

Bakterie z rodziny *Lactobacillaceae* w mleku kobiecym

Streszczenie

Karmienie piersią jest złotym standardem w żywieniu dzieci, co potwierdzają wiodące organizacje opiniotwórcze, takie jak Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) i Amerykańska Akademia Pediatrii (AAP). Wśród składników bioaktywnych można wymienić mikrobiotę mleka kobiecego. Na szczególną uwagę zasługują mikroorganizmy o potencjalnym charakterze probiotycznym. Badania podjęte w niniejszej pracy miały na celu scharakteryzowanie, w polskiej populacji kobiet karmiących piersią, częstości występowania w mleku kobiecym bakterii należących do *Lactobacillaceae* o potencjalnej aktywności probiotycznej. Przeanalizowano ich właściwości, takie jak przeżywalność w warunkach niskiej temperatury, oporność na antybiotyki czy możliwy wpływ na komórki raka piersi MCF-7 oraz korelację z zawartością makroskładników. Przebadano próbki mleka kobiecego pochodzące od 63 kobiet karmiących piersią będących na różnych etapach laktacji. Równocześnie z pobraniem próbek mleka, kobiety biorące udział w badaniu zostały poproszone o wypełnienie przygotowanego kwestionariusza. W ankiecie znalazły się pytania dotyczące m.in.: okoliczności porodu, stanu zdrowia matki, przyjmowanych leków i suplementów oraz stosowanej diety. Pytania miały na celu scharakteryzowanie badanej populacji oraz wskazanie potencjalnych zależności pomiędzy składem mikrobiologicznym mleka kobiecego a wskazanymi czynnikami. Badanie uzyskało zgodę lokalnej komisji bioetycznej o numerze KB921/2018. W celu identyfikacji bakterii należących do *Lactobacillaceae* zastosowano metodę hodowli na pożywce mikrobiologicznej MRS, a następnie identyfikację wyrosłych kolonii za pomocą spektrometrii masowej MALDI-TOF/MS oraz techniki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Badania wykazały obecność bakterii należących do *Lactobacillaceae* w 22,2% próbek mleka kobiecego włączonych do badania. Niektóre ze zidentyfikowanych szczepów zostały wyizolowane i poddane dalszym badaniom.

Badanie wrażliwości na antybiotyki przeprowadzono metodą dyfuzji krążków oraz pasków antybiotykowych (E-TEST). Badanie wykazało wrażliwość izolatów bakteryjnych na ampicylinę (10 µg), tetracyklinę (10 µg) i erytromycynę (15 µg), a także oporność na kanamycynę (30 µg) i gentamycynę (10 µg). Wrażliwość na wankomycynę (30 µg) wśród

badanych szczepów była różna. Uzyskane wyniki badań korelują z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

Kolejnym zadaniem podjętym w pracy było scharakteryzowanie przeżywalności badanych szczepów w środowisku pasteryzowanego mleka kobiecego przechowywanego w warunkach chłodniczych oraz zamrażalniczych. Proces pasteryzacji ma na celu zapewnienie bezpieczeństwa mikrobiologicznego noworodkom korzystającym z mleka pochodzącego z banków mleka. Niestety, zastosowanie tej techniki wpływa niekorzystnie na jakość produktu. Wysoka temperatura (62,5 °C) powoduje unicestwienie zarówno potencjalnych patogenów jak i mikroorganizmów o potencjalnie probiotycznym charakterze. Przeprowadzone badania wykazały, że badane szczepy bakterii należących do *Lactobacillaceae* charakteryzują się dobrą przeżywalnością w środowisku pasteryzowanego mleka kobiecego przechowywanego w obniżonej temperaturze (co ma miejsce również w bankach mleka), co umożliwia wykorzystanie omawianych szczepów bakteryjnych jako suplementu mleka kobiecego poddanego działaniu wysokiej temperatury.

W innym badaniu przeprowadzonym w ramach niniejszej pracy doktorskiej oceniano cytotoksyczne działanie metabolitów postbiotycznych szczepów bakterii należących do *Lactobacillaceae*, wyizolowanych z mleka kobiecego, względem komórek nowotworu piersi linii MCF-7. Do analiz zastosowano test MTT, w którym wykorzystano supernatanty zawierające postbiotyczne metabolity badanych szczepów bakteryjnych. Efekt sprawdzano po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. Wyniki wskazały, że metabolity postbiotyczne pochodzące z niektórych szczepów bakterii wyizolowanych z mleka kobiecego mogą mieć działanie cytotoksyczne w odpowiednim stężeniu.

Ostatnim zagadnieniem podjętym w pracy doktorskiej było scharakteryzowanie profilu oligosacharydów w badanych próbkach mleka kobiecego. Oznaczenia te wykonano we współpracy z Politechniką Gdańską, gdzie przeprowadzono analizę HMO zawartych w próbkach mleka kobiecego. Wyniki skorelowano z obecnością mikroorganizmów należących do *Lactobacillaceae* oraz informacjami uzyskanymi z wypełnionych kwestionariuszy.

Przeprowadzone badania wskazują, że mleko kobiece pochodzące od polskich kobiet karmiących piersią może być źródłem bakterii należących do *Lactobacillaceae*. Nie wszystkie próbki mleka kobiecego zawierają omawiane bakterie, co nie oznacza, że są one całkowicie pozbawione mikrobioty probiotycznej, do której należy wiele rodzajów mikroorganizmów. Przeprowadzone badania stanowią podstawę do dalszych badań nad wykorzystaniem w praktyce szczepów bakterii wyizolowanych ze środowiska mleka kobiecego.