

DISS. ETH NO. 21169

**IMPACT OF MATERNAL BREAST MILK ON NEONATAL GUT MICROBIOTA  
ESTABLISHMENT – A MECHANISTIC STUDY**

A dissertation submitted to

**ETH ZURICH**

for the degree of

**Doctor of Sciences**

presented by

**TED PIERRE JOST**

Dipl. Lm.-Ing. ETH Zurich

born March 26, 1980

citizen of Luxembourg (L)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner

Prof. Dr. Seppo Salminen, co-examiner

Prof. Dr. Christian Braegger, co-examiner

Dr. Christophe Chassard, co-examiner

**2013**

# Summary

---

The human gastrointestinal tract harbours one of the densest bacterial ecosystems found in nature, conferring its host with increased digestive capacity, beneficial metabolites and vitamins and protection against pathogens. However, imbalances in host-microbe interactions can lead to inflammatory responses targeted at the microbiota, resulting in immune-related disorders, such as IBD. In contrast to the adult gut, establishment of the neonatal gut microbiota starts from birth, and it has been suggested that the first contacts with pioneer bacteria could be deterministic for subsequent gut maturation, metabolic and immunologic programming, and consequently for short- and long-term health status.

This study aimed to investigate the establishment of the neonatal gut microbiota and to identify pioneer bacteria in healthy, vaginally delivered, exclusively breast-fed neonates as intended by nature, and to assess the impact of maternal bacteria on microbiota establishment. To this purpose, neonatal feces, and corresponding maternal breast milk and feces were collected from seven mother-neonate pairs during the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> week of life using anaerobic sampling techniques, and analyzed by anaerobic culture methods complemented by molecular methods like 16S rRNA gene sequencing and fingerprinting, quantitative PCR, and pyrosequencing.

Using both anaerobic culture-dependent methods and culture-independent molecular methods, we were able to contribute further to the understanding of early neonatal gut microbiota establishment by showing that obligate anaerobes, such as *Bacteroides* spp. may become dominant early in the successional process of colonization. While early colonization with *Bifidobacterium* spp. is in agreement with previous research, the presence of members of the Bacteroidetes as pioneer bacteria, demonstrates that obligate gut-associated anaerobes may reach adult-like population densities during already at the neonatal stage. Consequently the switch from facultative to strict anaerobes may occur earlier than previously assumed.

Early colonization to high densities with major gut-associated obligate anaerobes that are unlikely to proliferate outside their host raises the question of their origin. Breast milk has been shown to harbour viable bacteria, including anaerobes such as *Bifidobacterium* and furthermore, DNA belonging to the major gut-associated anaerobes. Thus, our aim was to analyze the bacterial composition of breast milk and to isolate gut-associated anaerobes. As a result, we were able to isolate significant populations of obligate anaerobes, including *Bifidobacterium* and *Veillonella* spp. from breast milk. Interestingly, DNA belonging to a variety of obligate anaerobic, gut-associated genera, such as *Bacteroides* and multiple members of the Clostridia class was detected, raising the question of their origin.

Therefore, we investigated the hypothesis of a novel way of mother-neonate communication, in which maternal gut bacteria reach breast milk via translocation and a bacterial entero-mammary pathway to influence neonatal gut colonization and maturation of the immune system. We established a collection of neonatal fecal, and corresponding maternal breast milk and fecal strains and used molecular fingerprinting methods to detect common isolates transferred from mother to neonate via breast milk. *Bifidobacterium breve* isolates were shared between maternal feces, breast milk and corresponding neonatal feces, which supports the hypothesis of mother-neonate communication via breast milk. However, no viable isolates of the major gut-associated obligate anaerobes were identified as shared between all three ecosystems within mother-neonate pairs, which could be due to methodological limits, differences in population levels between the three ecosystems and factors like antimicrobial compounds in breast milk.

Assessing whether changes in maternal gut microbiota would occur during the perinatal period could indicate increased translocation, but, the maternal gut microbiota and metabolites composition remained stable during the perinatal period. However, calprotectin levels suggested low-grade inflammation, which may reduce gut epithelial barrier integrity, favor bacterial translocation and possibly alter the bacterial inoculum and/or immunologic components of breast milk transferred to the breast-fed neonate.

This study allowed identifying a range of gut-associated obligate anaerobes, such as *Bifidobacterium*, *Bacteroides* and members of the Clostridia potentially shared between maternal feces, breast milk and neonatal feces, which we could demonstrate based on strain-level discrimination of *Bifidobacterium breve*. Furthermore, DNA belonging to butyrate-producing members of the Clostridia that are important for colonic health were shared between maternal feces and breast milk. Thus, this study provides evidence supporting the hypothesis of mother-neonate communication via breast milk. However, in future research it remains to be elucidated whether these anaerobes escaped culture due to their low abundance in breast milk and/or due to fastidious growth requirements and/or the presence of antimicrobial compounds, or if dead cells or parts thereof are transferred to the breast-fed neonate, which nevertheless could elicit an immune response and affect neonatal GIT and immunity maturation. Advanced culture-dependent approaches like the recently described ‘microbial culturomics’ may provide further evidence on the way maternal bacteria are transferred from mother to neonate and extend our knowledge on which bacterial species shall be considered as potential probiotics in terms of novel formulae development in order to closer mimic nature’s model (e.g. *Bacteroides* and *Veillonella* spp.).

# Zusammenfassung

---

Der menschliche Magen-Darm-Trakt beherbergt eines der am dichtest besiedelten bakteriellen Ökosysteme, welches seinem Wirt eine erhöhte Verdauungskapazität verleiht, gesundheitsfördernde Stoffwechselprodukte und essentielle Vitamine liefert sowie vor pathogenen Bakterien schützt. Wenn die Wechselbeziehung zwischen Wirt und Darmflora jedoch aus dem Gleichgewicht gerät, kann es zu Entzündungsreaktionen gegen die eigene Darmflora kommen, was wiederum zu immunvermittelten Erkrankungen, wie beispielsweise entzündliche Darmerkrankung, führen kann. Im Gegensatz zum Darm eines Erwachsenen ist der Darm des Neugeborenen keimfrei und die Entstehung der Darmflora beginnt erst ab der Geburt. Es wird vermutet, dass die frühen Kontakte mit bakteriellen Erstbesiedlern massgeblich an der weiteren Maturation des Darms, des Stoffwechsels und des Immunsystems beteiligt sind und daher sowohl kurz als auch langfristigen Gesundheitsstatus beeinflussen.

Das Ziel dieser Studie war die Entstehung der Darmflora des auf natürlichem Wege geborenen und gestillten Neugeborenen zu untersuchen, sowie den Einfluss der mütterlichen Flora, zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden Stuhlproben von Neugeborenen und entsprechende Muttermilch und mütterliche Stuhlproben von sieben Mutter-Kind Paaren während der 1<sup>sten</sup>, 2<sup>ten</sup> und 4<sup>ten</sup> Woche nach der Geburt gesammelt, und mittels anaerober Kulturmethoden, ergänzt durch molekulare Methoden wie 16S rRNA Gensequenzierung, genetische Fingerabdrücke, Echtzeit-PCR und Pyrosequenzierung, untersucht.

Anwendung der anaeroben Kulturmethoden und molekularen Methoden haben weiter zum Verständnis der Entstehung der Darmflora beigetragen und zeigten, dass obligate Anaerobier wie *Bacteroides* spp. frühzeitig die Darmflora dominieren können. Während eine frühe Kolonisierung mit *Bifidobacterium* spp. mit früheren Erkenntnissen übereinstimmt, deutet die

Erstbesiedlung mit Stämmen des Bacteroidetes Phylum darauf hin, dass der Wechsel von fakultativen zu obligaten Anaerobiern früher stattfinden kann als bisher angenommen.

Aufgrund der frühen Besiedlung typischer darmassoziierter Anaerobiern mit einer hohen Zellzahl, welche sich in der Regel nicht ausserhalb ihres Wirts vermehren, stellt sich die Frage, wo diese Bakterien herkommen. In früheren Studien wurde gezeigt, dass Muttermilch lebende Bakterien einschliesslich Anaerobier wie *Bifidobacterium* spp. und auch DNA von typischen Darmbakterien enthält. Unser Ziel war es deshalb die bakterielle Zusammenstellung von Muttermilch genauer zu untersuchen und typische anaerobe Darmbakterien zu isolieren, mit dem Ergebnis, dass signifikante Mengen an Anaerobiern wie *Bifidobacterium* und *Veillonella* isoliert werden konnten. Interessanterweise wurde auch die DNA einer Reihe von anaeroben Darmbakterien, wie beispielsweise *Bacteroides* und mehrere Mitglieder der Klasse Clostridia, gefunden. Daher stellte sich zudem die Frage nach der Herkunft solcher Bakterien.

Zu diesem Zweck haben wir die Hypothese eines neuartigen Weges der Kommunikation zwischen Mutter und Neugeborenen untersucht, wobei mütterliche Darmbakterien mittels bakterieller Translokation auf einem endogenen Weg zu den Milchdrüsen migrieren und im Anschluss die Entstehung der Darmflora sowie die Maturation des Darms und Immunsystems des gestillten Neugeborenen beeinflussen. Hierzu haben wir eine Stammsammlung von Isolaten des Stuhls des Neugeborenen sowie von entsprechender Muttermilch und mütterlichem Stuhl erstellt. Mittels molekularer Fingerabdruckmethoden konnten wir gemeinsame Isolate von *Bifidobacterium breve* auf Stammesebene identifizieren, welche über die Milch der Mutter dem Neugeborenen übertragen wurden, was die Hypothese des neuartigen Weges der Mutter-Neugeborenen Kommunikation unterstützt. Es wurden jedoch keine der lebende Kulturen der hauptsächlich mit dem Darm assoziierten Anaerobier zwischen allen drei Ökosystemen bei Mutter-Kind Paaren entdeckt, was möglicherweise auf die Grenzen der verfügbaren Kulturmethoden und auf andere Faktoren wie beispielsweise antimikrobielle Komponenten in Muttermilch zurückzuführen ist.

Im Anschluss wurde untersucht, ob Veränderungen der mütterlichen Darmflora auf erhöhte bakterielle Translokation hinweisen können. Jedoch blieb die Zusammenstellung der Darmflora und Stoffwechselprodukte stabil. Eine erhöhte Calprotectinkonzentration im Stuhl hingegen wies auf einen leichten Entzündungsstatus hin, was die Integrität des Darmepithels beeinflusst und auf erhöhte bakterielle Translokation hinweisen und folglich das bakterielle und immunologische Komponenten beeinflussen kann, die dem Neugeborenen über die Milch übertragen werden.

In dieser Studie wurde eine Reihe darmassoziierter Anaerobier wie *Bifidobacterium*, *Bacteroides* spp. und einige Mitglieder der Clostridia identifiziert. Diese Anaerobier kommen potenziell im mütterlichen Stuhl, in der Muttermilch und im Stuhl des Neugeborenen vor, was wir anhand von *Bifidobacterium* *beve* auf Stammesebene demonstrieren konnten. Zudem wurde DNA der hauptsächlich Buttersäure produzierenden Mitglieder der Clostridia, welche wichtig für die Gesundheit des Darms sind, in der Muttermilch detektiert. Somit liefert diese Studie Erkenntnisse, welche die Hypothese des neuartigen Weges der Mutter-Kind Kommunikation mittels Muttermilch unterstützt. Es bleibt jedoch noch zu ermitteln, ob solche Anaerobier mit den verfügbaren anaeroben Kulturmethoden aufgrund ihrer geringen Anzahl in Muttermilch, und/oder aufgrund ihrer hohen Nährstoffansprüche, und/oder aufgrund antimikrobieller Muttermilchkomponenten nicht isoliert werden konnten, oder ob es sich dabei um tote Zellen, respektive Teile davon, handelt, die dem Neugeborenen übertragen werden. Im letzteren Fall würden diese dennoch eine Immunreaktion hervorrufen und die Maturation des Darms und des Immunsystems des Neugeborenen beeinflussen. Fortgeschrittene Kulturmethoden, wie der vor Kurzem beschriebene ‘culturomics’ Ansatz, könnten in Zukunft dazu verhelfen weitere mütterliche Bakterien zu isolieren, welche dem Neugeborenen über die Milch übertragen werden, und unser Wissen erweitern, welche bakterielle Spezies als potenzielle Probiotika für die Entwicklung neuartiger Ersatzmilch anzusehen sind, um dem natürlichen Modell näher zu kommen (wie beispielsweise *Bacteroides* und *Veillonella* spp.).