

DISS. ETH. NO. 29315

**THE EFFECT OF IRON, GALACTO-OLIGOSACCHARIDES AND LACTOFERRIN ON
KENYAN INFANT GUT MICROBIOTA INVESTIGATED *IN VITRO***

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

CAROLE RACHMÜHL

MSc in Biology, University of Zurich

born on 06.12.1989

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner

Dr. Annelies Geirnaert, co-examiner

Prof. Dr. Gary Brittenham, co-examiner

2023

Summary

Infancy is a critical time window for iron nutrition and the development of the gut microbiota. Around the age of 4 to 6 months, introduction of complementary foods initiates the functional maturation of the gut microbiota, which is characterized by an increase in species richness and a shift from high relative abundance of genes involved in degradation of breast milk sugars to high relative abundance of genes involved in degradation of complex sugars and starch. Proper development of the gut microbiota and of the reciprocal interactions with the human host is key to gut homeostasis and short- and long-term health of the host. At the same time, the present iron stores at birth become depleted and the high iron requirements for growth, blood volume expansion and neurodevelopment should be met through the diet. In most developing countries, the low amount of bioavailable iron in the predominantly plant-based complementary foods does not meet the infants iron need, which increases the risk of iron deficiency and subsequently anemia (IDA). In such areas, home fortification with iron-containing micronutrient powders is recommended by the World Health Organization but concerns were raised following reports about adverse effects in infants receiving iron at the recommended high dose of 12.5 mg iron/day. Iron fortification was associated with gut microbiota dysbiosis and higher rates of infection and diarrhea. Therefore, modified micronutrient supplements, e.g. with lower iron dose combined with prebiotics and iron-sequestering lactoferrin, that favour a healthy gut microbiota while improving iron absorption are under investigation. To improve the development and proper design of such supplements to combat the high rates of IDA in infants living in developing countries and in settings with a high infection burden, a deeper understanding of their effect on the gut microbiota is needed. Therefore, the overall objective of this thesis was to extend the knowledge about the impact of dietary iron, galacto-oligosaccharides (GOS) and bovine lactoferrin (bLF) supplementation on the gut microbiota of infants living in a rural area of Kenya and to develop an *in vitro* gut fermentation model approach to closely mimic the Kenyan infant gut microbiota, which allows to study the impact of dietary interventions.

In the first study, it was evaluated whether protected transport of fresh feces from Kenyan infants prior to batch cultivation in host-diet adapted conditions allows to regrow a representative community of the Kenyan infant fecal microbiota (**chapter 2**). Fresh fecal samples were transported under cooled and anaerobic conditions and subsequently prepared for inoculation within less than 30 h for batch cultivation. A diet-adapted cultivation medium was used that mimicked the daily intake of breast milk and maize porridge in Kenyan infants during weaning. After cultivation started at an initial pH 7.6, the fraction of most ($\geq 1\%$) abundant bacterial genera shared between fermentation and fecal samples was high at $97 \pm 5\%$. However, *Escherichia-Shigella*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Bacteroides* and *Enterococcus* were enriched concomitant with decreased *Bifidobacterium* abundance. Decreasing the

initial pH to 6.9 lead to higher abundance of *Bifidobacterium* after incubation and increased the compositional similarity of fermentation and fecal samples. The metabolic activity was well-reproduced. Despite similar total metabolite production of all fecal microbiota after cultivation, inter-individual differences in metabolite profiles were apparent.

Next, the continuous fermentation model PolyFermS, which mimics the *in vivo* proximal colon conditions, was adjusted to grow a representative community of the Kenyan infant fecal microbiota over long-term continuous fermentation (**chapter 3**). Fresh Kenyan infant fecal microbiota was immobilized in porous polymer beads and used to inoculate a continuous bioreactor fed with medium designed to mimic the daily diet of Kenyan infants during weaning and operated in conditions mimicking the proximal colon of infants. Different factors were stepwise investigated, including fructo-oligosaccharides (FOS) supplementation (1, 4 and 8 g/L) and cultivation pH (5.8 and 6.3). Highest similarity between *in vitro* and fecal microbiota composition and metabolic activity was observed upon cultivation at pH 5.8 with 1 g/L of FOS in the medium and these parameters were therefore selected for investigating the stability of the PolyFermS model over up to 107 days continuous cultivation. The fraction of most ($\geq 1\%$) abundant bacterial genera shared between *in vitro* and fecal microbiota of four Kenyan infants was stable and high at 74% to 89% over up to 107 days of culture. Community diversity and the most abundant genera, including infant-characteristic *Bifidobacterium*, were also maintained during the whole fermentation. However, compared to the fecal microbiota, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides* and *Collinsella* were generally enriched, and *Bifidobacterium* was decreased. Relevant infant microbiota metabolite profiles, propiogenic and butyrogenic, were reproduced and a high stability of metabolite production was measured over up to 107 days continuous culture.

Lastly, the newly developed Kenyan infant PolyFermS model was applied to investigate the effect of iron, GOS and bLF supplementation on the composition and metabolic activity of Kenyan infant gut microbiota (**chapter 4**). Two independent Kenyan infant PolyFermS models were treated during 7 to 12 days of continuous fermentation with iron, GOS and bLF at concentrations mimicking the dose given to Kenyan infants *in vivo*. Treatments were repeated during two and three experimental periods, respectively. Addition of GOS, alone and combined with bLF, during iron supplementation increased beneficial *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, and metabolic activity. The total metabolite concentration increased by 58 to 76 mM and 24 to 36 mM in the two donor microbiota, respectively, upon GOS supplementation and was driven by increased SCFA production. Concomitant potential pathogens, such as *C. difficile* and *C. perfringens*, were decreased with addition of GOS, alone and combined with bLF, compared to iron supplementation alone. For *C. difficile*, a \log_2 -fold decrease in relative abundance from 1.8 to 4.3 and 2.3 to 3.8 was observed in the two donor microbiota,

respectively, with GOS alone and combined with bLF compared to iron only treatment. Iron and bLF supplementation alone did not affect the Kenyan infant gut microbiota composition and metabolic activity. The impact of microbiota compounds present in supernatant of iron-, GOS- and bLF-modified Kenyan infant gut microbiota on host gut barrier function, ETEC infection and inflammation was assessed using an *in vitro* co-culture model of epithelial and immune cells (**chapter 4**). The epithelial barrier was strengthened when exposed to supernatant from combined GOS and bLF-treated PolyFermS microbiota of one out of the two donor microbiota. ETEC infection of epithelial cells was not impacted, while decreased infection-induced cell death and pro-inflammatory response were observed for GOS- and bLF-modified microbiota supernatant but were donor-dependent.

In conclusion, an *in vitro* gut fermentation model approach to closely mimic the Kenyan infant gut microbiota was successfully developed and validated. Protected transport of fresh feces from Kenyan infants allowed to extend the time between fecal sampling and inoculation for cultivation to 30 h without major loss of bacterial diversity. The continuous fermentation model PolyFermS was successfully adjusted to grow a representative community of the Kenyan infant fecal microbiota over long-term continuous fermentation and the newly developed Kenyan infant PolyFermS model was applied to study the impact of iron, GOS and bLF supplementation on the Kenyan infant gut microbiota. Beneficial effects of GOS supplementation with or without bLF during iron treatment on microbiota composition and activity were observed, while iron and bLF supplementation alone did not impact the Kenyan infant gut microbiota. Compounds derived from GOS- and bLF modified-microbiota enhanced the epithelial barrier function and decreased infection-induced cell death and pro-inflammatory response, but in a donor-dependent way. Overall, the herein gained knowledge about the impact of dietary iron, GOS and bLF supplementation on the Kenyan infant gut microbiota will be useful in the development of nutritional formulations combating IDA and support understanding of observations from the parallel cohort study in Kenyan infants. Moreover, the validated Kenyan infant PolyFermS model is a powerful tool for future screening of dietary compounds prior to *in vivo* trials and for studying other gut microbiota modulating strategies, such as co-supplementation of GOS and probiotics, during iron supplementation.

Zusammenfassung

Das Säuglingsalter ist ein kritisches Zeitfenster für den Eisenbedarf und die Entwicklung der Darmmikrobiota. Im Alter von 4 bis 6 Monaten, mit der Einführung von Beikost, beginnt die funktionelle Reifung der Darmmikrobiota, die gekennzeichnet ist durch eine Zunahme des Artenreichtums und eine Verschiebung von einer hohen relativen Häufigkeit von Genen, die am Abbau von Muttermilchzucker beteiligt sind, zu einer hohen relativen Häufigkeit von Genen, die am Abbau von komplexen Zuckern und Stärke beteiligt sind. Die Entwicklung der Darmmikrobiota und der wechselseitigen Interaktionen mit dem menschlichen Wirt ist der Schlüssel zur Darmhomöostase und zur kurz- und langfristigen Gesundheit des Wirts. Zur gleichen Zeit gehen die bei der Geburt vorhandenen Eisenspeicher zu Neige, und der hohe Eisenbedarf für das Wachstum, die Vergrößerung des Blutvolumens und für die neuronale Entwicklung sollte durch die Ernährung gedeckt werden. In den meisten Entwicklungsländern reicht die geringe Menge an bioverfügbarem Eisen in der hauptsächlich Pflanzen-basierten Beikost nicht aus, um den Eisenbedarf des Säuglings zu decken, was das Risiko eines Eisenmangels und in der Folge einer Anämie (IDA) erhöht. In solchen Gebieten wird von der Weltgesundheitsorganisation die Anreicherung der Beikost mit eisenhaltigen Mikronährstoffpulvern empfohlen, doch es wurden Bedenken laut, nachdem Berichte über unerwünschte Wirkungen bei Säuglingen aufgetaucht waren, die Eisen in der empfohlenen hohen Dosis von 12,5 mg Eisen/Tag erhielten. Die Eiseneinnahme wurde mit einer Dysbiose der Darmmikrobiota und höheren Infektionsraten und Durchfallerkrankungen in Verbindung gebracht. Daher werden derzeit modifizierte Mikronährstoffpulver untersucht, z. B. mit einer niedrigeren Eisendosis in Kombination mit Präbiotika und eisenbindendem Lactoferrin, die eine gesunde Darmmikrobiota begünstigen und gleichzeitig die Eisenaufnahme verbessern sollen. Um die Entwicklung und das Design solcher Nahrungsergänzungsmittel zur Bekämpfung der hohen IDA-Raten bei Säuglingen in Entwicklungsländern und in Umgebungen mit hoher Infektionsbelastung zu verbessern, ist ein besseres Verständnis ihrer Auswirkungen auf die Darmmikrobiota erforderlich. Daher bestand das übergeordnete Ziel dieser Arbeit darin, das Wissen über die Auswirkungen einer Nahrungsergänzung mit Eisen, Galacto-Oligosacchariden (GOS) und Rinder-Lactoferrin (bLF) auf die Darmmikrobiota von Säuglingen in einem ländlichen Gebiet Kenias zu erweitern und ein *in vitro* Darmfermentationsmodell zu entwickeln, das die Darmmikrobiota kenianischer Säuglinge möglichst genau nachahmt und es ermöglicht, die Auswirkungen von Ernährungsinterventionen zu untersuchen.

In der ersten Studie wurde untersucht, ob der geschützte Transport frischer Fäkalien von kenianischen Säuglingen vor der Kultivierung unter an die Wirtsdiät angepassten Bedingungen das Wachstum einer repräsentativen Gemeinschaft der fäkalen Mikrobiota ermöglicht (**Kapitel 2**). Frische Stuhlproben wurden unter gekühlten und anaeroben Bedingungen transportiert und anschließend innerhalb von

weniger als 30 Stunden für die Inokulation zur Batch-Kultivierung vorbereitet. Es wurde ein an die Ernährung angepasstes Kultivierungsmedium verwendet, das die tägliche Aufnahme von Muttermilch und Maisbrei bei kenianischen Säuglingen während der Entwöhnung nachahmte. Nach Beginn der Kultivierung bei einem anfänglichen pH-Wert von 7.6 war der Anteil der häufigsten ($\geq 1\%$) Bakteriengattungen in den Fermentations- und Fäkalproben mit $97 \pm 5\%$ sehr hoch. Allerdings wurden *Escherichia-Shigella*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Bacteroides* und *Enterococcus* angereichert, während die Häufigkeit von *Bifidobacterium* abnahm. Die Senkung des anfänglichen pH-Werts auf 6.9 führte zu einer höheren Abundanz von *Bifidobacterium* nach der Kultivierung und erhöhte die Ähnlichkeit der Zusammensetzung von Fermentations- und Fäkalproben. Die Stoffwechselaktivität war gut reproduzierbar. Trotz ähnlicher metabolischer Aktivität aller fäkalen Mikrobiota nach der Kultivierung waren interindividuelle Unterschiede in den Metabolitenprofilen erkennbar.

Als nächstes wurde das kontinuierliche Fermentationsmodell PolyFermS, das die *in vivo* Bedingungen im proximalen Dickdarm nachahmt, angepasst, um eine repräsentative Gemeinschaft der fäkalen Mikrobiota kenianischer Säuglinge über eine langfristige kontinuierliche Fermentation zu kultivieren (**Kapitel 3**). Frische fäkale Mikrobiota wurde in porösen Polymerkugeln immobilisiert und zur Beimpfung eines Bioreaktors verwendet. Dem Bioreaktor wurde ein Medium zugeführt, das die tägliche Ernährung kenianischer Säuglinge während der Entwöhnung nachahmt und der Bioreaktor wurde unter Bedingungen betrieben, die den proximalen Dickdarm von Säuglingen nachahmen. Verschiedene Faktoren wurden schrittweise untersucht, darunter die Supplementierung mit Fructo-Oligosacchariden (FOS) (1, 4 und 8 g/L) und der pH-Wert der Kultivierung (5,8 und 6,3). Die größte Ähnlichkeit in der Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der *in vitro* und der fäkalen Mikrobiota wurde bei der Kultivierung bei einem pH-Wert von 5,8 mit 1 g/L FOS im Medium beobachtet. Diese Parameter wurden daher für die Untersuchung der Stabilität des PolyFermS-Modells über eine kontinuierliche Kultivierung von bis zu 107 Tagen ausgewählt. Der Anteil der am häufigsten ($\geq 1\%$) vorkommenden Bakteriengattungen, den die *in vitro* und die fäkale Mikrobiota von vier kenianischen Säuglingen gemeinsam hatten, war hoch bei 74% bis 89% und stabil über eine Kulturdauer von bis zu 107 Tagen. Die Artenvielfalt und die häufigsten Gattungen, darunter das für Säuglinge charakteristische *Bifidobacterium*, blieben während der gesamten Fermentation erhalten. Im Vergleich zur fäkalen Mikrobiota waren jedoch *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides* und *Collinsella* generell angereichert, während die Häufigkeit von *Bifidobacterium* tiefer war. Relevante Metabolitenprofile der Säuglingsdarmmikrobiota, nämlich propiogene und butyrogene, wurden reproduziert, und es wurde eine hohe Stabilität der Metabolitenproduktion über eine kontinuierliche Kultivierung von bis zu 107 Tagen gemessen.

Abschliessend wurde das neu entwickelte PolyFermS-Modell für kenianische Säuglinge angewandt, um die Auswirkungen einer Supplementierung mit Eisen, GOS und bLF auf die Zusammensetzung und metabolische Aktivität der Darmmikrobiota kenianischer Säuglinge zu untersuchen (**Kapitel 4**). Zwei unabhängige PolyFermS-Modelle wurden während 7 bis 12 Tagen kontinuierlicher Fermentation mit Eisen, GOS und bLF behandelt. Die Konzentrationen entsprachen der Dosis, die kenianischen Säuglingen *in vivo* verabreicht wird. Die Behandlungen wurden während zwei bzw. drei Versuchsperioden wiederholt. Die Zugabe von GOS, einzeln oder zusammen mit bLF, während der Eisenzuführung erhöhte die nützlichen Bifidobakterien und Lactobazillen sowie die Stoffwechselaktivität. Die Gesamtkonzentration der Metaboliten stieg in den beiden Spender-Mikrobiota nach der GOS-Supplementierung um 58 bis 76 mM bzw. 24 bis 36 mM, was auf eine erhöhte SCFA-Produktion zurückzuführen war. Potenzielle Krankheitserreger wie *C. difficile* und *C. perfringens* wurden durch die Zugabe von GOS, einzeln und zusammen mit bLF, im Vergleich zu einer alleinigen Eisenzuführung verringert. Bei *C. difficile* wurde eine \log_2 -fache Abnahme der relativen Häufigkeit von 1.8 bis 4.3 bzw. von 2.3 bis 3.8 in den beiden Spender-Mikrobiota beobachtet. Die alleinige Zuführung von Eisen und Eisen mit bLF hatte keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota kenianischer Säuglinge und deren Stoffwechselaktivität. Die Auswirkungen von Verbindungen aus der mit Eisen, GOS und bLF modifizierten PolyFermS-Darmmikrobiota kenianischer Säuglinge auf die Barrierefunktion des Wirtsdarms, bakterielle Infektionen und Entzündungen wurden anhand eines *in vitro* Co-Kultur-Modells von Epithel- und Immunzellen untersucht (**Kapitel 4**). Die Epithelbarriere wurde gestärkt, wenn sie dem Überstand der kombinierten GOS- und bLF-behandelten Mikrobiota eines von zwei Spender-Mikrobiota ausgesetzt wurde. Die Besiedlung der Epithelzellen mit Krankheitserregern wurde nicht beeinträchtigt, während der infektionsbedingte Zelltod und die proinflammatorische Antwort mit GOS- und bLF-modifiziertem Mikrobiota-Überstand abnahmen, was jedoch abhängig vom Spender war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein *in vitro* Darmfermentationsmodell, das die Darmmikrobiota kenianischer Säuglinge genau nachahmt, erfolgreich entwickelt und validiert wurde. Der geschützte Transport frischer Fäkalien von kenianischen Säuglingen konnte die Zeit zwischen der Entnahme der Fäkalproben und der Beimpfung für die Kultivierung auf 30 Stunden verlängern, ohne dass es zu einem größeren Verlust an bakterieller Vielfalt kam. Das kontinuierliche Fermentationsmodell PolyFermS wurde erfolgreich angepasst, um eine repräsentative Gemeinschaft der fäkalen Mikrobiota kenianischer Säuglinge über eine langfristige kontinuierliche Fermentation zu kultivieren. Das neu entwickelte PolyFermS-Modell für kenianische Säuglinge wurde angewendet, um die Auswirkungen einer Supplementierung mit Eisen, GOS und bLF auf die Darmmikrobiota kenianischer Säuglinge zu untersuchen. Es wurden positive Auswirkungen der GOS-Supplementierung auf die Zusammensetzung und Aktivität der Mikrobiota beobachtet, während die Supplementierung

mit Eisen und bLF keinen Einfluss auf die Darmmikrobiota kenianischer Säuglinge hatte. Aus der GOS- und bLF-modifizierten Mikrobiota stammende Verbindungen verbesserten die epitheliale Barrierefunktion und verringerten den infektionsbedingten Zelltod und die proinflammatorische Antwort, allerdings auf eine vom Spender abhängige Weise. Insgesamt werden die hier gewonnenen Erkenntnisse über die Auswirkungen einer Nahrungsergänzung mit Eisen, GOS und bLF auf die Darmmikrobiota kenianischer Säuglinge bei der Entwicklung von Nahrungsergänzungsmitteln zur Bekämpfung von IDA nützlich sein. Darüber hinaus ermöglicht das validierte PolyFermS-Modell für kenianische Säuglinge zukünftiges Screening von Nahrungszusätzen vor der Durchführung von Versuchen *in vivo* und die Untersuchung anderer Strategien zur Modulation der Darmmikrobiota, wie z. B. die gleichzeitige Supplementierung von GOS und Probiotika während der Eisenzuführung.