlęcym, mleka kobiecego oraz fermentowanej żywności spożywanej w Syrii. Za pomocą techniki MALDI-TOF/MS oraz sekwencjonowania 16S rDNA zidentyfikowano trzydzieści sześć różnych gatunków bakterii należących do *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* i *Pediococcus*.



Rysunek 9. Identyfikacja drobnoustrojów z różnych rodzajów materiałów: kał matki i dziecka, mleko kobiece i żywność, z zaznaczeniem elementów wspólnych (modyfikacja na podstawie Albesharat i wsp., 2011)

Wyniki podjętych badań wskazały, że *L. plantarum* jest jedną z dominujących bakterii kwasu mlekowego w mikroflorze jelitowej społeczności syryjskiej. Identyfikowano ją w prawie wszystkich próbkach kału poddanych badaniom. Równocześnie *L. plantarum* zidentyfikowano jako dominujący gatunek bakterii należących do *Lactobacillaceae* w tradycyjnej fermentowanej żywności opartej na materiale roślinnym. Badacze doszli do wniosku, że izolaty jelitowe pochodziły prawdopodobnie z fermentowanych warzyw, stanowiących duży udział diety mieszkańców Syrii. Badanie potwierdziło postawioną hipotezę, że istnieje pionowy transfer bakterii kwasu mlekowego z przewodu pokarmowego kobiety karmiącej piersią do jej mleka, a przez nie do przewodu pokarmowego dziecka (Albesharat i wsp., 2011). Na rysunku 9. przedstawiono bakterie identyfikowane z różnych materiałów, z zaznaczeniem elementów wspólnych.

W badaniach podjętych w pracy doktorskiej nie wykazano zależności pomiędzy spożywaniem produktów fermentowanych lub kiszonych a identyfikacją bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym.

Kolejnym aspektem związanym z praktykami żywieniowymi kobiet karmiących piersią, podjętym w niniejszej pracy, była częstotliwość spożywania żywności wysokoprzetworzonej. Żywność ta obejmuje szeroką gamę produktów spożywczych. Obserwuje się globalny trend wzrostu udziału żywności wysokoprzetworzonej w diecie. Spożywanie produktów zaliczanych do tej kategorii wiąże się m.in. ze wzrostem ryzyka wystąpienia chorób układu krążenia, nadwagi i otyłości, cukrzycy, chorób przewodu pokarmowego czy też chorób nowotworowych (Zhang i Giovannucci, 2022). Badania przeprowadzone przez Esquivel-Velázquez i wsp. (2022) wykazały zależność pomiędzy spożywaniem słodzików, będących częstym składnikiem żywności wysokoprzetworzonej, a zmniejszoną koncentracją bakterii należących do *Lactobacillaceae* w sianie kobiet karmiących piersią. W niniejszych badaniach nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w częstotliwości występowania *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym w zależności od częstotliwości spożywania żywności wysokoprzetworzonej przez kobiety w okresie laktacji. Przyczyną może być nierównomierność liczebna grup.



- **Stosowanie probiotyków w trakcie trwania ciąży i w okresie laktacji**

Badania przeprowadzone przez Abrahamsson i wsp. (2009) wskazują, że szczepy bakterii probiotycznych przyjmowanych doustnie przez kobiety karmiące piersią są możliwe również do zidentyfikowania w składzie mikrobioty mleka kobiecego pochodzącego od tych kobiet. Przedmiotem badań w tym wypadku był szczep *L. reuteri*, który charakteryzuje się właściwościami probiotycznymi. Z kolei badania prowadzone na modelu zwierzęcym wykazały związek między podażą probiotyków myszom ciężarnym i karmiącym a zwiększoną wykrywalnością mikroflory probiotycznej zawartej w mleku tychże zwierząt (Reven i wsp., 2015). Badania przeprowadzone przez Mastromarino i wsp. (2015) na grupie 66 kobiet, z których 33 codziennie przyjmowało probiotyk, a kolejne 33 placebo, wykazały, że ilość pałeczek kwasu mlekowego oraz bifidobakterii były znacznie wyższe w sianie oraz dojrzałym mleku kobiet przyjmujących preparat probiotyczny. Wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy nie wykazały tendencji do zwiększonego prawdopodobieństwa występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae*, będących bakteriami kwasu mlekowego, w grupie kobiet przyjmujących preparaty probiotyczne w porównaniu z grupą, która takich preparatów nie przyjmowała.

- **Antybiotykoterapia w trakcie trwania ciąży i w okresie laktacji**

Antybiotyki stosowane są w terapii 30 do 50% kobiet będących w ciąży lub w okresie laktacji (Thomas i wsp., 2023). Badania przeprowadzone przez Soto i wsp. (2014) na 66 próbkach mleka kobiecego wykazały niższą częstotliwość występowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w próbkach mleka pochodzących od kobiet stosujących antybiotykoterapię w trakcie ciąży lub w okresie laktacji. Hermansson i wsp. (2019) odnotowali wzrost różnorodności gatunkowej mikrobioty mleka kobiecego w przypadku zastosowania antybiotykoterapii w trakcie porodu. Padilha i wsp. (2019) zbadali wpływ profilaktyki antybiotykowej w trakcie porodu na obecność bakterii *Bifidobacterium* spp. oraz całkowitą liczbę bakterii obecnych w mleku kobiecym. Badania były przeprowadzane w pierwszym tygodniu oraz po pierwszym miesiącu od daty porodu. Uzyskane wyniki wskazują, że antybiotykoterapia w trakcie porodu ma znaczący wpływ na liczbę *Bifidobacterium* spp. zawartych w mleku kobiecym w pierwszym tygodniu po porodzie. W próbkach mleka kobiecego

pozyskanych od kobiet, którym podano antybiotyk w trakcie porodu, zaobserwowano mniejszą zawartość *Bifidobacterium* spp. Po upływie miesiąca od daty porodu nie obserwowano różnic w obecności *Bifidobacterium* spp. w próbkach mleka pozyskanych od kobiet poddanych i niepoddanych antybiotykoterapii.

W badaniu będącym częścią niniejszej pracy doktorskiej zaobserwowano mniejszą częstotliwość występowania *Lactobacillaceae* w mleku kobiet, które przyjmowały antybiotyki w czasie trwania ciąży w porównaniu z grupą kobiet niepoddanych antybiotykoterapii. Chociaż grupa 63 osób włączonych w badanie jest spora, to liczba 14 kobiet, u których zidentyfikowano bakterie należące do *Lactobacillaceae*, nie jest wystarczająco liczna, aby w sposób wiarygodny wyznaczyć zachodzące zależności.

### 7.3 Skład mleka kobiecego i jego wpływ na obecność bakterii należących do *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym

W podjętych badaniach oceniono częstotliwość identyfikowania bakterii należących do *Lactobacillaceae* w próbkach mleka kobiecego w nawiązaniu do składu pobranych próbek mleka kobiecego pod względem makroskładników. Uzyskane wyniki wskazały na tendencję do częstszego występowania *Lactobacillaceae* w próbkach mleka kobiecego o większym udziale tłuszczu, suchej masy, węglowodanów oraz wyższej wartości energetycznej. Zawartość białka całkowitego i odżywczego była odwrotnie proporcjonalna do częstości izolowania omawianych drobnoustrojów. Wyniki uzyskane w pracy doktorskiej nie są istotne statystycznie. Dostępna literatura dysponuje ograniczonymi danymi dotyczącymi wskazanych zależności. Niemniej jednak badania przeprowadzone przez Sun i wsp. (2019) wykazały, że szczep *L. reuteri* zawarty w próbkach mleka kobiecego związany był z kuleczkami tłuszczu, co może przekładać się na większą zawartość badanych drobnoustrojów w mleku o większym udziale tłuszczu w swoim składzie.

Badania składu próbek mleka kobiecego włączonych do badań dały jednak obraz zmian w zawartości makroskładników na przestrzeni poszczególnych etapów laktacji. Wyniki badań przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej wykazały tendencję wzrostową zawartości tłuszczu, suchej masy oraz wartości

energetycznej przebadanych próbek mleka kobiecego wraz z zaawansowaniem laktacji. Podobne zmiany zaobserwowała Czosnykowska-Łukacka i wsp. (2018). W tabeli 32. przedstawiono przykładowe porównanie wyników uzyskanych w niniejszej pracy w odniesieniu do wartości otrzymanych przez Czosnykowską-Łukacką i wsp. (2018).

Tabela 32. Zawartość makroskładników i energii w mleku kobiecym w poszczególnych etapach laktacji. Porównanie wyników własnych oraz Czosnykowska-Łukacka i wsp. (2018)

Węglowodany [g/100 mL]				
	1-12 mies.	12-18 mies.	18-24 mies.	>24 mies.
Czosnykowska-Łukacka i wsp. (2018)	7,09 ±0,43	7,03 ±0,56	6,56 ±0,93	6,29 ±0,99
Badania własne	7,7 ±0,8	8,0 ±0,2	8,2 ±0,3	8,1 ±0,6
Tłuszcz [g/100 mL]				
Czosnykowska-Łukacka i wsp. (2018)	3,46 ±0,87	4,91 ±2,04	5,77 ±2,28	7,95 ±2,48
Badania własne	4,0 ±1,4	4,2 ±1,4	4,5 ±2,1	7,5 ±1,4
Białko ogólne [g/100 mL]				
Czosnykowska-Łukacka i wsp. (2018)	1,08 ±0,25	1,04 ±0,38	1,24 ±0,64	1,85 ±0,87
Badania własne	1,5 ±0,6	1,2 ±0,2	1,2 ±0,2	1,7 ±0,4
Białko odżywcze [g/100 mL]				
Czosnykowska-Łukacka i wsp. (2018)	0,86 ±0,2	0,83 ±0,32	1 ±0,52	1,51 ±0,71
Badania własne	1,2 ±0,5	0,9 ±0,2	1,0 ±0,2	1,3 ±0,3
Sucha masa [g/100mL]				
Czosnykowska-Łukacka i wsp. (2018)	11,86 ±0,95	13,19 ±2,21	13,82 ±2	16,28 ±2,59
Badania własne	13,5 ±1,8	13,8 ±1,6	14,0 ±2,3	17,4 ±1,6
Wartość energetyczna [kcal/100 mL]				
Czosnykowska-Łukacka i wsp. (2018)	65,76 ±7,92	78,34 ±21,72	85,78 ±20,07	106,5 ±23,46
Badania własne	75,4 ±14,5	76,6 ±13,9	79,2 ±19,9	109,0 ±13,6

#### 7.4 Ocena wrażliwości wyizolowanych szczepów na wybrane antybiotyki

Ocena antybiotykooporności bakterii należących do *Lactobacillaceae* nie jest prostym zadaniem. Ogólne wytyczne EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) dotyczące badania antybiotykooporności z wykorzystaniem krążków antybiotykowych kategoryzują otrzymywane wyniki na trzy grupy przypisane trzem kategoriom wrażliwości:

- S – wrażliwy, standardowe dawkowanie: określenie to ma zastosowanie, kiedy istnieje wysokie prawdopodobieństwo skuteczności działania przy użyciu standardowego schematu dawkowania danego leku,
- I – wrażliwy, zwiększona ekspozycja (średniowrażliwy): dotyczy drobnoustrojów, w przypadku których istnieje wysokie prawdopodobieństwo skuteczności zastosowania antybiotyku przy zwiększeniu dawki
- R – oporny: dotyczy drobnoustrojów, w przypadku których istnieje wysokie prawdopodobieństwo niepowodzenia terapeutycznego nawet przy zwiększeniu ekspozycji na dany antybiotyk.

Ogólne wytyczne dotyczące podziału badanych drobnoustrojów określają następujące wielkości stref zahamowania wzrostu:

- S – średnica strefy zahamowania wzrostu większa lub równa 22 mm,
- R – średnica strefy mniejsza niż 18 mm
- I – strefa zahamowania wzrostu pomiędzy 18 a 21 mm (Hryniewicz i Żabicka, 2021).

Dla beztlenowych bakterii Gram-dodatnich, do których należą bakterie *Lactobacillaceae*, EUCAST nie wyznacza wartości granicznych stref zahamowania wzrostu. Metoda badania wrażliwości drobnoustrojów na środki przeciwdrobnoustrojowe mikroorganizmów należących do *Lactobacillaceae* nie została wystandaryzowana, nie ma zatem zatwierdzonych wytycznych dotyczących interpretacji wyników badań. Niemniej jednak w dostępnej literaturze odnaleźć można wiele pozycji odnoszących się do metody krążkowo-dyfuzyjnej, chociaż autorzy różnią się między sobą przyjmowanymi kryteriami oceny wyniku (Sharma i wsp. 2017; Faghfoori i wsp., 2017; Anisimova i wsp., 2022). Ze względu na różnice w sposobie przeprowadzania badań, a także kryteria dotyczące oceny uzyskanych wyników, publikacje te są trudne do porównania (Mayrhofer i wsp., 2008).

W niniejszej pracy wykonano badania dotyczące określenia stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów należących do *Lactobacillaceae* z uwagi na próbę porównania wyników z pracami innych autorów zajmujących się określaniem właściwości omawianych drobnoustrojów, mając na uwadze ograniczenia tej metody. Standardowym podłożem mikrobiologicznym zalecanym do przeprowadzania badania

lekowrażliwości jest podłoże Mueller-Hinton. Ze względu na słaby wzrost bakterii należących do *Lactobacillaceae* na ww. podłożu mikrobiologicznym wielu badaczy wybiera inne podłoża, stwarzające lepsze warunki wzrostu drobnoustrojów podczas inkubacji. Prowadzone badania porównawcze wykazały, że wyniki uzyskane z zastosowaniem podłoża Mueller-Hinton oraz innych rodzajów pożywek mikrobiologicznych różnią się między sobą. Z tego względu trudno o ocenę wrażliwości na antybiotyki, kierując się wytycznymi dedykowanymi standardowej procedurze oceny antybiotykooporności z zastosowaniem podłoża Mueller-Hinton (Ocaña i wsp., 2006). Niemniej jednak badanie z zastosowaniem pożywki sprzyjającej wzrostowi bakterii należących do *Lactobacillaceae* może znaleźć zastosowanie przy porównywaniu wrażliwości poszczególnych badanych szczepów względem antybiotyków w warunkach in vitro.

Badania przeprowadzone przez Sharma i wsp. (2017) wykazały, że wszystkie badane izolaty bakterii kwasu mlekowego, wyizolowane w badaniu ze środowiska mleka kobiecego, charakteryzowały się wrażliwością na  $\beta$ -laktamy, imipenem, meropenem oraz gentamycynę. Większość szczepów wrażliwa była również na ampicylinę, chloramfenikol oraz erytromycynę. Wszystkie wyizolowane szczepy wykazywały oporność na metycylinę oraz oksacylinę, glikopeptydy (do których należy wankomycyna) i chinolony. W przypadku penicyliny, cefalosporyn, klindamycyny, kwasu fusydowego, tetracykliny oraz trimetoprimu wrażliwość szczepów była zróżnicowana.

Według badania przeprowadzonego przez Rajoka i wsp. (2017) większość szczepów wyizolowanych z mleka kobiecego była oporna na streptomycynę, ampicylinę, gentamycynę, kanamycynę, penicylinę, cefaleksynę i cyprofloksacynę.

Wyniki badania przeprowadzonego przez Mohammadi i wsp. (2018) wykazały, że 94% testowanych izolatów należących do ówczesnego rodzaju *Lactobacillus* było opornych na streptomycynę (10  $\mu$ g) oraz wankomycynę (30  $\mu$ g). Dodatkowo 88% było opornych na kanamycynę (30  $\mu$ g), a 12% na gentamycynę (120  $\mu$ g).

Badania wykonane przez Zhou i wsp. (2005) wykazały wrażliwość szczepów należących do *Lactobacillaceae* względem ampicyliny (10  $\mu$ g), tetracykliny (30  $\mu$ g), erytromycyny (15  $\mu$ g) oraz oporność w stosunku do gentamycyny (10  $\mu$ g), kanamycyny

(30 µg), streptomycyny (10 µg). Badane szczepy charakteryzowały się zróżnicowaną wrażliwością na wankomycynę (30 µg).

Badania wrażliwości na antybiotyki przeprowadzone przez Meiling Jiang i wsp. (2016) wykazały, że szczep *L. plantarum*, wyizolowany ze środowiska mleka kobiecego, był wrażliwy na 8 z 14 testowanych antybiotyków (m.in. erytromycynę i nitrofurantoinę) oraz oporny na 6 z pozostałych chemioterapeutyków (m.in. kanamycynę i bacytracynę).

Wrażliwość na antybiotyki bakterii należących do *Lactobacillaceae* wykazuje duże różnice zależne od gatunku (Salminen wsp., 2006).

Interpretacja otrzymanych wyników badań różni się wśród autorów. Przykładowo wartości przyjęte przez Han i wsp. (2015), dotyczące przyporządkowania badanych drobnoustrojów do wrażliwych, średniowrażliwych bądź opornych na działanie chemioterapeutyku, zostały zestawione w tabeli 33.

Tabela 33. Wybrane kryteria oceny stref zahamowania wzrostu dla *Lactobacillaceae* wg Han i wsp., 2015

Antybiotyk	Stężenie zahamowania wzrostu (mm)	Średnica strefy		
		oporny	średniowrażliwy	wrażliwy
Wankomycyna	30 µg	≤9	10–11	≥12
Ampicylina	10 µg	≤21	22–28	≥29
Kanamycyna	30 µg	≤13	14–17	≥18
Tetracyklina	30 µg	≤11	12–14	≥15
Gentamycyna	10 µg	≤12	13–14	≥15

Nieco inne kryteria zostały przyjęte przez Charteris wsp. (1998). Wartości, na podstawie których klasyfikowano badane szczepy, zostały zawarte w tabeli 34. Różnice w zestawieniu przyjętych wartości dotyczą oceny strefy zahamowania wzrostu w przypadku wankomycyny, ampicyliny, tetracykliny oraz gentamycyny.

Tabela 34. Wybrane kryteria oceny stref zahamowania wzrostu dla *Lactobacillaceae* wg Charteris i wsp., 1998

Antybiotyk	Stężenie zahamowania wzrostu (mm)	Średnica strefy		
		oporny	średniowrażliwy	wrażliwy
Wankomycyna	30 µg	≤14	15–16	≥17
Ampicylina	10 µg	≤12	13–15	≥16
Streptomycyna	10 µg	≤11	12–14	≥15
Kanamycyna	30 µg	≤13	14–17	≥18
Tetracyklina	30 µg	≤14	15–18	≥19
Gentamycyna	10 µg	≤12	–	≥13

Badania przeprowadzone na potrzeby niniejszej pracy wykazały zróżnicowaną antybiooporność poszczególnych szczepów bakteryjnych. Przyjęto podział wrażliwości szczepów bakteryjnych na antybiotyki oparty na wartościach zastosowanych przez Sharma i wsp. (2017):

- izolaty odporne (R) – strefa zahamowania wzrostu mniejsza lub równa 14 mm,
- izolaty wrażliwe (S) – strefa zahamowania większa niż 20 mm,
- pośrednie (M) – strefa zahamowania wzrostu między 15 a 19 mm.

Przebadane szczepy wykazywały oporność względem kanamycyny oraz, w przypadku zastosowania podłoża MRS, gentamycyny. Równocześnie charakteryzowały się wrażliwością względem erytromycyny, tetracykliny oraz ampicyliny. Największe różnice, między dwiema wersjami badania z zastosowaniem odmiennych podłoży mikrobiologicznych, zaobserwowano w przypadku szczepu *L. fermentum*. W badaniu z zastosowaniem podłoża Mueller-Hinton szczep charakteryzował się umiarkowaną wrażliwością względem erytromycyny i tetracykliny, podczas gdy w badaniu z zastosowaniem podłoża MRS wykazywał wrażliwość względem wymienionych antybiotyków. Makrolidy, tetracykliny oraz antybiotyki β-laktamowe w badaniach wywarły hamujący wpływ względem szczepów należących do *Lactobacillaceae* i mogą niekorzystnie wpływać na mikrobiom matki, a przez to także na mikrobiom mleka kobiecego. Ich stosowanie powinno być zatem ograniczone w przypadku kobiet będących w okresie ciąży bądź laktacji.

W przypadku określania minimalnego stężenia hamującego (MIC) dla beztlenowych bakterii Gram-dodatnich EUCAST określa wartości dotyczące niektórych antybiotyków. W tabeli 35. przedstawiono wybrane przyjęte wartości.

Tabela 35. Wykaz wybranych wartości granicznych EUCAST dla beztlenowych bakterii Gram-dodatnich (modyfikacja na podstawie Hryniewicz i Żabicka, 2021)

Antybiotyk	Wartość graniczna MIC (mg/L)	
	S ≤	R >
Benzylopenicylina	0,25	0,5
Ampicylina	4	8
Amoksycylina	4	8
Imipenem	2	4
Erytromycyna	Istnieje zbyt mało dowodów potwierdzających, że lek wykazuje aktywność wobec tej grupy drobnoustrojów	
Klindamycyna	4	4

Wyznaczanie wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) podlega wahaniom, co wiąże się z dużą niepewnością pomiaru. Przykładowo wynik oznaczania MIC równy 1 powinien być traktowany jako wartość w przedziale pomiędzy 0,5 a 2 mg/L (Hryniewicz i Żabicka, 2021). Z tego względu porównywanie wyników badań uzyskiwanych przez poszczególnych autorów jest dodatkowo utrudnione.

Badania polegające na wyznaczeniu MIC przeprowadzone przez Charteris i wsp. (2001), wykonane na podłożu MRS, wykazały, że wszystkie testowane szczepy *L.rhamnosus* były odporne na wankomycynę (MIC90 256 g/mL), kotrimoksazol (MIC90 32 g/ml), metronidazol (MIC90 32 g/mL), gentamycynę (MIC90 128 g/mL) oraz streptomycynę (MIC90 256 g/mL). Równocześnie szczepy te charakteryzowały się wrażliwością na apenicylinę G (MIC90 0,375 g/mL), ampicylinę (MIC90 0,750g/mL), ryfampicynę (MIC90 0,375 g/mL), tetracyklinę (MIC90 1,5 g/mL), chloramfenikol (MIC90 8 g/mL) i erytromycynę (MIC90 2 g/mL).

Badania z zastosowaniem ETEST-ów przeprowadzone przez Danielsen i Wind (2003) dowiodły, że wrażliwość na środki przeciwdrobnoustrojowe jest zależna od rodzaju, gatunku oraz indywidualnych cech danego szczepu bakteryjnego.



W przypadku następujących środków przeciwdrobnoustrojowych: wankomycyny, teikoplaniny, tetracykliny, norfloksacyny, cyprofloksacyny, kwasu fusydowego oraz klindamycyny, uzyskane wyniki wskazywały na duże różnice w poziomie wrażliwości badanych szczepów bakteryjnych (Danielsen i Wind, 2003).

Badania przeprowadzone na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej wskazały na znaczną wrażliwość badanych szczepów względem zastosowanych antybiotyków (amoksycyliny, ampicyliny, benzylpenicyliny G, klindamycyny oraz imipenemu). Dodatkowym aspektem pracy było wskazanie różnic w otrzymywanych wynikach badań wrażliwości na działanie chemioterapeutyków, stosując różne rozwiązania w zakresie podłoży mikrobiologicznych. Rekomendowane do badania wrażliwości na antybiotyki podłoże Mueller-Hinton nie zaspokaja w pełni wymagań odżywczych drobnoustrojów należących do *Lactobacillaceae*, przez co wzrost omawianych bakterii może być niewystarczający do swobodnego odczytu wyniku badania. Z kolei podłoże zalecane do hodowli bakterii należących do *Lactobacillaceae* – MRS, zapewnia optymalny wzrost drobnoustrojów, wpływając równocześnie na wynik doświadczenia. Potrzebne są bardziej wnikliwe badania z zastosowaniem dużej grupy badanej szczepów należących do *Lactobacillaceae*, aby móc zdefiniować najbardziej korzystne warunki prowadzenia eksperymentu, które nie będą niekorzystnie oddziaływały na jego rezultaty.

## 7.5 Ocena przeżywalności badanych izolatów w warunkach obniżonej temperatury

### • Przechowywanie chłodnicze

Przechowywanie mleka kobiecego w warunkach obniżonej temperatury jest praktyką powszechnie stosowaną przez kobiety karmiące piersią, odciągające porcje mleka na potrzeby własnego dziecka, ale także procedurą stosowaną przez banki mleka kobiecego.

Literatura dotycząca przeżywalności bakterii należących do *Lactobacillaceae* w środowisku mleka kobiecego w zależności od sposobu przechowywania jest ograniczona. W doświadczeniach przeprowadzonych przez Zarębę (2008) badano przeżywalność bakterii *Lactobacillus acidophilus* w środowisku mleka pochodzenia

zwierzęcego, zarówno fermentowanego, jak i niepoddanego procesowi fermentacji. W mleku niefermentowanym, w drugim tygodniu przechowywania chłodniczego (6°C), zaobserwowano obniżenie liczby bakterii o 3 cykle logarytmiczne. Po czterech tygodniach od początku doświadczenia wynik badania mikrobiologicznego wskazał na brak żywych komórek bakteryjnych w badanym materiale.

- **Zamrażanie**

Proces mrożenia (w tym powstawanie kryształków lodu) może wywierać niekorzystny wpływ na przeżywalność komórek bakteryjnych. Badania dotyczące przeżywalności mikroorganizmów zawartych w mleku kobiecym, przechowywanego w warunkach zamrażalniczych, prowadziła Rosiak i wsp. (2020). Badania te dotyczyły ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych zawartych w analizowanych próbkach mleka kobiecego. Zaobserwowano znaczącą redukcję ilości drobnoustrojów po okresie przechowywania w temperaturze -20°C, trwającym trzy tygodnie. Zaobserwowany spadek ilości bakterii mógł być spowodowany niekorzystnymi warunkami z punktu widzenia metabolizmu komórek bakteryjnych. Wpływ procesu zamrażania na mikrobiotę mleka kobiecego był również przedmiotem badań prowadzonych przez Marín i wsp. (2009). Próbkę mleka kobiecego przechowywano przez okres 6 tygodni w temperaturze -20°C. Autorzy nie odnotowali istotnego statystycznie obniżenia liczby badanych drobnoustrojów.

Wyniki przeprowadzone na potrzeby niniejszej pracy wskazują na nieznaczny spadek ilości bakterii należących do *Lactobacillaceae* w czterodniowym okresie przechowywania chłodniczego. Ilość komórek bakteryjnych, które przeżyły okres przechowywania w temp. 4°C, pozostał wysoki (średnia 81,4%) i w przypadku bakterii o charakterze probiotycznym jest w stanie zapewnić efekt prozdrowotny dla organizmu.

Badanie dotyczące zaszczepiania próbek mleka kobiecego poddawanego pasteryzacji, a następnie określenia przeżywalności bakterii o charakterze probiotycznym w warunkach przechowywania chłodniczego dostarcza informacji na temat potencjalnej możliwości uzupełniania składu pasteryzowanego mleka kobiecego o mikroorganizmy probiotyczne. Na podstawie wstępnych wyników badań można wnioskować, że spadek zawartości komórek bakteryjnych nie będzie miał istotnego znaczenia dla korzyści zdrowotnych dla dziecka spożywającego

pasteryzowane, suplementowane w bakterie probiotyczne mleko kobiece. Badania wykonane na potrzeby niniejszej pracy mają charakter pilotażowy, oceniającym przydatność szczepów wyizolowanych z mleka kobiecego do zastosowania w postaci suplementów mleka kobiecego pochodzących z BMK. Szczepy, które potencjalnie miałyby zostać zastosowane w takim celu, muszą przejść szereg badań oceniających bezpieczeństwo ich stosowania. Niemniej jednak uzyskane wyniki badań pozwalają stwierdzić, że zaszczepione porcje mleka kobiecego przechowywane w warunkach zarówno chłodniczych, jak i zamrażalniczych, utrzymują wysoką zawartość wprowadzonych do nich komórek bakterii należących do *Lactobacillaceae*.

#### 7.6 Ocena wpływu metabolitów postbiotycznych pochodzących ze szczepów bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowanych z mleka kobiecego, na komórki nowotworu piersi linii MCF-7 w warunkach in vitro

Choroby nowotworowe stanowią jeden z najpoważniejszych problemów związanych ze zdrowiem na całym świecie. W 2020 r. na świecie odnotowano 19,3 mln nowych przypadków chorób nowotworowych, a także 10,0 mln zgonów, których przyczyną była choroba nowotworowa. Wśród różnych rodzajów chorób nowotworowych nowotwór piersi stanowi 6,9% w ujęciu globalnym (Sung i wsp., 2020). Etiologia nowotworu piersi jest złożona i w dużej mierze uwarunkowana genetycznie. Przyjmuje się jednak, że 30% przypadków powodowanych jest przez czynniki ryzyka, takie jak: nadmierna masa ciała, brak aktywności fizycznej czy stosowanie używek (Giaquinto i wsp., 2022). W związku z narastającym problemem zdrowotnym, ale także społecznym i ekonomicznym, wywołanym przez choroby nowotworowe, stale poszukiwane są nowe skuteczne terapie i leki. Godnymi uwagi są mikroorganizmy probiotyczne, które mogą okazać się pomocne w prewencji i wspomaganiu terapii chorób nowotworowych (Śliżewska i wsp., 2021). W badaniach będących tematem niniejszej pracy doktorskiej uwzględniono określenie wpływu metabolitów postbiotycznych, pochodzących z bakterii wyizolowanych ze środowiska mleka kobiecego, na komórki nowotworu piersi. W tym celu wykorzystano linię komórkową MCF-7, która od wielu lat stosowana jest w badaniach in vitro (Comşa i wsp., 2015).

Substancje postbiotyczne są metabolitami uwalnianymi przez mikroorganizmy podczas wzrostu lub po lizie komórki bakteryjnej. Do wytwarzania tych biologicznie aktywnych związków dochodzi podczas fermentacji składników odżywczych. Proces ten może zachodzić w hodowli mikrobiologicznej, środowisku produktu spożywczego, w którym funkcjonują drobnoustroje, lub w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, gdzie bakterie te wchodzą w skład mikrobioty jelitowej (Moradi i wsp., 2021).

Działanie substancji postbiotycznych budzi duże zainteresowanie naukowców ze względu na swoje potencjalne właściwości wspomagające terapie przeciwnowotworowe. Rajoka i wsp. (2019) w przeprowadzonych badaniach wykazali działanie cytotoksyczne supernatantu pochodzącego ze szczepów *L. rhamnosus*, wyizolowanych z mleka kobiecego, w stosunku do komórek raka szyjki macicy. Przebadano aktywność cytotoksyczną supernatantów pozyskanych z trzech szczepów *L. rhamnosus* wyizolowanych z mleka kobiecego i wykazano znaczącą aktywność przeciwnowotworową względem komórek nowotworu szyjki macicy (HeLa) poprzez cytotoksyczność oraz indukcję apoptozy. Dzięki zastosowanej analizie RT-qPCR i technice western blot wykazano, że indukcja apoptozy została osiągnięta poprzez regulację białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2, m.in. BAD, BAX, kaspaz biorących udział w indukowaniu apoptozy, oraz regulację genów BCL-2 w komórkach HeLa. Poddawany badaniom supernatant wykazywał również działanie przeciwtleniające. Wyniki badań przeprowadzonych przez Rajoka i wsp. wskazują na potencjalne właściwości przeciwnowotworowe przebadanych szczepów bakteryjnych. Badania przeprowadzone przez Pourbaferani i wsp. (2021), prowadzone na częściowo oczyszczonych białkach wydzielanych przez komórki szczepu *L. brevis* MK05, wykazały zależny od czasu i dawki wpływ na indukowanie apoptozy komórek nowotworowych. Zaobserwowano spadek wskaźnika przeżywalności komórek MCF-7 przy dawkach równych i wyższych od 0,5 mg/ml po upływie 48 godzin oddziaływania. Badacze doszli do wniosku, że probiotyki oraz ich metabolity o właściwościach cytotoksycznych w stosunku do komórek nowotworowych mogą pełnić w przyszłości rolę wspomagającą w profilaktyce i leczeniu nowotworu piersi poprzez różne mechanizmy działania, np. regulację odpowiedzi immunologicznej, modyfikację mikrobioty gruczołu piersiowego oraz zdolność indukcji apoptozy komórek nowotworowych.

Tan i wsp. (2015). uzyskali wyniki pozwalające na stwierdzenie, że metabolity postbiotyczne pochodzące z poddanego badaniu *L. plantarum* I-UL4 mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie jako suplementy o działaniu przeciwnowotworowym. W badaniu tym oznaczono IC<sub>50</sub>, które wyniosło 10,83 µg po 72 godzinach inkubacji.

W badaniach, dotyczących oceny aktywności przeciwnowotworowej supernatantów pochodzących z hodowli *L. plantarum* względem różnych komórek nowotworowych, przeprowadzonych przez Chuah i wsp. (2019) uzyskano wyniki wskazujące na selektywne, zależne od szczepu i typu komórek nowotworowych działanie cytotoksyczne. Badacze w prowadzonych doświadczeniach wykorzystali metabolity postbiotyczne wytwarzane przez sześć szczepów *L. plantarum* (dawna nomenklatura). Metabolity przebadano pod kątem działania antyproliferacyjnego i cytotoksycznego względem ludzkich komórek niezmiennych nowotworowo, linii komórkowej nowotworu piersi, jelita grubego, szyjki macicy, wątroby i białaczki za pomocą testu MTT. W stosunku do komórek nowotworowych MCF-7 działanie to zaobserwowano przy stężeniu 30% (v/v) po 72 godzinach inkubacji. Żaden z przebadanych metabolitów nie powodował hemolizy czerwonych krwinek pochodzących od człowieka, psa, królika ani kury i nie wykazywał cytotoksyczności w stosunku do prawidłowych komórek.

Również badania przeprowadzone na potrzeby niniejszej pracy wskazują na aktywność cytotoksyczną metabolitów postbiotycznych wytwarzanych przez bakterie należące do *Lactobacillaceae*. Zaobserwowano efekt cytotoksyczny po upływie 48 godzin oddziaływania na komórki nowotworowe w przypadku supernatantu pochodzącego ze szczepu *L. paracasei* oraz *L. rhamnosus*. W przypadku ww. szczepów działanie cytotoksyczne supernatantów, zawierających metabolity postbiotyczne, zaobserwowano przy stężeniu (v/v) odpowiednio: 48,1 i 42,6%. Po upływie 72 godzin wspólnej inkubacji z komórkami linii MCF-7 działanie cytotoksyczne było udziałem czterech z dziesięciu przebadanych szczepów. Należały do nich: *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. vaginalis* oraz *L. fermentum*. Stężenia wywołujące efekt cytotoksyczny wyniosły odpowiednio: 41,2%, 37,4%, 42,3% oraz 48,6%.

Dotychczasowe badania wskazują na potencjał metabolitów postbiotycznych pochodzących z bakterii należących do *Lactobacillaceae*, w tym bakterii pozyskanych

ze środowiska mleka kobiecego, jako suplementu funkcjonalnego i wspomagającego leczenie nowotworów.

## 7.7 Ocena występowania oligosacharydów

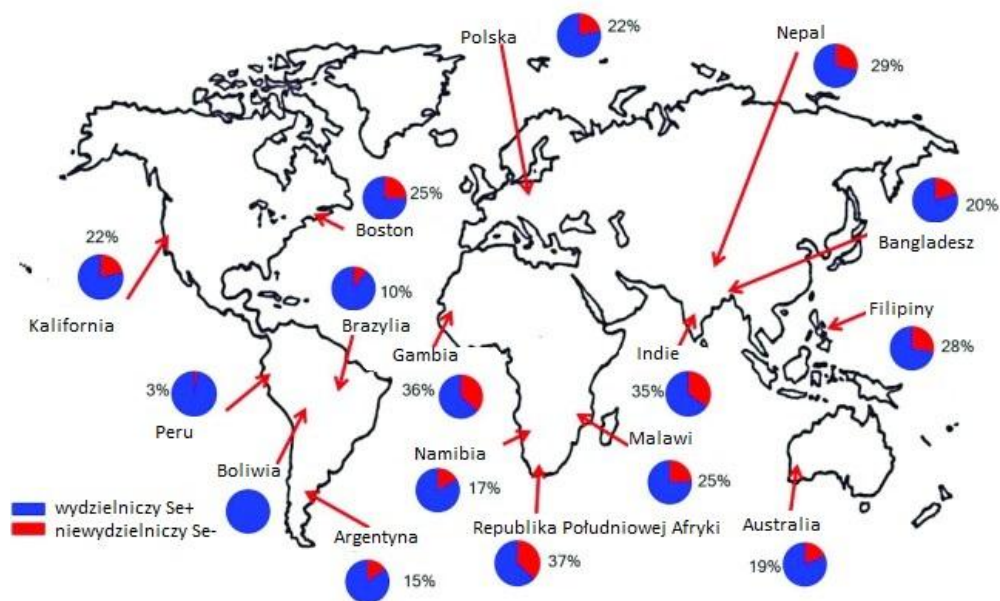
Oligosacharydy są ważnym składnikiem mleka kobiecego, wykazując szereg właściwości prozdrowotnych. Stanowią trzeci co do ilości stały składnik mleka kobiecego, a ich zawartość i zróżnicowanie podlegają wpływowi różnych czynników.

Do determinant najsilniej wpływających na zawartość HMO w mleku kobiecym należy etap laktacji, jak również wiek urodzeniowy dziecka (Gabrielli i wsp., 2011; Smilowitz i wsp., 2013). Udowodniono, że mleko kobiet, które urodziły przedwcześnie, charakteryzuje się wyższą koncentracją HMO niż w przypadku kobiet rodzących dziecko w przewidywanym terminie porodu. Do innych czynników, wpływających na profil HMO mleka kobiecego, należą m.in.: sposób porodu, jej stan odżywienia oraz stosowana przez kobietę karmiącą piersią dieta (Sánchez i wsp., 2021).

Ważnym aspektem związanym z zawartością HMO w składzie mleka kobiecego jest zróżnicowanie uwarunkowane miejscem zamieszkania. W badaniach przeprowadzonych przez Vinjamuri i wsp. (2022) szerokość geograficzna okazała się być ważnym czynnikiem wpływającym na poziom HMO w składzie mleka kobiecego. Badaniu poddano próbki mleka kobiecego pochodzącego od kobiet w okresie laktacji mieszkających w 15 krajach należących do 6 kontynentów. Zaobserwowano różne wzorce obniżania się poziomu HMO w mleku kobiecym na przestrzeni laktacji. W próbkach pochodzących z Peru oraz Indii zawartość HMO obniżała się w trzecim miesiącu laktacji, po czym utrzymywała się na względnie stałym poziomie, w odróżnieniu od próbek pozyskanych m.in. z Brazylii, Stanów Zjednoczonych oraz Republiki Południowej Afryki, gdzie poziom HMO obniżał się jednostajnie. Dodatkowym aspektem pracy było wykazanie zależności pomiędzy poziomem HMO w mleku kobiecym a statusem społeczno-gospodarczym ocenianym na podstawie wartości PKB. W krajach charakteryzujących się wysokim PKB oznaczano wyższy poziom całkowitej zawartości oligosacharydów niż w mleku pochodzącym od kobiet z krajów o niższym wskaźniku.

Na zróżnicowanie zawartości oraz różnorodności strukturalnej HMO w mleku kobiecym wpływa też czynnik genetyczny, który może być powiązany z miejscem

zamieszkania. Duże znaczenie ma tutaj status wydzielniczy matki (Se). Aktywność genu FUT2 kodującego  $\alpha$ 1-2-fukozylotransferazę, która przyłącza cząsteczkę fukozy wiązaniem  $\alpha$ 1-2-glikozydowym do struktury oligosacharydu. Badania dowodzą, że status wydzielniczy Se+ związany jest z wyższym poziomem HMO w mleku kobiecym. W badaniach przeprowadzonych przez Totten i wsp. (2012), przeprowadzonych na próbkach mleka kobiecego pochodzących od 60 kobiet, wykazano niższą łączną zawartość oligosacharydów w mleku kobiecym w przypadku statusu niewydzielniczego (Se-). Populacja europejska w ok. 70% wykazuje profil (Se+/L+). Badania przeprowadzone przez Wang i wsp. (2020) wykazały 76,7% udział matek o profilu Se+/Le+; 17,2% Se-/Le+; 4,3% Se+/Le- oraz 1,7% Se-/Le-. W badaniach przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy, uwzględniając zawartość 2'-FL, uzyskano wyniki wskazujące na 100% przynależność kobiet biorących udział w badaniu do profilu sekrecyjnego Se+. Na rysunku 10. przedstawiono wyniki dotyczące częstotliwości występowania typu wydzielniczego Se+ oraz niewydzielniczego Se- wśród kobiet karmiących piersią w różnych rejonach świata.



Rysunek 10. Proporcje występowania typu wydzielniczego Se+ i niewydzielniczego Se- wśród kobiet karmiących piersią (modyfikacja na podstawie Vinjamuri i wsp., 2022)

Pomiary oligosacharydów, zawartych w mleku kobiecym, przysparzają dużo trudności ze względu na zmienność biologiczną, różnorodność właściwości hydrofilowych i jonizacyjnych (Wiciński i in. 2020). W niniejszej pracy zawartość

poszczególnych oligosacharydów oszacowano na podstawie pola powierzchni zarejestrowanych pików, biorąc pod uwagę masę cząsteczkową poszczególnych HMO.

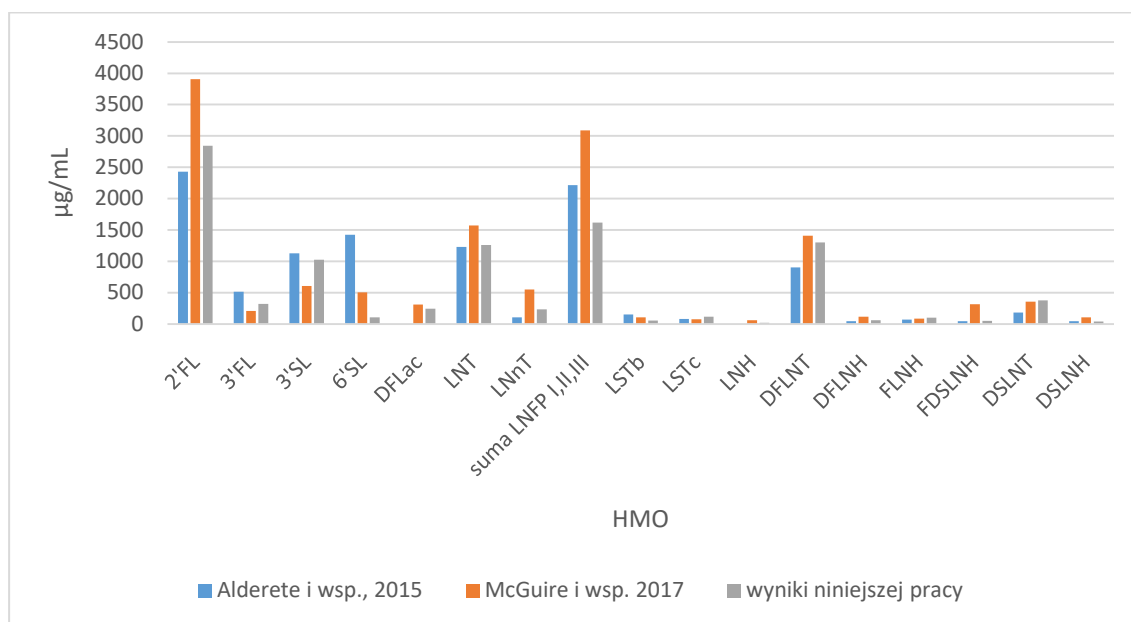
Tabela 36. przedstawia zawartość poszczególnych HMO zidentyfikowaną przez innych autorów w porównaniu z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy. Wyniki te korelują ze sobą, wskazując na rodzaje HMO występujące w największej ilości w składzie mleka kobiecego.



Tabela 36. Zestawienie zawartości HMO w mleku kobiecym uzyskane przez różnych autorów

	Alderete i wsp., 2015		McGuire i wsp., 2017		Badania na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej	
	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/mL	%
2'FL	2431	23,04	3906	29,26	2842,9	29,11
3'FL	515,7	4,89	206	1,54	320,3	3,28
3'SL	1125,4	10,67	607	4,55	1022,8	10,47
6'SL	1422,6	13,48	504	3,78	103,0	1,06
DFLac		0,00	307	2,30	245,2	2,51
LNT	1226,5	11,62	1570	11,76	1258,8	12,89
LNnT	105,3	1,00	548	4,10	232,9	2,39
LNFP I	437,9	4,15	1056	7,91		
LNFP II	1616,1	15,32	2001	14,99	1616,6	16,56
LNFP III	161,4	1,53	32	0,24		
LSTb	148,9	1,41	105	0,79	53,8	0,55
LSTc	76,8	0,73	72	0,54	116,4	1,19
LNH		0,00	58	0,43	17,8	0,18
DFLNT	901,8	8,55	1406	10,53	1301,0	13,32
DFLNH	41	0,39	115	0,86	58,0	0,59
FLNH	68	0,64	83	0,62	98,9	1,01
FDSLNH	45,3	0,43	314	2,35	46,4	0,48
DSLNT	183,7	1,74	357	2,67	377,8	3,87
DSLNH	43,6	0,41	103	0,77	36,6	0,37
TFpLNH (TFpLNH a)	-	-	-	-	7,1	0,07
GL	-	-	-	-	7,2	0,07
LN-Tri	-	-	-	-	1,6	0,02

Wykres 36. przedstawia zawartość wybranych HMO identyfikowanych w składzie mleka kobiecego. Porównano wyniki uzyskane w niniejszej pracy z wynikami innych autorów badających skład mleka kobiecego pod względem oligosacharydów. Wyniki wskazują na dominujący udział oligosacharydu 2'-FL w kompozycji HMO mleka kobiecego. Obserwowane są pewne różnice w zawartości poszczególnych oligosacharydów, jednak widoczne jest także podobieństwo uzyskanych wyników.



Wykres 36. Zawartość HMO w mleku kobiecym

W niniejszej pracy skoncentrowano się na HMO najczęściej występujących w składzie mleka kobiecego. Zidentyfikowano 20 różnych oligosacharydów. Wyniki przedstawiono jako dane dotyczące badanej populacji, a także porównano zawartość HMO w dwóch wyróżnionych grupach przebadanych próbek. Pierwszą stanowiły próbki mleka kobiecego, w których, na wcześniejszych etapach badań, nie zidentyfikowano bakterii należących do *Lactobacillaceae*. Drugą grupę stanowiły próbki, gdzie omawiane drobnoustroje były obecne w składzie mikrobiologicznym mleka. W odniesieniu do zależności kompozycji oligosacharydów względem zawartości bakterii o charakterze probiotycznym uzyskane wyniki wskazują na wyższą zawartość 2'FL, oligosacharydu dominującego w kompozycji HMO mleka kobiecego, w grupie próbek dodatnich pod względem obecności bakterii należących do *Lactobacillaceae*. Zawartość pozostałych, oznaczonych HMO, nie różniła się istotnie w obu omawianych grupach. Ogólna zawartość HMO była wyższa w próbkach mleka kobiecego, w których

zidentyfikowano bakterie należące do *Lactobacillaceae*. Odnotowano również wyższą zawartość LNnT w grupie próbek dodatnich pod względem obecności bakterii *Lactobacillaceae* w porównaniu do grupy ujemnej pod względem obecności *Lactobacillaceae*. Jest to oligosacharyd dostępny dla niektórych bakterii kwasu mlekowego. Większość bakterii *Lactobacillaceae* nie jest zdolna do wykorzystywania złożonych HMO. Wyniki badań wskazują, że poszczególne szczepy bakterii o charakterze probiotycznym obecne w mleku kobiecym mają zróżnicowane zdolności do fermentacji poszczególnych rodzajów HMO. Przykładowo bakterie *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* posiadają umiarkowane możliwości wykorzystywania fukozylowanych i sialilowanych HMO, *L. casei* BL23 wykorzystuje HMO typu I, *L. casei*, *L. acidophilus* i *L. plantarum* posiadają enzymy zdolne do hydrolizy HMO, ale nie zawsze wpływa to stymulująco na ich wzrost (Thongaram i wsp., 2017). Z tego względu bakterie kwasu mlekowego zależne są od obecności Bifidobakterii oraz innych mikroorganizmów zdolnych do hydrolizy HMO i uwalniania z nich składników monosacharydowych, dostępnych dla *Lactobacillaceae* (Schwab i Gänzle, 2011). Tak więc wysoka koncentracja HMO w mleku kobiecym może wpływać bezpośrednio oraz pośrednio na wspieranie populacji bakterii należących do *Lactobacillaceae*.

Cabrera-Rubio i wsp. zaobserwowali, że większa zawartość bakterii z rodzaju *Lactobacillus* była skorelowana z wyższą całkowitą zawartością oligosacharydów w mleku kobiecym oraz wysokim poziomem neutralnych HMO, podczas gdy wyższy poziom zawartości bakterii *Staphylococcus* był związany z niższym poziomem zarówno ogólnej ilości HMO, jak i neutralnych HMO w próbkach siary. Według autorów pracy wyższe poziomy bakterii *Lactobacillus* były powiązane z wyższym stężeniem 2'FL w siarze oraz w dojrzałym mleku. Zawartość bakterii *Lactobacillus* w dojrzałym mleku była również związana z wyższymi stężeniami LNFP I i laktodifukotetraozy oraz niższymi poziomami LNFP II oraz LNDFH II (Cabrera-Rubio i wsp., 2019). Badania te potwierdzają wpływ statusu wydzielniczego matki, uwarunkowanego genetycznie, na profil mikrobiologiczny mleka kobiecego.

## 8 Podsumowanie

Kolonizacja przewodu pokarmowego dziecka uwarunkowana jest wieloma czynnikami, z których w okresie pourodzeniowym najbardziej znaczącym jest sposób żywienia. Mleko kobiece stanowi nie tylko źródło mikroorganizmów o potencjalnym znaczeniu probiotycznym wpływających korzystnie na stan zdrowia dziecka, ale także zawiera szereg składników wspierających tę populację. Wiedza na temat interakcji występujących pomiędzy oligosacharydami zawartymi w mleku kobiecym a drobnoustrojami może być pomocna w zrozumieniu synergistycznego działania, komponentów prebiotycznych oraz probiotycznych.

Mikroorganizmy o charakterze probiotycznym mogą stanowić wartościowe uzupełnienie diety dziecka, które z różnych względów nie jest karmione mlekiem matki. Dotyczyć to może nie tylko dzieci, których dieta oparta jest na mleku modyfikowanym, ale także dzieci będących beneficjentami mleka dawczyń, które ze względu na obowiązujące procedury może wykazywać obniżoną wartość pod względem składników bioaktywnych. Bezpieczeństwo stosowania szczepów pochodzących z mleka kobiecego musi być poddane badaniom. Taką procedurę przeszedł szczep *L. fermentum* CECT5716 pozyskany z mleka kobiecego. W przeprowadzonych badaniach potwierdzono bezpieczeństwo i skuteczność preparatów do dalszego żywienia niemowląt uzupełnionych szczepem *L. fermentum*, które charakteryzowały się dobrą tolerancją (López-Huertas, 2014). Warte uwagi jest poszukiwanie kolejnych szczepów bakterii o charakterze probiotycznym, które charakteryzują się korzystnym wpływem na stan zdrowia, ale także wykazują szereg właściwości umożliwiających ich wykorzystanie w postaci suplementacji.

Kolejnym aspektem wykorzystania prozdrowotnych właściwości bakterii *Lactobacillaceae*, pozyskanych ze środowiska mleka kobiecego, mogą być ich właściwości cytotoksyczne względem komórek nowotworowych. Potrzeba dalszych badań nad możliwością praktycznego zastosowania metabolitów postbiotycznych omawianych bakterii.

Niniejsze badania szerokiego spektrum właściwości bakterii należących do *Lactobacillaceae* wyizolowanych z mleka kobiecego są nie tylko źródłem wiedzy

o statusie mikrobiologicznym mleka kobiecego badanej populacji, ale także stanowią podwaliny dalszych etapów badań nad mikroorganizmami, które mogą zostać wykorzystane w żywieniu niemowląt, a także suplementacji wspomagającej terapię chorób o charakterze nowotworowym.

## Wnioski

- Mleko kobiece może być źródłem bakterii o charakterze probiotycznym należących do *Lactobacillaceae*.
- Bakterie należące do *Lactobacillaceae* nie występują w mleku kobiecym wszystkich kobiet karmiących piersią.
- Bakterie należące do *Lactobacillaceae* występują w mleku kobiecym najczęściej pojedynczo (tylko jeden rodzaj i gatunek).
- Postbiotyczne metabolity wytwarzane przez bakterie należące do *Lactobacillaceae* wywierają selektywne działanie cytotoksyczne względem komórek nowotworowych MCF-7.
- Bakterie należące do *Lactobacillaceae* charakteryzują się wysoką przeżywalnością w pasteryzowanym mleku kobiecym przechowywanym w warunkach chłodniczych oraz zamrażalniczych.
- Bakterie należące do *Lactobacillaceae* wykazują zróżnicowaną wrażliwość względem antybiotyków.
- Obecność bakterii należących do *Lactobacillaceae* skorelowana jest z wyższą zawartością HMO w składzie mleka kobiecego.
- Obecność bakterii należących do *Lactobacillaceae* skorelowana jest z wyższą zawartością oligosacharydu 2'-FL.

## Spis tabel

Tabela 1. Wartości dotyczące składu mleka kobiecego na różnych etapach laktacji (opracowanie własne na podstawie Kin i Yi, 2020 oraz Czosnykowska-Łukacka i wsp., 2018).....	13
Tabela 2. Nowy podział rodzajów bakterii należących poprzednio do rodzaju <i>Lactobacillus</i> (opracowanie własne na podstawie Zheng i wsp., 2020).....	21
Tabela 3. Przydział do grup na podstawie zawartości 2'-FL oraz LNFP II w próbkach mleka kobiecego (modyfikacja na podstawie Wang i wsp., 2020) .....	24
Tabela 4. Wykaz zastosowanych krążków antybiotykowych.....	51
Tabela 5. Paski testowe zastosowane w badaniu dotyczącym wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego MIC.....	53
Tabela 6. Charakterystyka badanej populacji na podstawie wypełnionych kwestionariuszy ....	63
Tabela 7. Dane ankietowe dotyczące leków i suplementów przyjmowanych w okresie ciąży i laktacji przez kobiety biorące udział w badaniu .....	67
Tabela 8. Zawartość makroskładników oraz wartość energetyczna analizowanych próbek mleka kobiecego.....	68
Tabela 9. Dane statystyczne dotyczące analizy składu mleka kobiecego w poszczególnych przedziałach czasowych.....	72
Tabela 10. Drobnoustroje najczęściej identyfikowane w przebadanych próbkach mleka kobiecego.....	74
Tabela 11. Wykaz szczepów należących do <i>Lactobacillaceae</i> zidentyfikowanych w przebadanych próbkach mleka kobiecego .....	75
Tabela 12. Wrażliwość szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka kobiecego względem antybiotyków. Badanie z zastosowaniem krążków antybiotykowych na podłożu MRS. S – sensitive (wrażliwe), M – medium sensitive (średnio wrażliwe), R - resistant .....	78
Tabela 13. Wrażliwość szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka kobiecego względem antybiotyków. Badanie z zastosowaniem krążków antybiotykowych na podłożu Mueller-Hinton. S – sensitive (wrażliwe), M – medium sensitive (średnio wrażliwe), R – resistant .....	79

## Spis wykresów

Wykres 1. Procentowy udział kobiet biorących udział w badaniu, będących na poszczególnych etapach laktacji. ....	65
Wykres 2. Procentowa częstotliwość spożywania mlecznych produktów fermentowanych (np. kefir) .....	66
Wykres 3. Częstotliwość spożywania produktów kiszonych.....	66
Wykres 4. Średnia zawartość tłuszczu w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych .....	69
Wykres 5. Średnia zawartość białka całkowitego w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych.....	69
Wykres 6. Średnia zawartość węglowodanów w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych.....	70
Wykres 7. Średnia zawartość suchej masy w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych .....	70
Wykres 8. Średnia wartość energetyczna próbek mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych .....	71
Wykres 9. Średnia zawartość białka odżywczego w próbkach mleka kobiecego poddanych badaniu, w poszczególnych przedziałach czasowych.....	71
Wykres 10. Procentowy udział poszczególnych szczepów wyizolowanych z przebadanych próbek mleka kobiecego wśród wszystkich zidentyfikowanych szczepów bakteryjnych należących do <i>Lactobacillaceae</i> .....	76
Wykres 11. Przeżywalność szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka kobiecego, przechowywanych w temp. 4°C .....	85
Wykres 12. Przeżywalność szczepów bakteryjnych wyizolowanych z mleka kobiecego, przechowywanych w temp. -20°C.....	85
Wykres 13. Zawartość oligosacharydów neutralnych, fukozylowanych wyizolowanych z próbek mleka kobiecego przeznaczonych do badań.....	87
Wykres 14. Zawartość oligosacharydów neutralnych, niefukozylowanych wyizolowanych z próbek mleka kobiecego przeznaczonych do badań.....	87
Wykres 15. Zawartość oligosacharydów kwaśnych, sjałowanych wyizolowanych z próbek mleka kobiecego przeznaczonych do badań.....	88
Wykres 16. Zawartość poszczególnych oligosacharydów zidentyfikowanych w grupie próbek mleka kobiecego dodatnich pod względem obecności bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> oraz próbek ujemnych pod względem tej cechy .....	89
Wykres 17. Prawdopodobieństwo występowania bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od wieku kobiety karmiącej piersią .....	90
Wykres 18. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w odniesieniu do miejsca zamieszkania kobiety karmiącej piersią .....	91
Wykres 19. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od wskaźnika BMI kobiety karmiącej piersią przed ciążą i w okresie prowadzenia badań.....	92
Wykres 20. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od występowania chorób tarczycy u kobiety karmiącej piersią w okresie ciąży i laktacji.....	93



Wykres 21. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od występowania chorób tarczycy u kobiety karmiącej piersią w zależności od występowania cukrzycy ciążowej .....	94
Wykres 22. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od rodzaju porodu .....	95
Wykres 23. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od dokarmiania dziecka mlekiem modyfikowanym .....	96
Wykres 24. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od czasu karmienia piersią .....	96
Wykres 25. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od stosowanej przez matkę diety .....	98
Wykres 26. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od częstotliwości spożywania przez matkę mlecznych produktów fermentowanych .....	98
Wykres 27. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od częstotliwości spożywania przez matkę żywności wysokoprzetworzonej .....	98
Wykres 28. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od częstotliwości spożywania przez matkę produktów kiszonych .....	99
Wykres 29. Prawdopodobieństwo występowania bakterii należących do <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od przyjmowania antybiotyków i preparatów probiotycznych w czasie trwania ciąży i w okresie laktacji .....	100
Wykres 30. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od zawartości tłuszczu w mleku kobiecym .....	102
Wykres 31. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od zawartości białka całkowitego w mleku kobiecym .....	102
Wykres 32. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od zawartości białka odżywczego w mleku kobiecym .....	102
Wykres 33. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od zawartości suchej masy w mleku kobiecym .....	103
Wykres 34. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od wartości energetycznej mleka kobiecego .....	103
Wykres 35. Prawdopodobieństwo wystąpienia <i>Lactobacillaceae</i> w mleku kobiecym w zależności od zawartości węglowodanów w mleku kobiecym .....	103
Wykres 36. Zawartość HMO w mleku kobiecym .....	130

## Spis rysunków

Rysunek 1. Podstawowe struktury oligosacharydów mleka kobiecego (modyfikacja na podstawie Plaza-Díaz i wsp., 2018).....	23
Rysunek 2. Schemat postępowania z próbkami mleka kobiecego uwzględniający stosowane techniki badawcze.....	40
Rysunek 3. Schemat działania analizatora MIRIS (modyfikacja na podstawie instrukcji producenta) .....	43
Rysunek 4. Procedura diagnostyki z zastosowaniem MALDI-TOF/MS (modyfikacja na podstawie Clark i wsp., 2013).....	45
Rysunek 5. Schemat dotyczący procedury identyfikacji bakterii za pomocą MALDI-TOF/MS....	47
Rysunek 6. Oznaczenia MIC za pomocą ETEST-ów (modyfikacja na podstawie Schumacher i wsp., 2018).....	53
Rysunek 7. Przekształcenie żółtej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej do nierozpuszczalnych ciemnofioletowych kryształków formazanu dokonywane w wyniku działania dehydrogenazy mitochondrialnej (modyfikacja na podstawie Grela i wsp., 2018).....	56
Rysunek 8. Zależności pomiędzy mikrobiomem organizmu a różnorodnymi czynnikami, w tym funkcjonowaniem tarczycy (modyfikacja własna na podstawie Fröhlich i Wahl, 2019) .....	109
Rysunek 9. Identyfikacja drobnoustrojów z różnych rodzajów materiałów: kał matki i dziecka, mleko kobiece i żywność, z zaznaczeniem elementów wspólnych (modyfikacja na podstawie Albesharat i wsp., 2011).....	111
Rysunek 10. Proporcje występowania typu wydzielniczego Se+ i niewydzielniczego Se- wśród kobiet karmiących piersią (modyfikacja na podstawie Vinjamuri i wsp., 2022).....	127

## Spis zdjęć

Zdjęcie 1. MIRIS – analizator składu mleka kobiecego .....	43
Zdjęcie 2. Stalowa płytka, na którą nanoszony jest badany materiał .....	46
Zdjęcie 3. Komora urządzenia MALDI-TOF/MS .....	46
Zdjęcie 4. MALDI-TOF/MS .....	47
Zdjęcie 6. Czytnik produktów PCR.....	50
Zdjęcie 5. Termocykler, BioRad .....	49
Zdjęcie 7. Komórki MCF-7 w hodowli (modyfikacja na podstawie Ninomiya i wsp., 2013) .....	54
Zdjęcie 8. Aparatura badawcza – oznaczanie HMO (Politechnika Gdańska) .....	61
Zdjęcie 9 Płytki testu MTT. Badanie cytotoksyczności supernatantu pochodzącego ze szczepów należących do Lactobacillaceae na komórki nowotworowe MCF-7 (72godz. inkubacji)82	

## Załączniki

### KLAUZULA INFORMACYJNA

Zgodnie z art. 13 Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w sprawie ochrony osób fizycznych w związku z przetwarzaniem danych osobowych i w sprawie swobodnego przepływu takich danych oraz uchylenia dyrektywy 95/46/WE, informujemy, że:

- 1) administratorem Pani danych osobowych jest Uniwersytet Kazimierza Wielkiego (Wydział Nauk Biologicznych) z siedzibą przy ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz,
- 2) administrator danych osobowych powołał Inspektora Ochrony Danych nadzorującego prawidłowość przetwarzania danych osobowych, z którym można skontaktować się za pośrednictwem adresu e-mail: iod@ukw.edu.pl,
- 3) Pani dane będą przetwarzane w celu uczestnictwa w badaniach w ramach projektu badawczego „Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w mleku kobiet karmiących piersią i mleku pochodzącym z banków mleka kobiecego”,
- 4) podstawą prawną przetwarzania jest Pani zgoda,
- 5) nie zamierzamy przekazywać Pani danych osobowych innym podmiotom, jak również nie zamierzamy przekazywać Pani danych do państw trzecich (tj. niebędących członkami UE) lub organizacji międzynarodowych,
- 6) Pani dane będą przechowywane do czasu zakończenia badań, tj. nie dłużej niż do 31.12.2023 lub do czasu odwołania przez Panią zgody na dalsze przetwarzanie,
- 7) przysługuje Pani prawo do cofnięcia zgody w dowolnym momencie bez wpływu na zgodność z prawem przetwarzania, którego dokonano na podstawie zgody przed jej cofnięciem,
- 8) ma Pani prawo żądania od administratora danych dostępu do swoich danych osobowych, ich sprostowania oraz prawo żądania zaprzestania przetwarzania danych,
- 9) ma Pani prawo wniesienia skargi do organu nadzorczego; organem nadzorczym jest Prezes Urzędu Ochrony Danych Osobowych,
- 10) podanie przez Panią danych jest dobrowolne, jednak ich niepodanie uniemożliwi udział w badaniach,
- 11) nie zamierzamy na podstawie Pani danych realizować zautomatyzowanego podejmowania decyzji ani profilowania.

---

### ZGODA NA PRZETWARZANIE DANYCH OSOBOWYCH

.....  
*imię i nazwisko*

*Oświadczam, że podaję dobrowolnie moje dane osobowe i wyrażam zgodę na ich przetwarzanie przez Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy w celu uczestnictwa w badaniach w ramach projektu badawczego „Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w mleku kobiet karmiących piersią i mleku pochodzącym z banków mleka kobiecego”.*

.....  
*data i podpis*

## Zgoda na udział w badaniu

### „Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w mleku kobiet karmiących piersią i mleku pochodzącym z banków mleka kobiecego”

imię i nazwisko osoby badanej

.....

telefon.....

.....

adres

zamieszkania.....

Ja, niżej podpisana .....oświadczam, że zostałam poinformowana przez .....o celu powyższego badania, sposobie jego przeprowadzenia, oczekiwanych korzyściach, ewentualnym zagrożeniu i ryzyku, wszelkich niedogodnościach związanych z udziałem w badaniu oraz moich prawach i obowiązkach.

Przeczytałam też i zrozumiałam treść formularza informacyjnego na temat badania. Poinformowano mnie, że dodatkowe pytania dotyczące badania mogę kierować bezpośrednio do osoby prowadzącej badania i że uzyskam na nie wyczerpującą odpowiedź.

Oświadczam, że wszelkie podane przeze mnie informacje są zgodne z prawdą.

Jestem świadoma przysługującego mi prawa do odstąpienia od udziału w badaniu na każdym jego etapie, bez podania przyczyny. Otrzymałam do rąk własnych formularz informacyjny na temat badania oraz formularz zgody na udział w badaniu.

**Niniejszym wyrażam pełną, świadomą i dobrowolną zgodę na udział w tym badaniu oraz na anonimowe przetwarzanie, udostępnianie i na publikację wyników moich badań.**

.....

imię i nazwisko (*drukowanymi literami*)

.....

.....

podpis

miejsce i data

Kwestionariusz na potrzeby badań:

**„Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w mleku kobiet karmiących piersią i mleku pochodzącym z banków mleka kobiecego”**

1. Numer identyfikacyjny osoby biorącej udział w badaniach:
.....

2. Data urodzenia:
.....

3. Miejsce zamieszkania:	
wieś <input type="checkbox"/>	miasto <input type="checkbox"/>

4. Czy pracuje Pani zawodowo?	
TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>

5. Wiek dziecka (w miesiącach):
.....

6. Płeć dziecka:	
dziewczynka <input type="checkbox"/>	chłopiec <input type="checkbox"/>

7. Które to Pani dziecko?			
pierwsze <input type="checkbox"/>	drugie <input type="checkbox"/>	trzecie <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>

8. Czy karmi Pani piersią starsze dziecko (karmienie w tandemie)?		
TAK <input type="checkbox"/> wiek starszego dziecka: .....	NIE <input type="checkbox"/>	nie mam starszych dzieci <input type="checkbox"/>

9. Rodzaj porodu:		
siłami natury <input type="checkbox"/>	siłami natury indukowany oksytocyną <input type="checkbox"/>	cięcie cesarskie <input type="checkbox"/>

10. Kontakt „skóra do skóry”:		
Tak, z matką czas trwania: <input type="checkbox"/> .....	Tak, z ojcem czas trwania: <input type="checkbox"/> .....	Nie <input type="checkbox"/>

11. Czy dziecko było dokarmiane mlekiem modyfikowanym?	
TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>

12. W którym tygodniu ciąży urodziło się dziecko – wiek ciąży dziecka w dniu porodu (Hbd)?
.....

13. Waga urodzeniowa dziecka:				
<1000 g <input type="checkbox"/>	1000–2000 g <input type="checkbox"/>	2000–3000 g <input type="checkbox"/>	3000–4000 g <input type="checkbox"/>	>4000 g <input type="checkbox"/>

14. Schorzenia matki w trakcie ciąży:		
cukrzyca ciężowa <input type="checkbox"/>	nadciśnienie tętnicze <input type="checkbox"/>	inne: ..... <input type="checkbox"/>

15. Obecne schorzenia matki:
.....

16. Leki stosowane w trakcie ciąży:

.....

17. Leki stosowane w okresie karmienia piersią:

.....

18. Jak długo karmi Pani piersią (w miesiącach)?

.....

19. Stosowana przez Panią dieta:

wegetariańska <input type="checkbox"/>	wegańska <input type="checkbox"/>	dieta dla diabetyków <input type="checkbox"/>	inna: ..... <input type="checkbox"/>	nie stosuję żadnej specjalnej diety <input type="checkbox"/>
---	--------------------------------------	---	--	---

20. Jak często spożywa Pani mleczne produkty fermentowane  
(np. kefir, jogurt)?

codziennie <input type="checkbox"/>	kilka razy w tygodniu <input type="checkbox"/>	kilka razy w miesiącu <input type="checkbox"/>	nie spożywam <input type="checkbox"/>
--	---	---	--

21. Jak często spożywa Pani żywność wysokoprzetworzoną  
(np. żywność instant)?

codziennie <input type="checkbox"/>	kilka razy w tygodniu <input type="checkbox"/>	kilka razy w miesiącu <input type="checkbox"/>	nie spożywam <input type="checkbox"/>
--	---	---	--

22. Jak często spożywa Pani produkty kiszone?  
(np. kapusta kiszona, ogórki kiszone):

codziennie <input type="checkbox"/>	kilka razy w tygodniu <input type="checkbox"/>	kilka razy w miesiącu <input type="checkbox"/>	nie spożywam <input type="checkbox"/>
--	---	---	--



23. Czy w trakcie ciąży stosowała Pani antybiotykoterapię?	
TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>
okres stosowania (w dniach): .....	

24. Czy w trakcie laktacji stosowała Pani antybiotykoterapię?	
TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>
okres stosowania (w dniach): .....	

25. Czy w trakcie ciąży stosowała Pani probiotyki?	
TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>
okres stosowania (w dniach): .....	

26. Czy w trakcie laktacji stosowała Pani probiotyki?	
TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>
okres stosowania (w dniach): .....	

27. Czy w trakcie laktacji stosowała Pani suplementy diety? Jeżeli tak, to jakie:	
TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>
okres stosowania (w dniach): ..... .....	

28. Czy w trakcie ciąży stosowała Pani suplementy diety? Jeżeli tak, to jakie:	
TAK <input type="checkbox"/>	NIE <input type="checkbox"/>
okres stosowania (w dniach): ..... .....	

29. Jaki jest Pani obecny sposób karmienia dziecka?		
wyłącznie karmienie piersią <input type="checkbox"/>	karmienie mieszane piersią i mlekiem modyfikowanym <input type="checkbox"/>	dziecko ma już rozszerzoną dietę – mleko kobiece + posiłek <input type="checkbox"/>

30. Średnia ilość karmień w ciągu doby:

.....

31. Wzrost:

.....cm

32. Obecna waga:

.....kg

33. Waga przed zajściem w ciążę:

.....kg

## Bibliografia

1. ABM Clinical Protocol #8: Human Milk Storage Information for Home Use for Full-Term Infants, Revised 2017 BREASTFEEDING MEDICINE 2017. 12(7), DOI: 10.1089/bfm.2017.29047.aje.
2. Abou-Dakn M. Health effects of breastfeeding on the mother. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz. 2018. 61(8), 986-989. DOI: 10.1007/s00103-018-2776-1. PMID: 29978234.
3. Abrahamsson T.R., Sinkiewicz G., Jakobsson T., Fredrikson M., Björkstén B. 2009. Probiotic Lactobacilli in Breast, Milk and Infant Stool in Relation to Oral Intake During the First Year of Life. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 49(3), 349-354. DOI: 10.1097/MPG.0b013e31818f091b.
4. Agostoni C., Braegger C., Decsi T., Kolacek S., Koletzko B., Michaelsen K.F., Mihatsch W., Moreno L.A., Puntis J., Shamir R., Szajewska H., Turck D., van Goudoever J. 2009. Breast-feeding: A commentary by the Espghan committee on nutrition. J. Pediatric Gastroenterol. Nutr., 49, 112–125.
5. Albesharat R., Ehrmann M.A., Korakli M., Yazaji S., Vogel R.F. 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies, Systematic and Applied Microbiology, 34(2), 148-155. ISSN 0723-2020, <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.12.001>.
6. Alderete T.L., Autran C., Brekke B.E., Knight R., Bode L., Goran M.I., Fields D.A. 2015. Associations between human milk oligosaccharides and infant body composition in the first 6 mo of life. *Am J Clin Nutr.* 102(6), 1381–8. doi: 10.3945/ajcn.115.115451. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26511224; PMCID: PMC6546222.
7. Altobelli E., Angeletti P.M., Verrotti A., Petrocelli R. 2020. The Impact of Human Milk on Necrotizing Enterocolitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 6;12(5):1322. doi: 10.3390/nu12051322. PMID: 32384652; PMCID: PMC7284425.

8. American Academy of Paediatrics (AAP). 2012. Breastfeeding and the use of human milk section on breastfeeding. *Pediatrics* 129, 827–841. doi:10.1542/peds.2011-3552.
9. Andreas N. J., Kampmann B., Mehring Le-Doare K. 2015 Human breast milk: A review on its composition and bioactivity, *Early Human Development*, 91, 11, 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>.
10. Andreas N.J., Hyde M.J., Gale C., Parkinson J.R.C., Jeffries S., Holmes E., Modi N. 2014. Effect of Maternal Body Mass Index on Hormones in Breast Milk: A Systematic Review. *PLoS ONE* 9(12): e115043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115043>.
11. Anisimova E., Gorokhova I., Karimullina G., Yarullina D. 2022. Alarming Antibiotic Resistance of *Lactobacilli* Isolated from Probiotic Preparations and Dietary Supplements. *Antibiotics (Basel)*. Nov 5;11(11):1557. doi: 10.3390/antibiotics11111557.
12. Arslanoglu S., Bertino E., Tonetto P., De Nisi G., Ambruzzi A.M., Biasini A., Profeti C., Spreghini M.R., Moro G.E. 2010. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *Italian Association of Human Milk Banks J. Matern. Fetal Neonat. Med.*, 23, 1–20.
13. Ashraf R., Jalil F., Aperia A., Lindblad B. 1993. Additional water is not needed for healthy breast-fed babies in a hot climate. *Acta Pædiatrica*, 82, 1007–1011. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1993.tb12799.x>.
14. Auer F., Jarvas G., Guttman A. 2021. Recent advances in the analysis of human milk oligosaccharides by liquid phase separation methods. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1162, 122497. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122497>.
15. Azad M., Konya T., Persaud R., Guttman D., Chari R., Field C., Sears M., Mandhane P., Turvey S., Subbarao P., Becker A., Scott J., Kozyrskyj A. 2016. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG* 123, 983–993.

16. Babita, Kumar N, Singh M, Malik JS, Kalhan M. 2014. Breastfeeding reduces breast cancer risk: a case-control study in north India. *Int J Prev Med.* 5(6), 791–795.
17. Bäckhed F., Roswall J., Peng Y., Feng Q., Jia H., Kovatcheva-Datchary P., Li Y., Xia Y., Xie H., Zhong H., Khan M.T., Zhang J., Li J., Xiao L., Al-Aama J., Zhang D., Lee Y.S., Kotowska D., Colding C., Tremaroli V., Yin Y., Bergman S., Xu X., Madsen L., Kristiansen K., Dahlgren J., Wang J. 2015. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*, 17, 690–703.
18. Bai Y., Kuscin J. 2021. The Current State of Donor Human Milk Use and Practice. *J Midwifery Womens Health.* 66(4), 478-485. doi: 10.1111/jmwh.13244. Epub 2021 Jul 11. PMID: 34250723.
19. Ball T.M., Bennett D.M., 2001. The Economic Impact of Breastfeeding, *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 253–262. [https://doi.org/10.1016/S00313955\(05\)70298-4](https://doi.org/10.1016/S00313955(05)70298-4).
20. Ballard O., Morrow A.L. 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.*, 60(1), 49–74.
21. Baranowska B., Malinowska M., Stanaszek E., Sys D., Bączek G., Doroszewska A., Tataj-Puzyna U., Rabijewski M. 2019. Extended Breastfeeding in Poland: Knowledge of Health Care Providers and Attitudes on Breastfeeding Beyond Infancy. *J Hum Lact.* 35(2), 371–380. doi: 10.1177/0890334418819448. Epub 2018 Dec 20. PMID: 30571929.
22. Bearfield C., Davenport E.S., Sivapathasundaram V., Allaker R.P. 2002. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 109, 527–533. doi:10.1111/j.1471-0528.2002.01349.x.
23. Bezirtzoglou E., Tsiotsias A., Welling G.W. 2011. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*, 17, 478–482. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.009.
24. Bode L. 2012. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22(9), 1147-1162. doi: 10.1093/glycob/cws074.

25. Bode L. 2015. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum. Dev.*, 91, 619–622. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001.
26. Boehm G., Stahl B. 2007. Oligosaccharides from milk. *J. Nutr.*, 137, 847–849. doi:10.1093/jn/137.3.847S.
27. Buda B., Dylus E., Górska-Frączek S., Brzozowska E., Gamian A. 2013. Właściwości biologiczne białek powierzchniowych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 67, 229–237.
28. Cabrera-Rubio R., Collado M.C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E., Mira A. 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* 96, 544–551. doi:10.3945/ajcn.112.037382.
29. Cabrera-Rubio R., Kunz C., Rudloff S., García-Mantrana I., Crehuá-Gaudiza E., Martínez-Costa C., Collado M.C. 2019. Association of Maternal Secretor Status and Human Milk Oligosaccharides With Milk Microbiota: An Observational Pilot Study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 68(2), 256–263.
30. Carr L.E., Virmani M.D., Rosa F., Munblit D., Matazel K.S., Elolimy A.A., Yeruva L. Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. *Front Immunol.* 2021 Feb 12;12:604080. doi: 10.3389/fimmu.2021.604080. PMID: 33643310; PMCID: PMC7909314.
31. Cattaneo A., Quintero-Romero S. 2006. Protection, promotion and support of breastfeeding in low-income countries, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.* 11(1): 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2005.10.007>.
32. Cerdó T., Ruíz A., Suárez A., Campoy C. 2017. Probiotic, Prebiotic and Brain Development. *Nutrients*, 9, 1247, doi:10.3390/nu9111247.
33. Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. 2001. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *Journal of Food Protection*, 64(12):2007–2014. doi: 10.4315/0362-028x-64.12.2007. PMID: 11770631.
34. Chartieris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. 1998. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *J Food Prot.* 61(12), 1636–1643. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.12.1636>.

35. Chowdhury R., Sinha B., Sankar M.J., Taneja S., Bhandari N., Rollins N., Bahl R., Martines J. 2015. Breastfeeding and maternal health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*, 104: 96–113. <https://doi.org/10.1111/apa.13102>.
36. Chuah L.O., Foo H.L., Loh T.C., Mohammed Alitheen N.B., Yeap S.K., Abdul Mutalib N.E., Abdul Rahim R., Yusoff K. 2019. Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 3;19(1):114. doi: 10.1186/s12906-019-2528-2. PMID: 31159791; PMCID: PMC6547513.
37. Civardi E., Garofoli F., Tzialla C., Paolillo P., Bollani L., Stronati M. 2013. Microorganisms in human milk: Lights and shadows. *J. Matern. Fetal Neonatal Med*. 26, 30–34.
38. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 26(3), 547-603. doi: 10.1128/CMR.00072-12. PMID: 23824373; PMCID: PMC3719498.
39. Cohen R., Brown K., Rivera L., Dewey, K. 2000. Exclusively breastfed, low birthweight term infants do not need supplemental water. *Acta Pædiatrica*, 89, 550-552. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2000.tb00336.x>.
40. Colaizy T.T. 2021. Effects of milk banking procedures on nutritional and bioactive components of donor human milk. *Semin Perinatol*. 45(2):151382. doi: 10.1016/j.semperi.2020.151382. Epub 2021 Jan 2. PMID: 33632557.
41. Colombo M., de Oliveira A.E., de Carvalho A.F., Nero L.A. 2014. Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. *Food Microbiol*. 39, 89–95. doi: 10.1016/j.fm.2013.11.008. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24387857.
42. Comşa Ş., Cîmpean A.M., Raica M. 2015. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 35(6), 3147–3154. PMID: 26026074.
43. Czosnykowska-Łukacka M., Królak-Olejnik B., Orczyk-Pawiłowicz M. 2018. Breast Milk Macronutrient Components in Prolonged Lactation. *Nutrients*, 10, 1893. <https://doi.org/10.3390/nu10121893>.

44. Danielsen M., Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents, *International Journal of Food Microbiology*, 82(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00254-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00254-4).
45. Da-Peng Li, Chen Du, Zuo-Ming Zhang , Guang-Xiao Li , Zhi-Fu Yu , Xin Wang, Peng-Fei Li , Cheng Cheng , Yu-Peng Liu , Ya-Shuang Zhao. 2014. Breastfeeding and Ovarian Cancer Risk: a Systematic Review and Meta-analysis of 40 Epidemiological Studies *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (12), 4829–4837. DOI:<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.12.4829>.
46. Dieterich C. M., Felice J.P., O’Sullivan E., Rasmussen K. M. 2013. Breastfeeding and health outcomes for the mother-infant dyad. *Pediatricclinics of North America* 60(1), 31–48. doi:10.1016/j.pcl.2012.09.010.
47. Dinleyici M., Pérez-Brocal V., Arslanoglu S., Aydemir O., Sevuk Ozumut S., Tekin N., Vandenplas Y., Moya A., Dinleyici E.C. 2021. Human Milk Virome Analysis: Changing Pattern Regarding Mode of Delivery, Birth Weight, and Lactational Stage. *Nutrients*. 13(6):1779. <https://doi.org/10.3390/nu13061779>.
48. Dominguez-Bello M.G., De Jesus-Laboy K.M., Shen N., Cox L.M., Amir A., Gonzalez A., Bokulich N.A., Song S.J., Hoashi M., Rivera-Vina J.I., Mendez K., Knight R., Clemente J.C. 2016. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat. Med.*, 22, 250–253. doi:10.1038/nm.4039.
49. Duale A., Singh P., Al Khodor S. 2022. Breast Milk: A Meal Worth Having. *Front. Nutr.* 8:800927. doi: 10.3389/fnut.2021.800927.
50. Dubernet S., Desmasures N., Guéguen M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett.* 10;214(2):271–5. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11358.x. PMID: 12351242.
51. Esquivel-Veláz M., Bueno-Hernández N., Cacho-Zayas A.P., de la Rosa-Ruiz L. 2022. Non-nutritive sweeteners consumption during pregnancy associates with reduced Lactobacillaceae in colostrum and lower gestational age at birth: A pilot study. DOI:10.21203/rs.3.rs-1490429/v1
52. Faghfoori Z., Pourghassem G.B, Saber A., Seyyedi M., Yari K.A. 2017. The Investigation of the Diversity of Lactobacilli Spp. and Assessment Their Some Probiotic Properties in Traditional Dairy Products in East Azerbaijan Province in



- Iran. Iran J Pharm Res., 16(4), 1538–1545. PMID: 29552062; PMCID: PMC5843315.
53. Favier C.F., Vaughan E.E., de Vos W.M., Akkermans A.D.L. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 219–226. doi:10.1128/aem.68.1.219-226.2002.
  54. Figueiredo B., Canário C., Field T. 2014. Breastfeeding is negatively affected by prenatal depression and reduces postpartum depression. *Psychological Medicine*, 44(5), 927-936. doi:10.1017/S0033291713001530.
  55. Fitzstevens J.L., Smith K.C., Hagadorn J.I., Caimano M.J., Matson A.P., Brownell E.A. 2017. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract.* 32(3), 354-364. doi: 10.1177/0884533616670150. Epub 2016 Sep 27. PMID: 27679525.
  56. Fröhlich E., Wahl R. 2019. Microbiota and Thyroid Interaction in Health and Disease. *Trends Endocrinol Metab.* 30(8), 479-490. doi: 10.1016/j.tem.2019.05.008. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31257166.
  57. Gabrielli O., Zampini L., Galeazzi T., Padella L., Santoro L., Peila C., Giuliani F., Bertino E., Fabris C., Coppa G.V. 2011. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics*, 128, 1520–1531. doi: 10.1542/peds.2011-1206.
  58. Gajewska J., Błaszczuk M.K. 2012. Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej LAB, *Post. mikrobiol.* 51(1), 55–65.
  59. Garcia-Mantrana, Izaskun, et al. 2017. Maternal factors related to variability in the human milk microbiome. *Prebiotics and probiotics in human milk: Origins and functions of milk-borne oligosaccharides and bacteria* 329–348.
  60. German J.B., Freeman S.L., Lebrilla C.B., Mills D.A. 2008 Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria *Nestle Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.*, 62, 205–218.
  61. Giaquinto A.N., Sung H., Miller K.D., Kramer J.L., Newman L.A., Minihan A., Jemal A., Siegel R.L. 2022. Breast Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 72, 524–541. <https://doi.org/10.3322/caac.21754>.
  62. Gomez-Gallego C., Garcia-Mantrana I., Salminen S., Collado M.C. 2016. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity,

- Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. 21 (6), 400–405. ISSN 1744-165X, <https://doi.org/10.1016/j.siny.2016.05.003>.
63. Good M., Sodhi C., Egan C., Afrazi A., Jia H., Yamaguchi Y., Lu P., F Branca M., Ma C., Prindle Jr T., Mielo S., Pompa A., Hodzic Z., Ozolek J.A., Hackam D.J. 2015. Breast milk protects against the development of necrotizing enterocolitis through inhibition of Toll-like receptor 4 in the intestinal epithelium via activation of the epidermal growth factor receptor. *Mucosal Immunol* 8, 1166–1179. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.30>.
  64. Górska S., Grycko P., Rybka J., Gamian A. 2007. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure and biosynthesis. *Postepy Hig Med. Dos.* 61, 805–818.
  65. Gregg B., Ellsworth L., Pavela G., Shah K., Berger P.K., Isganaitis E., VanOmen S., Demerath E.W., Fields D.A. 2022. Bioactive compounds in mothers milk affecting offspring outcomes: A narrative review. *Pediatric Obesity*. 17(7):e12892. doi:10.1111/ijpo.12892
  66. Grela E., Kozłowska J., Grabowiecka A. 2018. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochem.* 120(4), 303–311. doi: 10.1016/j.acthis.2018.03.007. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29606555.
  67. Grwaela E., Kozłowska J., Grabowiecka A. 2018. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review, *Acta Histochemica*. 120(4), 303–311. ISSN 0065-1281,
  68. Guala A., Boscardini L., Visentin R., Angellotti P., Grugni L., Barbaglia M., Chapin E., Castelli E., Finale E. 2017. Skin-to-Skin Contact in Cesarean Birth and Duration of Breastfeeding: A Cohort Study. *The Scientific World Journal*. Article ID 1940756 |<https://doi.org/10.1155/2017/1940756>.
  69. Ha M.Y., Kim S.W., Lee Y.W., Kim M.J., Kim S.J. 2003. Kinetics analysis of growth and lactic acid production on pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/corn steep liguor/glucose medium. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 134–140.
  70. Han J., Chen D., Li S., Li X., Zhou W.W., Zhang B., Jia Y. 2015. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Italian Journal of Food Science*, 27(3), 282–289.

71. Hendricks-Muñoz K. D., Xu J., Parikh H. I., Xu P., Fettweis J. M., Kim Y., Sheth N.U. 2015. Skin-to-skin care and the development of the preterm infant oral microbiome. *American Journal of Perinatology*, 32(13), 1205–1216.
72. Hermansson H., Kumar H., Collado M.C., Salminen S., Isolauri E., Rautava S. 2019. Breast Milk Microbiota Is Shaped by Mode of Delivery and Intrapartum Antibiotic Exposure. *Front Nutr.* 4;6:4. doi: 10.3389/fnut.2019.00004. PMID: 30778389; PMCID: PMC6369203.
73. HMA User Manual <https://www.mirissolutions.com/support/user-manuals> (strona cytowana 18.06.2023).
74. Hoddinott P., Tappin D., Wright C., 2008. Breastfeeding. *BMJ* 336 (7649), 881–887.<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>.
75. Horta B., Victora C. & World Health Organization . 2013. Long-term effects of breastfeeding: a systematic review. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/79198>.
76. Hryniewicz W., Żabicka D. 2021. Tabele interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST 2021.
77. Tan H.K., Foo H.L., Loh T.C., Mohamed Alitheen N.B., Abdul Rahim R. 2015. Cytotoxic effect of proteinaceous postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4 cultivated in different media composition on MCF-7 breast cancer cell *Malaysian Journal of Microbiology*, 207–214.
78. Ip S, Chung M., Raman G., Trikalinos T.A., Lau J. 2009. A summary of the Agency for Healthcare Research and Quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. *Breastfeed Med.* 1, 17–30. doi: 10.1089/bfm.2009.0050. PMID: 19827919.
79. Isolauri E. 2012. Development of healthy gut microbiota early in life. *Journal of Paediatrics and Child Health.* 48(3), 1–61. doi:10.1111/j.1440-1754.2012.02489.x ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12753>.
80. Jańczewska I., Domańska-Popadiuk I. 2014. Znaczenie kolonizacji bakteryjnej przewodu pokarmowego noworodków donoszonych urodzonych drogą cięcia cesarskiego. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 2014, 44, 99–104.
81. Jarzynka S., Spott R., Tchatchiashvili T., Ueberschaar N., Martinet M. G., Strom K., Kryczka T., Wesołowska A., Pletz M.W., Olędzka G., Makarewicz O. 2022. Human

- Milk Oligosaccharides Exhibit Biofilm Eradication Activity Against Matured Biofilms Formed by Different Pathogen Species. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.794441>.
82. Jiménez E., de Andrés J., Manrique M., Pareja-Tobes P., Tobes R., Martínez-Blanch J.F., Codoñer F.M., Ramón D., Fernández L., Rodríguez J.M. 2015. Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. *J Hum Lact.* 31, 406–15. doi: 10.1177/0890334415585078.
  83. Jiménez E., Fernandez L., Marin M.L., Martín R., Odriozola J.M. Nueno-Palop C., Narbad A., Olivares M., Xaus J., Rodríguez J.M. 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr. Microbiol.* 51, 270–274. doi:10.1007/s00284-005-0020-3.
  84. Jost T., Lacroix C., Braegger C., Chassard C. 2013. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br. J. Nutr.* 14, 1–10. doi:10.1017/S0007114513000597.
  85. Kantorowska A., Wei J.C., Cohen R.S., Lawrence R.A., Gould J.B. Lee H.C. 2016. Impact of Donor Milk Availability on Breast Milk Use and Necrotizing Enterocolitis Rates. *Pediatrics*, 137(3) e20153123; DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2015-3123>.
  86. Kendall-Tackett K.A., Sugarman M. 1995. The Social Consequences of Long-Term Breastfeeding. *Journal of Human Lactation*, 11(3), 179–183. doi:10.1177/089033449501100316.
  87. Kennell J., McGrath S. 2005. Starting the process of mother-infant bonding. *Acta Paediatr*, 94, 775–777.
  88. Khodayar-Pardo P., Mira-Pascual L., Collado M. Martínez-Costa C. 2014. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J Perinatol.* 34, 599–605. <https://doi.org/10.1038/jp.2014.47>.
  89. Kim S.Y., Yi D.Y. 2020. Analysis of the human breast milk microbiome and bacterial extracellular vesicles in healthy mothers. *Exp Mol Med.* 52, 1288–1297. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0470-5>.
  90. Kim S.Y., Yi D.Y. 2020. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin Exp Pediatr.* 63(8), 301–309.

doi: 10.3345/cep.2020.00059. Epub Mar 23. PMID: 32252145; PMCID: PMC7402982.

91. Kong C., Beukema M., Wang M., de Haan B.J. , de Vos P. 2021. Human milk oligosaccharides and non-digestible carbohydrates prevent adhesion of specific pathogens via modulating glycosylation or inflammatory genes in intestinal epithelial cells. *Food Funct.*, 7;12(17):8100-8119. doi: 10.1039/d1fo00872b. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34286788.
92. Kosaka N., Izumi H., Sekine K., Ochiya T. 2010. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1(7) <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-7>.
93. Kotlińska A., Huras H. 2017. Źródła i rola mikrobioty mleka kobiecego. *Przegląd literatury przedmiotu Zdrowie Publiczne i Zarządzanie*, 15(2), 178–180. doi:10.4467/20842627OZ.17.017.6787.
94. Kramer M.S., Kakuma R. 2004. The optimal duration of exclusive breastfeeding: a systematic review. *Adv Exp Med Biol.* 554, 63–77.
95. Krol K.M., Grossmann T. 2018. Psychological effects of breastfeeding on children and mothers. *Bundesgesundheitsbl*, 61, 977–985. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2769-0>.
96. Kulas T., Bursac D., Zegarac Z., Planinic-Rados G., Hrgovic Z. 2013. New Views on Cesarean Section, its Possible Complications and Long-Term Consequences for Children's Health. *Med Arch.* 67(6), 460–463. doi: 10.5455/medarh.2013.67.460-463. Epub 2013 Dec 28. PMID: 25568522; PMCID: PMC4272489.
97. Kuntz C., Rudloff S. 2008. Potential anti-inflammatory and anti-infectious effects of human milk oligosaccharides. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 606, 455–465. doi:10.1007/978-0-387-74087-4\_18.
98. Kuntz S., Rudloff S., Kunz C. 2008. Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and nontransformed intestinal cells. *Br. J. Nutr.*, 99, 462–471.
99. Labbok M.H. 1999. Health Sequelae of Breastfeeding for the Mother, *Clinics in Perinatology*, 26(2), 491-503. [https://doi.org/10.1016/S00955108\(18\)30063-0](https://doi.org/10.1016/S00955108(18)30063-0).

100. Landers S., Updegrave K. 2010. Bacteriological screening of donor human milk before and after Holder pasteurization. *Breastfeed Med.* 5(3):117–21. doi: 10.1089/bfm.2009.0032. PMID: 20509779.
101. Li C., Gonzalez E., Solomons N.W., Scott M.E, Koski K.G. 2018. Human Breast Milk Microbiota is Influenced by Maternal Age and BMI, Stage of Lactation and Infant Feeding Practices [https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1\\_supplement.965.25](https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.965.25).
102. Li N., Pang B., Liu G., Zhao X., Xu X., Jiang C., Yang B., Liu Y., Shi J. 2020. *Lactobacillus rhamnosus* from human breast milk shows therapeutic function against foodborne infection by multi-drug resistant *Escherichia coli* in mice. *Food Funct.*, 11, 435–447.
103. Li S.W., Watanabe K., Hsu C.C., Chao S.H., Yang Z.H., Lin Y.J., Chen C.C., Cao Y.M., Huang H.C., Chang C.H., Tsai Y.C. 2017. Bacterial Composition and Diversity in Breast Milk Samples from Mothers Living in Taiwan and Mainland China. *Front Microbiol.* 2017 May 30;8:965. doi: 10.3389/fmicb.2017.00965. PMID: 28611760; PMCID: PMC5447776.
104. Lis-Kuberka J., Orczyk-Pawitowicz M. 2015. Znaczenie fukozylowanych glikokoniugatów mleka ludzkiego w żywieniu noworodków i niemowląt. *Postepy Hig Med Dosw.* 69, 811-829. DOI: 10.5604/17322693.1162561
105. Lönnerdal B. 2013. Bioactive proteins in breast milk. *J Paediatr Child Health*, 49, 1–7. <https://doi.org/10.1111/jpc.12104>.
106. Lopez Leyva L., Gonzalez E., Li C., Ajeeb T., Solomons N.W., Agellon L.B., Scott M.E., Koski K.G. 2021, Human Milk Microbiota in an Indigenous Population Is Associated with Maternal Factors, Stage of Lactation, and Breastfeeding Practices. *Curr Dev Nutr* 15, 5(4):nzab013. doi: 10.1093/cdn/nzab013. PMID: 33898919; PMCID: PMC8053399.
107. López-Huertas E., 2014. Safety and efficacy of human breast milk *Lactobacillus fermentum* CECT 5716. A mini-review of studies with infant formulae. *Beneficial Microbes*: 6(2), 219–224. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0091>.
108. Lucas A., Cole T.J 1990. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*, 336, 1519–1523.
109. Lyons K.E., Ryan C.A., Dempsey E.M., Ross R.P., Stanton C. 2020. Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health.

- Nutrients. Apr 9;12(4):1039. doi: 10.3390/nu12041039. PMID: 32283875; PMCID: PMC7231147.
110. Lyons K.E., Shea CA.O., Grimaud G. 2022. The human milk microbiome aligns with lactation stage and not birth mode. *Sci Rep* 12, 5598 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09009-y>.
  111. Malinowska-Pańczyk E., Królik K., Skorupska K., Puta M., Martysiak-Żurowska D., Kielbratowska B., 2019. Microwave heat treatment application to pasteurization of human milk, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 42-48. ISSN 1466-8564, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.11.005>.
  112. Mandel D., Lubetzky R., Dollberg S., Barak S., Mimouni F.B. 2005. Fat and Energy Contents of Expressed Human Breast Milk in Prolonged Lactation. *Pediatrics*, 116(3):e432–5
  113. Marcobal A., Barboza M., Sonnenburg E.D., Pudlo N., Martens E.C., Desai P., Lebrilla C.B., Weimer B.C., Mills D.A., German J.B., Sonnenburg J.L. 2011. Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe*, 10, 507–514. doi:10.1016/j.chom.2011.10.007.
  114. Marín M.L., Arroyo R., Jiménez E., Gómez A., Fernández L., Rodríguez J.M. 2009. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 49(3), 343–8. doi: 10.1097/MPG.0b013e31818cf53d. PMID: 19516191.
  115. Marseglia L., Manti S., D’Angelo G., Cuppari C., Salpietro V., Filippelli M., Trovato A., Gitto E., Salpietro C., Arrigo T., 2015. Obesity and breastfeeding: The strength of association, *Women and Birth*, 28,(2) 81–86, ISSN 1871-5192, <https://doi.org/10.1016/j.wombi.2014.12.007>.
  116. Martín R., Heilig G.H.J., Zoetendal E.G., Smidt H., Rodríguez J.M. 2007. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut, *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2638–2644.
  117. Martín R., Heilig H.G.H.J., Zoetendal E.G. Jiménez E., Fernández L., Smidt H., Rodríguez J.M. 2007. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in Microbiology*, 158 (1), 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.004>.

118. Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut, *The Journal of Pediatrics*, 143(6), 754–758. ISSN 0022-3476, <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.09.028>.
119. Martín R., Olivares M., Marín M.L., Fernández L., Xaus J., Rodríguez J.M. 2005. Probiotic Potential of 3 Lactobacilli Strains Isolated From Breast Milk. *Journal of Human Lactation*, 21(1), 8–17.
120. Martin R.M., Gunnell D., Davey Smith G., 2005. Breastfeeding in Infancy and Blood Pressure in Later Life: Systematic Review and Meta-Analysis, *American Journal of Epidemiology*, 161(1), 15–26. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh338>.
121. Martín V., Maldonado-Barragán A., Moles L., Rodríguez-Baños M., Campo R.D., Fernández L., Rodríguez J.M. 2012. Jiménez E. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J. Human Lact. Off. J. Int. Lact. Consult. Assoc.*, 28, 36–44. doi:10.1177/0890334411424729.
122. Martysiak-Żurowska D., Malinowska-Pańczyk E., Orzolek M., Kiełbratowska B., Sinkiewicz-Darol E. 2022. Effect of convection and microwave heating on the retention of bioactive components in human milk. *Food Chemistry*, 374, 131772, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131772>.
123. Martysiak-Żurowska D., Malinowska-Pańczyk E., Orzolek M., Kusznierevich B., Kiełbratowska B. 2022. Effect of microwave and convection heating on selected nutrients of human milk. *Food Chem.* 1;369:130958. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130958. Epub 2021 Aug 26. PMID: 34479011.
124. Mastromarino P., Capobianco D., Miccheli A., Pratico G., Campagna G., Laforgia N., Capursi T. 2015. Baldassarre, M.E. Administration of a multistrain probiotic product (VSL#3) to women in the perinatal period differentially affects breast milk beneficial microbiota in relation to mode of delivery. *Pharmacol. Res.*, 95–96, 63–70.
125. Matsumiva Y., Kato N., Watanabe K., Kato H. 2002. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Infect. Chemother.*, 8, 43–49.



126. Mawson A.R., Xueyuan W. 2013. Breastfeeding, retinoids, and postpartum depression: A new theory, *Journal of Affective Disorders*, 150, 3, 1129–1135. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.05.038>.
127. Mayrhofer S., Domig K.J., Mair C., Zitz U., Huys G., Kneifel W. 2008. Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. *Appl Environ Microbiol.*, 74(12):3745-8. doi: 10.1128/AEM.02849-07. Epub 2008 Apr 25. PMID: 18441109; PMCID: PMC2446536.
128. McCrory C., Layte R. 2012. Breastfeeding and risk of overweight and obesity at nine-years of age. *Soc. Sci. Med.* 75 (2), 323–330.
129. McGuire M.K., Meehan C.L., McGuire M.A., Williams J.E., Foster J., Sellen D.W., Kamau-Mbuthia E.W., Kamundia E.W., Mbugua S., Moore S.E., Prentice A.M., Kvist L.J., Otoo G.E., Brooker S.L., Price W.J., Shafii B., Placek C., Lackey K.A., Robertson B., Manzano S., Ruíz L., Rodríguez J.M., Pareja R.G., Bode L. 2017. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *Am J Clin Nutr.* 105(5), 1086–1100. doi: 10.3945/ajcn.116.139980. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28356278; PMCID: PMC5402033.
130. Meiling Jiang, Fen Zhang, Cuixiang Wan, Yonghua Xiong, Nagendra P. Shah, Hua Wei, Xueying Tao, 2016. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk, *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1736-1746. ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10434>.
131. Menzel P., Vogel M., Austin S., Sprenger N., Grafe N., Hilbert C., Jurkutat A., Kiess W., Binia A. 2021. Concentrations of oligosaccharides in human milk and child growth. *BMC Pediatr* 21, 481. <https://doi.org/10.1186/s12887-021-02953-0>.
132. Milani C., Duranti S., Bottacini F., Casey E., Turrone F., Mahony J., Belzer C., Delgado Palacio S., Arboleya Montes S., Mancabelli L., Lugli G.A., Rodriguez J.M., Bode L., de Vos W., Gueimonde M., Margolles A., van Sinderen D., Ventura M. 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev.* 81(4):e00036-17. doi: 10.1128/MMBR.00036-17. PMID: 29118049; PMCID: PMC5706746.

133. Mohammadi F., Eshaghi M., Razavi S., Sarokhalil D.D., Talebi M., Pourshafie M.R. 2018. Characterization of bacteriocin production in *Lactobacillus* spp. isolated from mother's milk. *Microb Pathog.*, 118, 242–246. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.020. Epub 2018 Mar 15. PMID: 29551436.
134. Mohandas S., Pannaraj P.S. 2020. Beyond the bacterial microbiome: virome of human milk and effects on the developing infant. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.*, 94, 86–93. doi: 10.1159/000504997.
135. Moossavi S., Sepehri S., Robertson B., Bode L., Goruk S., Field C.J., Lix L.M., de Souza R.J., Becker A.B., Mandhane P.J., Turvey S.E., Subbarao P., Moraes T.J., Lefebvre D.L., Sears M.R., Khafipour E., Azad M.B. 2019. Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell Host Microbe.* 13;25(2), 324–335.e4. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.011. PMID: 30763539.
136. Moradi M., Molaei R., Guimarães J.T. 2021. A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria, *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109722, ISSN 0141-0229, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109722>.
137. Moubareck C.A. 2021. Human milk microbiota and oligosaccharides: a glimpse into benefits, diversity, and correlations. *Nutrients.* 13:1123.
138. Newcomb P.A., Storer B.E., Longnecker M.P., Mittendorf R. 1994. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N.Engl.J.Med.*, 330, 81–88.
139. Ninkina N., Kukharsky M.S., Hewitt M.V., Lysikova E.A., Skuratovska L.N., Deykin A.V., Buchman V.L. 2019. Stem cells in human breast milk. *Hum Cell.*, 32(3)2, 23–230. doi: 10.1007/s13577-019-00251-7. Epub Apr 10. PMID: 30972555; PMCID: PMC6570695.
140. Ninomiya K., Imamura M., Ishijima T., Yamahara T. 2013. Evaluation of extra-and intracellular OH radical generation, cancer cell injury, and apoptosis induced by a non-thermal atmospheric-pressure plasma jet Evaluation of extra-and intracellular OH radical generation, cancer cell injury, and apoptosis induced by a non-thermal atmospheric-pressure plasma jet. *Journal of Physics D Applied Physics* 46(46), 425401-4254018 DOI:10.1088/0022-3727/46/42/425401.

141. Nolan L.S., Parks O.B., Good M. 2020. A review of the immunomodulating components of maternal breast milk and protection against necrotizing enterocolitis. *Nutrients*, 12(1), 14; <https://doi.org/10.3390/nu12010014>.
142. Notarbartolo V., Giuffrè M., Montante C., Corsello G., Carta M. 2022. Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.*, 25(3)1, 94-210. doi: 10.5223/pghn.2022.25.3.194. Epub 2022 May 9. PMID: 35611376; PMCID: PMC9110848.
143. Nuriel-Ohayon M., Neuman H., Koren O. 2016. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Front. Microbiol.*, 7, 1031, doi:10.3389/fmicb.2016.01031.
144. Ocaña V., Silva C., Nader-Macías M.E. 2006. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Vaginal Lactobacilli, *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, Article ID 018182, 6 pages, <https://doi.org/10.1155/IDOG/2006/18182>.
145. Olivares M., Díaz-Roperó M., Martín R., Rodríguez J., Xaus J. 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J. Appl. Microbiol.*, 101, 72–79. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x.
146. Padilha M., Iaucci J.M., Cabral V.P., Diniz E.M.A., Taddei C.R., Saad S.M.I. 2019. Maternal antibiotic prophylaxis affects *Bifidobacterium* spp. counts in the human milk, during the first week after delivery. *Benef Microbes*. 13;10(2), 155–163. doi: 10.3920/BM2018.0046. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30574804.
147. Pandey P.K., Verma P., Kumar, H. Bavdekar A., Patole M.S. Shouche YS. 2012. Comparative analysis of fecal microflora of healthy full-term Indian infants born with different methods of delivery (vaginal vs. cesarean): *Acinetobacter* sp. prevalence in vaginally born infants. *J Biosci*, 37(1), 989–998. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9268-5>.
148. Pereira P.F., Alfenas Rde C. Araújo R.M. 2014. Does breastfeeding influence the risk of developing diabetes mellitus in children? A review of current evidence Does breastfeeding influence the risk of developing diabetes mellitus in children? A review of current evidence. *J Pediatr (Rio J)*. 90(1), 7–15. doi: 10.1016/j.jped.2013.02.024. Epub 2013 Oct 16. PMID: 24140380.

149. Perin J., Mulick A., Yeung D., Villavicencio F., Lopez G., Strong K.L., Prieto-Merino D., Cousens S., Black R.E., Liu L. 2022. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet Child Adolesc Health*. 6(2), 106–115. doi: 10.1016/S2352-4642(21)00311-4. Epub 2021 Nov 17. Erratum in: *Lancet Child Adolesc Health*. 2022 6(1):e4. PMID: 34800370; PMCID: PMC8786667.
150. Plaza-Díaz J., Fontana L., 2018. Gil A. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients*. 8;10(8):1038. doi: 10.3390/nu10081038. PMID: 30096792; PMCID: PMC6116142.
151. Pot B., Felis G.E., De Bruyne K., Tsakalidou E., Papadimitriou K., Leisner J., Vandamme P. 2014. The genus *Lactobacillus*. In: *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. Eds. W. H. Holzapfel, B.J.B. Wood. Wiley-Blackwell, pp. 249–353.
152. Pourbaferani M., Modiri S., Norouzy A., Maleki H., Heidari M., Alidoust L., Derakhshan V., Zahiri H.S., Noghabi K.A. 2021. A Newly Characterized Potentially Probiotic Strain, *Lactobacillus brevis* MK05, and the Toxicity Effects of its Secretory Proteins Against MCF-7 Breast Cancer Cells. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 13(4), 982-992. doi: 10.1007/s12602-021-09766-8. Epub 2021 Mar 9. PMID: 33687634.
153. R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
154. Rajoka M.S.R., Zhao, H., Mehwish H.M., Li N., Lu Y., Lian Z., Shao D., Jin M., Li Q., Zhao L., Shi J. 2019. Anti-tumor potential of cell free culture supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *Food Res. Int.* 123, 286–297.
155. Rajoka M.S.R., Mehwish H.M., Siddiq M., Haobin Z., Zhu J., Yan L., Shao D., Xu X., Shi J. 2017. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk, *LWT*, 84, 271-280. ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.055>.
156. Remoroza C.A., Mak T.D., De Leoz M.L.A., Mirokhin Y. A., Stein S.E. 2018. Creating a Mass Spectral Reference Library for Oligosaccharides in Human Milk.

Analytical Chemistry, 90(15), 8977–8988.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01176>.

157. Reven P., Mrak V., Matijašić B.B., Horvat S., Rogelj I. 2015. Administration of probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus gasseri* K7 during pregnancy and lactation changes mouse mesenteric lymph nodes and mammary gland microbiota. *J. Dairy Sci.*, 98, 2114–2128. doi:10.3168/jds.2014-8519.
158. Rinne M., Kalliomaki M., Arvilommi H., Salminen S., Isolauri E. 2005. Effect of Probiotics and Breastfeeding on the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus/Enterococcus* Microbiota and Humoral Immune Responses. *The Journal of Pediatrics*. 147(2), 186-191. bISSN 0022-3476, <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.03.053>.
159. Rodríguez J.M. 2014. The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv. Nutr.*, 5, 779–784. doi:10.3945/an.114.007229.
160. Rosiak E., Gemba M., Wesółowska A. 2020. Wpływ procesu zamrażania i rozmrażania na bezpieczeństwo mikrobiologiczne mleka kobiecego. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*. 27, 3(124), 40–51. DOI: 10.15193/zntj/2020/124/346
161. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 sierpnia 2018 r. w sprawie standardu organizacyjnego opieki okołoporodowej, XIII. Opieka nad noworodkiem pkt. 8, Dz.U. 2018 poz. 1756.
162. Sakwinska O., Moine D., Delley M., Combremont S., Rezzonico E., Descombes P., Vinyes-Pares G., Zhang Y., Wang P., Thakkar S.K. 2016. Microbiota In Brest milk of Chinese lactating mothers. *PLoS ONE* 11, e0160856, doi:10.1371/journal.pone.0160856.
163. Salminen M. K., Rautelin H., Tynkkynen S., Poussa T., Saxelin M., Valtonen V., Järvinen A. 2006. *Lactobacillus* Bacteremia, Species Identification, and Antimicrobial Susceptibility of 85 Blood Isolates, *Clinical Infectious Diseases*, 42(5), 35–44. <https://doi.org/10.1086/500214>.
164. Salone L.R., Vann W.F., Dee D.L. 2013. Breastfeeding: An overview of oral and general health benefits, *The Journal of the American Dental Association*, 144(2), 143–151. ISSN 0002-8177, <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2013.0093>.

165. Sánchez C., Fente C., Regal P., Lamas A., Lorenzo M.P. 2021. Human Milk Oligosaccharides (HMOs) and Infant Microbiota: A Scoping Review. *Foods*. 20;10(6):1429. doi: 10.3390/foods10061429. PMID: 34203072; PMCID: PMC8234547.
166. Satokari R., Gronroos T., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. 2009. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48, 8–12. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02475.x.
167. Schanler R.J. 2005. Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. *Pediatrics*, 116, 400–406.
168. Schumacher A., Vranken T., Malhotra A., Arts J.J.C., Habibovic P. 2018. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 37(2):187-208. doi: 10.1007/s10096-017-3089-2. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28871407; PMCID: PMC5780537.
169. Schwab C., Gänzle M. 2011. Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides, *FEMS Microbiology Letters*, 315 (2), 141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02185.x>.
170. Sharma C., Gulati S., Thakur N., Singh B.P., Gupta S., Kaur S., Mishra S.K., Puniya A.K., Gill J.P.S., Panwar H. 2017. Antibiotic sensitivity pattern of indigenous lactobacilli isolated from curd and human milk samples. *3 Biotech.*, 7(1):53. doi: 10.1007/s13205-017-0682-0. Epub Apr 25. PMID: 28444600; PMCID: PMC5428095.
171. Sharrow D., Hug L., You D., Alkema L., Black R., Cousens S., Croft T., Gaigbe-Togbe V., Gerland P., Guillot M., Hill K., Masquelier B., Mathers C., Pedersen J., Strong K.L., Suzuki E., Wakefield J., Walker N. 2022. UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation and its Technical Advisory Group. Global, regional, and national trends in under-5 mortality between 1990 and 2019 with scenario-based projections until 2030: a systematic analysis by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. *Lancet Glob Health*. Feb;10(2):e195-e206. doi: 10.1016/S2214-109X(21)00515-5. PMID: 35063111; PMCID: PMC8789561.

172. Silvers K.M., Frampton C.M., Wickens K., Pattemore P.K., Ingham T., Fishwick D., Crane J., Town G.I., Epton M.J. 2012. New Zealand Asthma and Allergy Cohort Study Group. Breastfeeding protects against current asthma up to 6 years of age. *J Pediatr.*, 160(6):991-6.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.11.055. Epub 2012 Jan 30. PMID: 22289356.
173. Sinkiewicz G., Ljunggren L. 2008. Occurrence of *Lactobacillus reuteri* in human breast milk. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 20, 122–126. doi:10.1080/08910600802341007.
174. Sinkiewicz G., Nordström E. 2005. Occurrence of *Lactobacillus Reuteri*, *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in Human Breast Milk. *Pediatr Res.*, 58, 415 <https://doi.org/10.1203/00006450-200508000-00382>.
175. Sinkiewicz-Darol E., Bernatowicz-Łojko U., Łubiech K., Adamczyk I., Twarużek M., Baranowska B., Skowron K., Spatz D.L. 2021. Tandem Breastfeeding: A Descriptive Analysis of the Nutritional Value of Milk When Feeding a Younger and Older Child. *Nutrients*, 19;13(1):277. doi: 10.3390/nu13010277. PMID: 33478010; PMCID: PMC7835967.
176. Sinkiewicz-Darol E., Martysiak-Żurowska D., Puta M., Adamczyk I., Barbarska O., Wesołowska A., Bernatowicz-Łojko U. 2022. Nutrients and Bioactive Components of Human Milk After One Year of Lactation: Implication for Human Milk Banks. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1;74(2), 284–291. doi: 10.1097/MPG.0000000000003298. PMID: 34520401.
177. Śliżewska K., Markowiak-Kopeć P., Śliżewska W. 2021. The Role of Probiotics in Cancer Prevention. *Cancers*. 13, 20. <https://doi.org/10.3390/cancers13010020>.
178. Smilowitz J.T., Lebrilla C.B., Mills D.A., German J.B., Freeman S.L. 2014. Breast Milk Oligosaccharides: Structure-Function Relationships in the Neonate. *Annual Review of Nutrition* 34(1), 143–169.
179. Smilowitz J.T., O’sullivan A., Barile D., German J.B., Lönnerdal B., Slupsky C.M. 2013. The human milk metabolome reveals diverse oligosaccharide profiles. *J. Nutr.*, 143, 1709–1718. doi: 10.3945/jn.113.178772.
180. Soto A., Martín V., Jiménez E., Mader I., Rodríguez J.M., Fernández L. 2014. *Lactobacilli* and *bifidobacteria* in human breast milk: Influence of antibiotherapy

- and other host and clinical factors. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.*, 59, doi:10.1097/MPG.0000000000000347.
181. Spatz D.L. 2014. Preventing Obesity Starts With Breastfeeding. *The Journal of Perinatal & Neonatal Nursing*, 28(1), 41-50, DOI: 10.1097/JPN.0000000000000009
  182. Stuebe A. 2009. The risks of not breastfeeding for mothers and infants. *Rev Obstet Gynecol.*, 2(4)222–231.
  183. Sullivan S., Schanler R.J., Kim J.H., Patel A.L., Trawöger R., Kiechl-Kohlendorfer U., Chan G.M., Blanco C.L., Abrams S., Cotten C.M., Laroia N., Ehrenkranz R.A., Dudell G., Cristofalo E.A., Meier ., Lee M.L., Rechtman D.J., Lucas A. 2010. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *J Pediatr.*, 156(4), 562-7.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.10.040. Epub 2009 Dec 29. PMID: 20036378.
  184. Sun L., Dicksved J., Priyashantha H., Lundh Å., Johansson M. 2019. Distribution of bacteria between different milk fractions, investigated using culture-dependent methods and molecular-based and fluorescent microscopy approaches. *J. Appl. Microbiol.* 127, 1028–1037. <https://doi.org/10.1111/jam.14377>
  185. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 71(3), 209–249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
  186. Taghizadeh M., Mirlohi M., Poursina F., Madani G., Khoshhali M., Bahreini N., Safaei H.G. 2015. The influence of impact delivery mode, lactation time, infant gender, maternal age and rural or urban life on total number of *Lactobacillus* in breast milk Isfahan – Iran. *Adv Biomed Res.* 27;4:141. doi: 10.4103/2277-9175.161546. PMID: 26322289; PMCID: PMC4549918.
  187. Thomas S.P., Denizer E., Zuffa S., Best B.M., Bode L., Chambers C.D., Dorrestein P.C., Liu G.Y., Momper J.D., Nizet V., Tsunoda S.M., Tremoulet A.H. 2023. Transfer of antibiotics and their metabolites in human milk: Implications for infant health and microbiota. *Pharmacotherapy.* 43(5), 442-451. doi: 10.1002/phar.2732. Epub 2022 Oct 18. PMID: 36181712.



188. Thongaram T., Hoeflinger J.L., Chow JM., Miller M.J. 2017. Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli, *Journal of Dairy Science*, 100(10), 7825–7833.
189. Thurl S., Munzert M., Henker J., Boehm G., Müller-Werner B., Jelinek J., Stahl B. 2010. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *British Journal of Nutrition*. 104(9), 1261–1271. doi:10.1017/S0007114510002072.
190. Totten S.M., Zivkovic A.M., Wu S., Ngyuen U., Freeman S.L., Ruhaak L.R., Darboe M.K., German J.B., Prentice A.M., Lebrilla C.B. 2012. Comprehensive profiles of human milk oligosaccharides yield highly sensitive and specific markers for determining secretor status in lactating mothers. *J. Proteome Res.*; 11: 6124–6133.
191. Turin C.G., Ochoa T.J. 2014. The Role of Maternal Breast Milk in Preventing Infantile Diarrhea in the Developing World. *Curr Trop Med Rep*. 1;1(2), 97–105. doi: 10.1007/s40475-014-0015-x. PMID: 24883263; PMCID: PMC4036098.
192. Twarużek M., Zastempowska E., Soszczyńska E., Ałtyn I. 2018. The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Acta Universitatis Lodzianis. Folia Biologica Et Oecologica*, 14, 23–32. <https://doi.org/10.1515/fobio-2017-0006>.
193. van den Elsen L.W.J, Garssen J., Burcelin R. Verhasselt V. 2019. Shaping the Gut Microbiota by Breastfeeding: The Gateway to Allergy Prevention? *Front. Pediatr.*, 7:47. doi: 10.3389/fped.2019.00047.
194. Van Rossum C.M.T., Büchner F.L., Hoekstra J. 2008. Dutch State Institute for Nutrition and Health. Quantification of health effects of breastfeeding. Review of the literature and model situation. RIVM Report 350040001/2005. <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/350040001.pdf>.
195. Verd S., Ginovart G., Calvo J., Ponce-Taylor J., Gaya A. 2018. Variation in the Protein Composition of Human Milk during Extended Lactation: A Narrative Review. *Nutrients*, 10(8), 1124. doi:10.3390/nu10081124.
196. Vieira Borba V., Sharif K., Shoenfeld Y. 2018. Breastfeeding and autoimmunity: Programming health from the beginning. *Am J Reprod Immunol*. 79(1). doi: 10.1111/aji.12778. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29083070.

197. Vinjamuri A., Davis J.C.C., Totten S.M., Wu L.D., Klein L.D., Martin M., Quinn E.A., Scelza B., Breakey A., Gurven M., Jasienska G., Kaplan H., Valeggia C., Hinde K., Smilowitz J.T., Bernstein R.M., Zivkovic A.M., Barratt M.J., Gordon J.I., Underwood M.A., Mills D.A., German J.B., Lebrilla C.B. 2022. Human Milk Oligosaccharide Compositions Illustrate Global Variations in Early Nutrition. *The Journal of Nutrition*, 152(5), 1239–1253. <https://doi.org/10.1093/jn/nxac027>.
198. Wang J., Zheng J., Shi W., Du N., Xu X., Zhang Y., Ji P., Zhang F., Jia Z., Wang Y., Zheng Z., Zhang H., Zhao F. 2018. Dysbiosis of maternal and neonatal microbiota associated with gestational diabetes mellitus. *Gut*. 67(9), 1614–1625. doi: 10.1136/gutjnl-2018-315988. Epub May 14. PMID: 29760169; PMCID: PMC6109274.
199. Wang L., Collins C., Ratliff M., Xie B., Wang Y. 2017. Breastfeeding Reduces Childhood Obesity Risks *Childhood Obesity*, 13:(3), 197–204. <https://doi.org/10.1089/chi.2016.0210>.
200. Wang M., Zhao Z., Zhao A., Zhang J., Wu W., Ren Z., Wang P., Zhang Y. 2020. Neutral Human Milk Oligosaccharides Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal and Infant Characteristics. *Nutrients*. 20;12(3), 826. doi: 10.3390/nu12030826. PMID: 32244912; PMCID: PMC7146356.
201. Wesołowska A., Sinkiewicz-Darol E., Barbarska O., Bernatowicz-Lojko U., Borszewska-Kornacka M.K., van Goudoever J.B. 2019. Innovative Techniques of Processing Human Milk to Preserve Key Components. *Nutrients*. 11(5):1169. <https://doi.org/10.3390/nu11051169>.
202. Wesołowska A., Sinkiewicz-Darol E., Barbarska O., Strom K., Rutkowska M., Karzel K., Rosiak E., Oledzka G., Orczyk-Pawitowicz M., Rzoska S., Borszewska-Kornacka M.K. 2018. New Achievements in High-Pressure Processing to Preserve Human Milk Bioactivity. *Front Pediatr*. 16;6:323. doi: 10.3389/fped.2018.00323. PMID: 30519550; PMCID: PMC6250976.
203. Wiciński M., Sawicka E., Gębalski J., Kubiak K., Malinowski B., 2020. Human Milk Oligosaccharides: Health Benefits, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology. *Nutrients*, 20;12(1):266. doi: 10.3390/nu12010266. PMID: 31968617; PMCID: PMC7019891.

204. Witkowska-Zimny M., Kaminska-El-Hassan E. 2017. Cells of human breast milk. *Cell Mol Biol Lett* 22, 11, <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0042-4>.
205. World Health Organization. *The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding: Report of an Expert Consultation*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2001; Available online: <https://www.who.int/topics/breastfeeding/en/.WHO/NHD/01.09,WHO/FCH/CAH/01.24>. (accessed on 28–30 March 2001).
206. World Health Organization. United Nations Children’s Fund (UNICEF). Global Breastfeeding Scorecard, 2019: Increasing Commitment to Breastfeeding through Funding and Improved Policies and Programmes; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019; Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326049> (accessed July 2019).
207. Wrigley E.A., Hutchinson S.A. 1990. Long-term breastfeeding: The secret bond, *Journal of Nurse-Midwifery*, 35(1), 35–41. [https://doi.org/10.1016/0091-2182\(90\)90055-A](https://doi.org/10.1016/0091-2182(90)90055-A).
208. Xia M., Luo J., Wang J., Liang Y. 2022. Association between breastfeeding and postpartum depression: A meta-analysis. *J Affect Disord.*308, 512–519. doi: 10.1016/j.jad.2022.04.091. Epub 2022 Apr 20. PMID: 35460745.
209. Xiao L., van De Worp W.R., Stassen R., van Maastrigt C., Kettelarij N., Stahl B., Blijenberg B., Overbeek S.A., Folkerts G., Garssen J., Van't Land B. 2019. Human milk oligosaccharides promote immune tolerance via direct interactions with human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 49(7), 1001–1014. doi: 10.1002/eji.201847971. Epub 2019 Apr 4. PMID: 30900752; PMCID: PMC6619030.
210. Zaręba D. 2008. Przeżywalność probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* w mleku niefermentowanym i fermentowanym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 5(60), 189–196.
211. Zhang X., Zhang B., Liu J., Liu J., Li C., Dong W., Fang S., Li M., Song B., Tang B., Wang Z., Zhang Y. 2015. Mechanisms of Gefitinib-mediated reversal of tamoxifen resistance in MCF-7 breast cancer cells by inducing ER $\alpha$  re-expression. *Sci Rep.* 3;5:7835. doi: 10.1038/srep07835. PMID: 25644501; PMCID: PMC4314651.

212. Zhang Y., Giovannucci E.L. 2022. Ultra-processed foods and health: a comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 6, 1–13. doi: 10.1080/10408398.2022.2084359. Epub ahead of print. PMID: 35658669.
213. Zheng J., Ruan L., Sun M., Gänzle M.G. 2015. A genomic view of lactobacilli and pediococci demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:7233–7243. <https://doi.org/10.1128/AEM.02116-15>.
214. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Toole P.W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G.E., Gänzle M.G., Lebeer S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 70(4), 2782–2858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107. Epub 2020 Apr 15. PMID: 32293557.
215. Zhou J.S., Pillidge C.J., Gopal P.K., Gill H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains, *International Journal of Food Microbiology*, 98(2), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.011>.
216. Zhou Y., Chen J., Li Q., Huang W., Lan H., Jiang H. 2015. Association between breastfeeding and breast cancer risk: evidence from a meta-analysis. *Breastfeed Med.* 10(3), 175-182. doi: 10.1089/bfm.2014.0141. Epub Mar 18. Erratum in: *Breastfeed Med.* 2015 Jun;10(5):288. PMID: 25785349.
217. Zhu M., Yang Z., Ren Y., Duan Y., Gao H., Liu B., Ye W., Wang J., Yin S. 2017. Comparison of macronutrient contents in human milk measured using mid-infrared human milk analyser in a field study vs. chemical reference methods. *Matern Child Nutr.* 13(1):10.1111/mcn.12248. doi: 10.1111/mcn.12248. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26914990; PMCID: PMC6866206.
218. Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D. 2020. Zmiany nomenklatury taksonomicznej ważnych gatunków probiotycznych bakterii *Lactobacillus*. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 27,3 (124), 5–14. DOI: 10.15193/zntj/2020/124/343.