UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

Facultad de Ciencias de la Salud

Grado en Biotecnología

Trabajo Fin de Grado

Curso 2025-2026

Comunidades sintéticas bacterianas como herramienta para el estudio del impacto de componentes dietéticos sobre la microbiota materno-infantil.

Autor

Berrocal Cepeda, Andrés David.

Tutor UEV

Dr. Pajuelo Gámez, David

Tutor externo.

Dra. Selma-Royo, Marta

Valencia, 2026

Comunidades sintéticas bacterianas como herramienta para el estudio del impacto de componentes dietéticos sobre la microbiota materno-infantil.

Trabajo Final de Grado, presentado por:

Berrocal Cepeda, Andrés David

Tutorizado por:

Dr. Pajuelo Gámez, David

Tutorizado por:

Dra. Selma-Royo, Marta

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

VALENCIA

CURSO 2025-2026

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis padres, por su esfuerzo diario y por brindarme la oportunidad de estudiar la carrera de mis sueños, con la que podré hacer realidad mis proyectos futuros. A mis hermanos y amigos de todas partes, gracias por ser mi apoyo constante y darme ánimos en los momentos más difíciles.

Tampoco pueden faltar mis compañeras y, sobre todo, AMIGAS de la universidad, con quienes he sufrido, reído y llorado a lo largo de esos cuatro años. Son recuerdos inolvidables que se quedarán para siempre conmigo. Una mención especial a Ximena, con quien he convivido estos dos últimos años; nunca olvidaré nuestras charlas nocturnas a la una de la mañana replanteándonos la vida y nuestro futuro, y preguntándonos si estábamos eligiendo bien el rumbo.

Agradezco también a todos los profesores que nos han acompañado durante esta trayectoria por sus enseñanzas y su trato cercano. Gracias por esas grandes charlas motivadoras y, a veces, un poco existenciales, que nos han empujado a reflexionar sobre qué camino seguir. En especial, gracias a mi tutor David, por guiarme en este TFG y ayudarme en todo lo que he necesitado. A mi tutora externa, Marta, por brindarme la oportunidad de hacer las prácticas con ella, enseñarme sobre el buen trabajo en el laboratorio y a ser un gran profesional. Y sin duda, a Cristina, una profesora excepcional que, desde el primer día, me hizo darme cuenta de que había elegido la carrera adecuada.

Un agradecimiento infinito a mi madre, quien siempre me ha guiado por el camino de la perseverancia, enseñándome a no rendirme pese a las dificultades. Como bien dice, la vida está llena de baches y se sustenta en curvas irregulares, siendo esos mismos latidos los que nos mantienen

Por último y no menos importante, quiero darme las gracias a mí mismo. Por el esfuerzo realizado, por no tirar la toalla, a pesar de que a veces no pudiera más, y por lograr sacar adelante esta carrera y este TFG en un año que está siendo bastante complicado a nivel personal. Finalmente, todo este esfuerzo ha merecido la pena y ha llegado a su fin.

Índice

1 Introducción ... 1

1.1 Microbioma humano en el binomio materno-infantil. ... 1

1.2 Relación del microbioma humano con la salud del huésped: el caso de la preeclampsia. ... 2

1.3 Importancia de la dieta materno-infantil ... 3

1.3.1 Microbioma materno: El caso del aceite de oliva. ... 4

1.3.2 Microbioma y dieta infantil: HMOs. ... 4

1.4 Técnicas de análisis del microbioma. ... 5

1.5 Justificación de la investigación ... 5

2 Hipótesis. ... 6

3 Objetivos. ... 6

4 Materiales y métodos. ... 7

4.1 Material biológico y condiciones generales de mantenimiento. ... 7

4.2 Preparación de sustratos experimentales. ... 8

4.2.1 Soluciones de oligosacáridos de la leche materna (HMOs) ... 9

4.2.2 Digestión in vitro de Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) ... 9

4.3 Ensamblaje y cultivo de SynComs. ... 9

4.3.1 Ensayo de microbiota infantil y su interacción con HMOs (SyHO) ... 10

4.3.2 Ensayo de microbiota materna y su interacción con digesto de AOVE (SyAO). ... 11

4.4 Evaluación de la dinámica poblacional. ... 11

4.4.1 Recuento de viables en placa ... 12

4.4.1 Cuantificación molecular qPCR. ... 12

4.5 Tratamiento de datos y análisis estadístico. ... 13

5 Resultados ... 14

5.1 Efecto de los HMOs en comunidades sintéticas del ecosistema infantil ... 14

5.1.1 Crecimiento y viabilidad en el co-cultivo de *Escherichia coli – Lacticaseibacillus rhamnosus* ... 14

5.1.2 Crecimiento y viabilidad en el co-cultivo de *Escherichia coli – Bifidobacterium bifidum* ... 15

5.1.3 Crecimiento y viabilidad en el co-cultivo de *Escherichia coli – Bifidobacterium breve.* ... 17

5.1.4 Dinámica de poblaciones del consorcio microbiano completo. ... 18

5.2 Impacto del aceite de oliva en la modulación del ecosistema materno ... 19

5.2.1 Crecimiento y viabilidad de *Akkermnasia muciniphila – Chrystensenella minuta* frente al digesto de AOVE. ... 19

6 Discusión. ... 21

7 Conclusiones. ... 24

8 Bibliografía ... 24

9 Anexos. ... 31

Índice de figuras y tablas.

- **Figura 1.** Composición de la microbiota materno-infantil según el momento, el lugar y el modo de parto 1
- **Figura 2.** *Representación esquemática del mecanismo subyacente al efecto de la dieta* materna en la producción de metabolitos microbianos con impacto potencial en la salud materno-infantil.....2
  Figura 3. Análisis comparativo del perfil del microbioma intestinal entre mujeres gestantes normotensas (CON) y con preeclampsia (PE).
 3
- **Figura 4**. Esquema representativo de la composición de cada SynCom evaluada en los ensayos SyHO y SyAO. 10
- **Figura 5.** Cinética de crecimiento en monocultivo de las cepas integrantes de las SynComs I, II y III. 14
- **Figura 6.** Dinámica poblacional del co-cultivo de *E. coli* y *L. rhamnosus* tras 24 horas de incubación. 15
- **Figura 7.** Dinámica poblacional del co-cultivo de *E. coli* y *B. bifidum tras* 24 horas de incubación 16
- **Figura 8**. Dinámica poblacional del co-cultivo de *E. coli* y *B. breve* tras 24 horas de incubación. 17
- **Figura 9.** Evolución de la abundancia relativa en el consorcio multiespecie (SynCom IV).
 18
- **Figura 10.** Cuantificación absoluta de cada taxón dentro de la comunidad de cuatro cepas, evaluada mediante qPCR a las 0, 24 y 48 horas de incubación. 19
- **Figura 11.** Cinética de crecimiento de cepas representativas del ecosistema materno frente al digesto de AOVE. 20
- **Figura A2.1** Esquema representativo del procedimiento de digestión in vitro del AOVE.....33
- **Figura A2.**2 Esquema representativo del procedimiento general de los ensayos SyHO y SyAO.....34
- **Figura A4.1.** Validación de la amplificación genómica para *Escherichia coli.* 35
- **Figura A4.2.** Validación de la amplificación genómica para Bifidobacterium spp 36
- **Figura A4.3**. Validación de la amplificación genómica para *Lacticaseibacillus rhamnosus*
 36
- **Figura A4.4.** Validación de la amplificación genómica para *Akkermansia muciniphila*...37
- **Figura A4.5.** Validación de la amplificación genómica para *Christensenella minuta*.....37
- **Figura A4.6.** Validación de la amplificación genómica para *Escherichia coli (SynCom IV)*.
 38
- **Figura A4.7.** Validación de la amplificación genómica para *Lacticaseibacillus rhamnosus* (SynCom IV).....*38*
- **Figura A4.8.** Validación de la amplificación genómica para *Bifidobacterium bifidum* (SynCom IV).....39
- **Figura A4.9.** Validación de la amplificación genómica para *Bifidobacterium breve* (SynCom IV).....39
- **Figura A.6.1.** Control microscópico de las cepas individuales. 43
- **Tabla 1.** Cepas bacterianas seleccionadas para el ensamblaje de las SynComs y sus condiciones óptimas de cultivo 7
- **Tabla A1.1** Medios de cultivo, suplementos y reactivos utilizados. 31
- **Tabla A1.2.** Reactivos utilizados en la digestión in vitro de AOVE. 32
- **Tabla A1.3.** Material y equipos utilizados. 32
- **Tabla A3.1.** *Primers* empleados con sus respectivas secuencias. 34
- **Tabla A5.1.** Datos brutos de recuentos de viabilidad celular (UFC/mL) de cultivos individuales (*E. coli, L. rhamnosus*) y su SynCom III (Mix BHI, Mix MRS) a las 0 y 24 horas de incubación.)*.....40*
- **Tabla A5.2.** Datos brutos de recuentos de viabilidad celular (UFC/mL) de cultivos individuales (*E. coli, B. bifidum*) y su SynCom I (Mix BHI, Mix MRS) a las 0 y 24 horas de incubación.*)* 41
- **Tabla A5.3.** Datos brutos de recuentos de viabilidad celular (UFC/mL) de cultivos individuales (E. *coli, B. Breve*) y su SynCom III (Mix BHI, Mix MRS) a las 0 y 24 horas de incubación*)*.....*42*

Listado de símbolos y siglas

- AGCC. Ácidos grasos de cadena corta.
- AOVE. Aceite de oliva virgen extra.
- Cys. Cisteína.
- dAV. Digesto de AOVE.
- DM. Dieta materna.
- 2'-FL. 2'-fucosilactosa.
- Glu. Glucosa.
- HMOs. Oligosacáridos de la leche materna.
- MIB: Microbioma humano.
- MIM. Microbioma intestinal materno.
- MIN. Microbioma intestinal infantil.
- PE. Preeclampsia
- SyAO. Ensayo de interacción con AOVE.
- SynCom. Comunidad sintética microbiana.
- SyOH. Ensayo de interacción con HMOs
- VBNC. Estado celular Viable pero No Cultivable.

Resumen.

El **microbioma humano** (MIB) se considera un segundo genoma que vive en constante simbiosis con el huésped. Durante el embarazo y la lactancia, el ecosistema intestinal materno y la dieta constituyen factores críticos que dirigen la colonización neonatal y el desarrollo inmunológico temprano. Las alteraciones que se producen en esta microbiota originan disbiosis, asociadas a complicaciones severas como la preeclampsia. Sustratos dietéticos complejos como los oligosacáridos de la leche materna (HMOs) y los compuestos fenólicos del aceite de oliva presentan un inmenso potencial prebiótico para modular estas poblaciones y prevenir dichos trastornos gestacionales. Sin embargo, la investigación tradicional mediante monocultivo no logra reflejar las interacciones ecológicas reales, requiriendo ineludiblemente plataformas avanzadas como las comunidades sintéticas microbianas (SynComs). Este estudio busca evaluar exhaustivamente el impacto directo de los HMOs y un digerido de aceite de oliva (dAV) sobre la dinámica poblacional de microorganismos clave de los microbiomas maternos (MIM) e infantiles (MIN). Para lograr esto, se diseñaron, optimizaron y estabilizaron múltiples SynComs, monitorizando meticulosamente su viabilidad biológica mediante espectrofotometría, recuento celular y PCR en tiempo real (qPCR). La evaluación individual inicial sugirió una enorme dependencia metabólica en las cepas. Frente a los HMOs, gran parte de los taxones mostraron una clara incapacidad degradativa autónoma, mientras que diferentes bifidobacterias aisladas sufrieron un fuerte declive atribuible a ligeros problemas técnicos, posibles limitaciones genómicas intrínsecas y a una alta susceptibilidad letal al estrés oxidativo ambiental. No obstante, al constituir diversos consorcios binarios, se evidenciaron distintas interacciones bióticas, destacando un posible mutualismo bidireccional donde el acondicionamiento físico y la alimentación cruzada revirtieron la drástica pérdida de cultivabilidad observada. Al escalar progresivamente la complejidad estructural hacia modelos multiespecie, se vislumbraron intensas dinámicas de competencia simétrica que alteraron profundamente todo el panorama ecológico *in vitro*. La marcada dominancia espacial de los lactobacilos restringió el crecimiento del resto de cepas, enmascarando en algunos casos el conocido efecto bífidogénico. Aun así, la compleja red de interacciones ejerció un efecto de rescate colectivo que favoreció la persistencia genómica de las frágiles poblaciones minoritarias. Paralelamente, el análisis del ecosistema materno reveló el potencial modulador del extracto lipídico. La asimilación diferencial impulsó un crecimiento sostenido de importantes taxones protectores durante 24-48 horas, mitigando la toxicidad inherente de los fluidos de digestión. A nivel metodológico, el cruce de tendencias reveló discrepancias. Por un lado, el estrés de choque indujo transiciones a estados viables, pero no cultivables (VBNC). Por otro lado, la compleja matriz lipídica del aceite de oliva generó interferencias analíticas que inhibieron la qPCR, sugiriendo la limitación de la cuantificación molecular directa en estas condiciones. En conclusión, la implementación metodológica de comunidades sintéticas constituye un avance biotecnológico crucial para comprender ecosistemas complejos, permitiendo el futuro diseño de terapias e intervenciones nutricionales innovadoras enfocadas en el bienestar materno-infantil.

Palabras clave.

Aceite de oliva; alimentación cruzada; comunidades sintéticas; exclusión competitiva; HMOs; microbiota materno-infantil; prebióticos; qPCR.

Abstract

The human microbiome (MIB) is considered a second genome living in constant symbiosis with the host. During pregnancy and lactation, the maternal intestinal ecosystem and diet constitute critical factors driving neonatal colonization and early immune development. Alterations in this microbiota lead to dysbiosis, which is associated with severe complications such as preeclampsia. Complex dietary substrates, such as human milk oligosaccharides (HMOs) and phenolic compounds from olive oil, present immense prebiotic potential to modulate this population and prevent such gestational disorders. However, traditional monoculture research fails to reflect true ecological interaction, requiring the use of advanced platforms such as synthetic microbial communities (SynComs). This study aims to comprehensively evaluate the direct impact of HMOS, and olive oil digestate (dAV) on the population dynamics of key microorganisms from the maternal (MIM) and infant (MIN) microbiomes. To achieve this, multiple synthetic communities were designed, optimized, and stabilized, monitoring their biological viability through spectrophotometry, cell counting, and real-time PCR (qPCR). The initial individual evaluation suggested a marked metabolic dependence among the strains. When exposed to HMOs, most taxa showed an apparent inability for autonomous degradation, while different isolated bifidobacteria suffered a strong population decline attributable to minor technical issues, possible intrinsic genomic limitations, and high susceptibility to environmental oxidative stress. Nevertheless, upon forming various binary consortia, distinct biotic interactions were observed, highlighting a possible bidirectional mutualism where physical conditioning and cross-feeding reversed the drastic loss of cultivability previously observed. By progressively scaling the structural complexity toward multispecies models, intense competitive dynamics emerged, altering the *in vitro* ecological landscape. The marked spatial dominance of lactobacilli affects in some cases. Even so, the complex network of interaction exerted a collective rescue effect that favored the genomic persistence of minority populations. Concurrently, the analysis of the maternal ecosystem revealed the modulatory potential of the lipid extract. Different assimilation drove the sustained growth of important protective taxa for 24-48 hours, mitigating the inherent toxicity of the digestive fluids. Methodologically, the cross-referencing of the trend showed discrepancies. On one hand, shock stress induced transitions to viable but non-culturable (VBNC) states. On the other hand, the complex lipid matrix of olive oil generated analytical interferences that inhibited qPCR, suggesting limitations for direct molecular quantification under these conditions. In conclusion, the methodological implementation of synthetic communities constitutes a crucial biotechnological advancement for understanding complex ecosystems, enabling the future design of innovative nutritional therapies and interventions focused on maternal-infant well-being

Keywords.

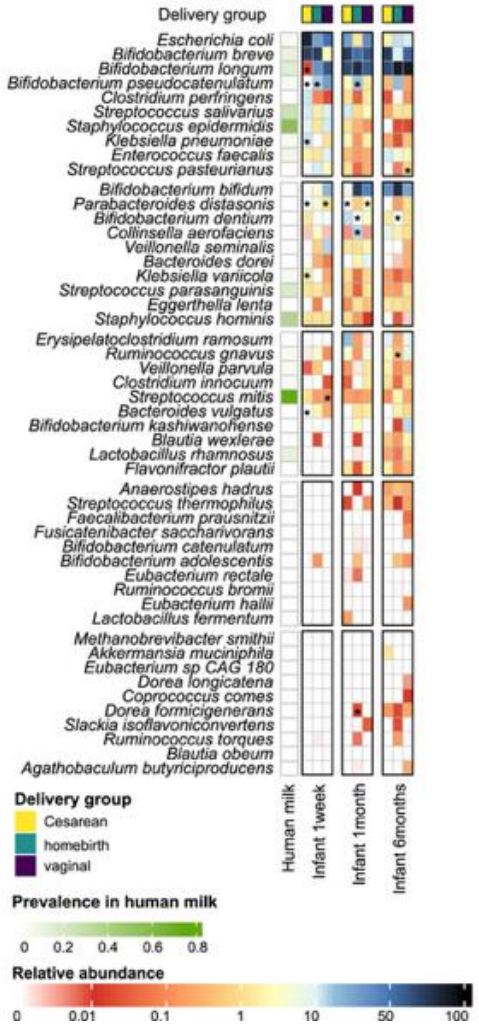
Olive oil; cross-feeding; synthetic communities; competitive exclusion; HMOs; maternal-infant microbiota; prebiotics; qpCR

1 Introducción

1.1 Microbioma humano en el binomio materno-infantil.

Multitud de comunidades microbianas se encuentran poblando la mayoría de los nichos ecológicos del cuerpo humano, como la cavidad oral, la superficie cutánea, el tracto intestinal, el esófago, los pulmones, entre otros (Manos, 2022). Se estima que el cuerpo humano alberga más de 10^9 microorganismos (Panthee et al., 2022) y aunque su composición varía, suele incluir bacterias, arqueas, virus, fagos y hongos. El genoma en conjunto de estos microorganismos es responsable de más del 98% de la actividad genética en el cuerpo humano y se considera, muchas veces, un "segundo genoma", que vive en simbiosis con el huésped (Grice & Segre, 2012; Michels et al., 2022).

En este sentido, aunque el ecosistema bacteriano y sus interacciones con el huésped puedan alcanzar una relativa estabilidad en la edad adulta, el desarrollo y la composición de la microbiota no son estáticos y se ven afectados mayoritariamente por diversos factores a lo largo de la vida del huésped (Kandari et al., 2024). En los adultos, la variación depende de elementos tanto intrínsecos como extrínsecos, entre los que encontramos la genética, la geografía, factores socioeconómicos, el clima, el uso de fármacos (destacando antibióticos) y de manera muy significativa, la dieta (Aggarwal et al., 2022; Ghaffar et al., 2025; Kandari et al., 2024).



(Adaptado de Selma-Royo et al., 2024)

Tras el nacimiento, factores como el tipo de parto, el entorno y la alimentación constituyen los primeros bloques para el establecimiento del microbioma infantil (MIN) (Bokulich et al., 2016; Ross et al., 2024; Song et al., 2021). Múltiples estudios recientes (L. Liu et al., 2024; Xie et al., 2025) han propuesto la presencia de microorganismos que desempeñan un papel vital en la salud materno-fetal. En cualquier caso, la colonización neonatal temprana se produce de forma universal (Selma-Royo et al., 2024). A pesar de las variaciones de colonización asociadas a la vía de nacimiento, la transmisión madre-hijo de las bacterias pioneras ocurre independientemente de si el parto es vaginal o por cesárea (Figura 1). Entre esos colonizadores universales destacan especies del género *Bifidobacterium* (*B. longum, B. bifidum y B. pseudocatenulatum*) coincidiendo exactamente con taxones normales en el microbioma materno durante la fase final de la gestación (Clark et al., 2021; Du et al., 2024)

Figura 1. Composición de la microbiota materno-infantil según el momento, el lugar y el modo de parto

La microbiota intestinal materna se considera el primer inóculo que comienza la colonización del niño en el momento del parto (Ferretti et al., 2018). En este sentido, el embarazo es un periodo clave para entender la influencia de la microbiota materna en el proceso de colonización y el desarrollo del niño. La gestación es un periodo de profundos cambios metabólicos, entre los que encontramos un aumento de la lipólisis y una hiperglucemia fisiológica derivada de la resistencia a la insulina. Estas alteraciones promueven la remodelación del microbioma intestinal materno (MIM), especialmente durante el segundo y tercer trimestre (Di

Simone et al., 2020; Li et al., 2024). A nivel taxonómico, esta adaptación disminuye las bacterias productoras de butirato, un antiinflamatorio, (Clark et al., 2021; Du et al., 2024) e impulsa la proliferación de proteobacterias, bacterias lácticas y bifidobacterias. Estos cambios, aunque en otras situaciones puedan parecer patológicos, podrían preparar el organismo para el momento del parto y la inminente transmisión vertical de microorganismos al neonato.

Además de la transmisión bacteriana directa, la influencia de la microbiota materna sobre el desarrollo comienza mucho antes del parto a través de los metabolitos que esta produce. La dieta materna moldea las bacterias comensales intestinales, promoviendo la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), especialmente acetato (Clark et al., 2021; Kandari et al., 2024). A nivel materno, este acetato ayuda a regular el número y la función de las células T reguladoras (Treg), suprimiendo la inflamación sistémica. Concretamente, estudios muestran cómo estos metabolitos microbianos maternos serían capaces de atravesar la placenta y alcanzar los tejidos fetales. Una vez en el feto, los AGCC inducirían una impronta epigenética en las células pulmonares e inmunitarias en desarrollo para promover la transcripción de genes protectores, previniendo así el desarrollo futuro de patologías inflamatorias y respiratorias en la descendencia (Thorburn et al., 2015) (**Figura 2**).

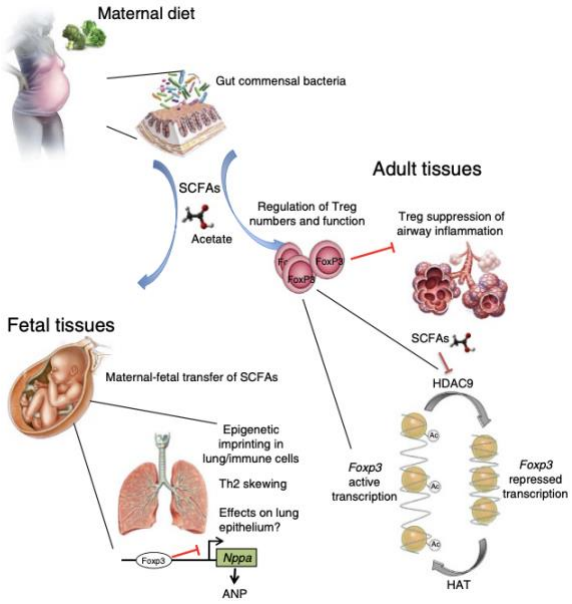


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo subyacente al efecto de la dieta materna en la producción de metabolitos microbianos con impacto potencial en la salud materno-infantil (Thorburn et al., 2015)

1.2 Relación del microbioma humano con la salud del huésped: el caso de la preeclampsia.

El microbioma humano (MIB) no solo desempeña funciones metabólicas esenciales, como la degradación de moléculas complejas y la consiguiente producción de AGCC como el butirato y el acetato (Clark et al., 2021; Kandari et al., 2024), sino que constituye un pilar fundamental en la homeostasis y educación del sistema inmunitario del huésped (Pan et al., 2026). Las bacterias comensales parecen establecer interacciones directas con las células inmunitarias, regulando el delicado equilibrio entre la tolerancia a antígenos inofensivos y la defensa frente a patógenos mediante el refuerzo de la integridad de la barrera mucosa (Honda & Littman, 2016; Pan et al., 2026). En consecuencia, la alteración de este ecosistema microbiano, conocida como disbiosis, debilita estas barreras protectores y puede desencadenar diversos trastornos inmunológicos e inflamatorios.

Específicamente, en el contexto del binomio materno-infantil, la disbiosis de la MIM se asocia con un mayor riesgo de desarrollar patologías gestacionales severas. Una de las

complicaciones más destacadas es la preeclampsia (PE), un síndrome caracterizado por hipertensión y disfunción multiorgánica (Meijer et al., 2023; Torres-Torres et al., 2024; Vera-Ponce et al., 2025). La evidencia científica reciente señala que las mujeres gestantes con PE presentan una disbiosis evidente, caracterizada por una pérdida significativa de la riqueza y diversidad microbiana de su ecosistema intestinal (Giugliano et al., 2025; Jin et al., 2022; X. Liu et al., 2024; Meijer et al., 2023; Zong et al., 2023). A nivel funcional, esta alteración se traduce en una reducción drástica de las poblaciones bacterianas productoras de AGCC, lo que genera un déficit sistémico de estos importantes postbióticos y promueve un estado proinflamatorio.

Ante este desequilibrado escenario, la intervención dietética emerge como una herramienta profiláctica y terapéutica vital. Resultados preliminares del grupo de investigación MAINBiotics muestran que madres que sufrieron PE poseían un patrón dietético pobre en alimentos protectores, y muy especialmente, el aceite de oliva virgen extra (AOVE) frente a mujeres normotensas (PE vs control: 5.7 ± 9.5 g/days vs 44.3 ± 19.1, p<0.001; (Castro-Barquero et al. resultados sin publicar). Los compuestos fenólicos del AOVE actúan como potentes prebióticos capaces de estimular el crecimiento de géneros protectores como *Akkermansia muciniphila* (Meijer et al., 2023), cuyo filo taxonómico (Verrucomicrobiota) se encuentra considerablemente reducido en pacientes con PE (**Figura 3**; Selma-Royo et al. Resultados sin publicar). Asimismo, estos mismos análisis preliminares corroboran la depleción de otros taxones fundamentales para la salud metabólica, como el género *Christensenella,* (Gao et al., 2020)

Estos resultados, junto con otros focalizados en otros síndromes obstétricos, apuntan a que existiría una relación entre dieta-microbiota-gestación cuya investigación podría ofrecer nuevas estrategias de tratamiento para estas enfermedades.

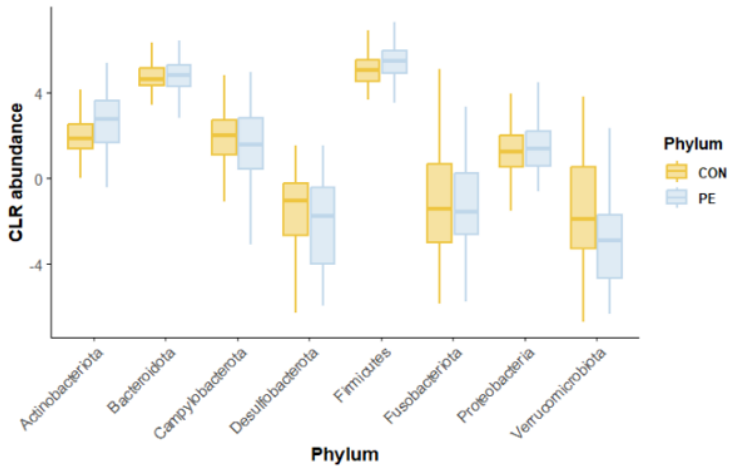


Figura 3. Análisis comparativo del perfil del microbioma intestinal entre mujeres gestantes normotensas (CON) y con preeclampsia (PE). Variaciones en la abundancia bacteriana CLR a nivel taxonómico de filo (datos preliminares no publicados del grupo de investigación MainBiotics)

1.3 Importancia de la dieta materno-infantil

Como se ha destacado anteriormente, la dieta materna (DM) constituye el principal factor extrínseco modulador de la microbiota intestinal. Partiendo de esta premisa, la DM durante el periodo de gestación es un factor clave que podría desempeñar un papel importante en el proceso de colonización bacteriana mediante diferentes mecanismos (Suárez-Martínez et al., 2023). En la medida en que la madre moldea su propio microbioma intestinal, afecta de forma directa a la secuencia de eventos de colonización del recién nacido impactando, probablemente, en su desarrollo y salud futura.

1.3.1 Microbioma materno: El caso del aceite de oliva.

Como se ha presentado anteriormente, la DM y el desarrollo inmunitario fetal estarían relacionados a través de cambios en el MIM (Mirpuri, 2020). Un claro ejemplo de este impacto positivo es el consumo de aceite de oliva. El AOVE, un alimento indispensable de la dieta mediterránea, constituye un pilar nutricional en la gestación, debido a su rica matriz de compuestos bioactivos, como la oleuropeína, el pinoresinol, oleocantal o diversos flavonoides (D'Archivio et al., 2022; Farràs et al., 2020).

Es importante destacar que la interacción de estos polifenoles con la MIB es de carácter bidireccional (D'Archivio et al., 2022; Farràs et al., 2020; Pathak et al., 2018). Por un lado, los compuestos del AOVE actúan como antimicrobianos y prebióticos que favorecen el crecimiento de bacterias protectoras, como *Akkermansia muciniphila*. Por otro lado, la propia digestión de los polifenoles que alcanzan el colon requiere de un verdadero ecosistema bacteriano cooperativo. Por ejemplo, cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* utilizan enzimas especializadas para hidrolizar la oleuropeína y liberar hidroxitirosol, el cual bloquea vías inflamatorias como el NF-kB. Otras bacterias del colon como *Eggerthella lenta* y *Enterococcus faecalis* reducen el pinoresinol para transformarlo en lariciresinol; mientras que comunidades que incluyen *Eubacterium* o *Clostridium orbiscindens* desmetilan y rompen ácidos fenólicos y flavonoides para generar compuestos bioactivos como el pirogalol o los ácidos propiónicos, con potencial antiinflamatorio.

Esta biotransformación en red convierte al intestino humano, y en concreto al materno, en un sistema productor de metabolitos activos que sumados al incremento de AGCC, modulan vías celulares y generan un entorno altamente antiinflamatorio y antioxidante. A nivel clínico, la literatura confirma (Cortez-Ribeiro et al., 2023) que esta modulación reduce drásticamente el riesgo de complicaciones severas en el embarazo. Precisamente, la liberación a la circulación de potentes subproductos metabólicos, también conocidos como postbióticos, surge como el mecanismo fisiológico clave para frenar la cascada inflamatoria, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial que desencadenan los trastornos hipertensivos gestacionales.

1.3.2 Microbioma y dieta infantil: HMOs.

Otra vía por la cual la DM durante el embarazo puede provocar cambios en la microbiota del lactante es a través de la leche materna (Suárez-Martínez et al., 2023; Taylor et al., 2023). Durante la lactancia, los bebés amamantados reciben nutrientes, células inmunitarias, anticuerpos y proteínas secretadas que modulan su microbioma intestinal. En este entorno simbiótico, los oligosacáridos de la leche materna (HMOs) asumen un papel protagonista al servir de sustrato exclusivo para bacterias pioneras (Samarra et al., 2025). Sin embargo, la digestión de estos azúcares complejos no es un proceso realizado por un único microorganismo, sino que depende de una red ecológica de cooperación y competencia bacteriana (Gholamipour-Shirazi & Gholamipour-Shirazi, 2025; Pröschle-Donoso et al., 2025)

En dicha comunidad microbiana, las bacterias asumen roles definidos. Especies como *B. bifidum* actúan como "degradadores primarios" clave, al digerir los HMOs de forma extracelular, liberando al entorno intestinal componentes como el ácido siálico, fucosa y lactosa (Hu et al., 2023; Pröschle-Donoso et al., 2025; Samarra et al., 2025). Este proceso proporciona sustrato vital para los degradadores secundarios como son *Lactobacillus* u otras bifidobacterias, lo que les permite sobrevivir y prosperar en el entorno. Otras especies como *B. longum subsp. Infantis* adoptan una estrategia competitiva, internalizando los HMOs intactos, para su degradación intracelular y monopolizando los recursos para asegurar su dominancia sobre las otras.

El resultado de esta actividad metabólica es la producción masiva de subproductos como los AGCC. Los AGCC, propionato, acetato y butirato, son los principales metabolitos o postbióticos formados por las bacterias intestinales a través de la fermentación microbiana de carbohidratos accesibles a la microbiota (CAM) y son la principal fuente de energía para las células del colon, además de ser esenciales para la maduración del sistema inmunológico del lactante y de su barrera intestinal (Alsharairi, 2020; Hu et al., 2023).

No obstante, diversas investigaciones han revelado que este sofisticado y protector ecosistema es extremadamente frágil. Se hipotetiza que existiría una relación inversa entre la capacidad de degradar HMOs por una bacteria y su resistencia a los antibióticos (Samarra et al.,

2025). Las bacterias más eficientes y especializadas en esta tarea, como *B. bifidum*, carecen de resistencia, haciéndolas sumamente susceptibles. Como consecuencia, la administración temprana de antibióticos ya sea de forma directa al neonato o a través de la madre, acaba con los degradadores primarios produciendo un colapso de la red de alimentación cruzada. Al perderse esta cadena, se frena completamente la producción de postbióticos protectores, creando un espacio ideal para los patógenos oportunistas. De esta forma, entender las dinámicas que se establecen entre estas especies y el consumo de HMOs sería esencial para entender el proceso de colonización temprana.

1.4 Técnicas de análisis del microbioma.

Históricamente, el estudio de las interacciones entre el microbioma intestinal y el metabolismo se ha apoyado en los monocultivos tradicionales o en el análisis directo de la microbiota nativa (Tawk et al., 2025). Sin embargo, todo ello presenta la principal limitación de que los monocultivos no reflejan las complejas interacciones ecológicas que ocurren *in vivo*, mientras que el estudio directo del microbioma nativo se ve limitado por una extrema variabilidad ecológica, una baja reproducibilidad y una limitada resolución para establecer relaciones causales.

En un intento de vencer estas limitaciones, surgen las comunidades sintéticas microbianas (SynComs), como plataformas controladas que conservan los rasgos funcionales de la microbiota nativa, al tiempo que permiten un gran control experimental. Estas comunidades se definen como consorcios constituidos por microorganismos cultivables, lo que proporciona un equilibrio único entre la relevancia ecológica y la capacidad de caracterizar funcionalmente las interacciones individuales (Van Leeuwen et al., 2023).

El diseño de una SynCom suele caracterizarse por un enfoque ascendente o bottom-up, el cual implica la selección deliberada, aislamiento y co-cultivo de cepas microbiomas individuales para construir consorcios definidos (Gonzalez-Garcia et al., 2025). La complejidad de estos modelos abarca un gradiente amplio, variando desde consorcios mínimos (2-3 cepas), hasta combinaciones de decenas de especies. Específicamente, las SynComs mínimas son particularmente adecuadas para dilucidar mecanismos concretos bajo condiciones altamente controladas. Su simplicidad maximiza la reproducibilidad experimental, convirtiéndolas en plataformas para evaluar de forma directa el impacto de intervenciones nutricionales, como el uso de sustratos probióticos. Este enfoque resulta ideal para estudiar cómo componentes bioactivos específicos, como los HMOs o el AOVE, modulan la dinámica poblacional y el metabolismo de los microorganismos, aislando sus efectos frente a fuentes de carbono basales.

El éxito experimental en el manejo de estas comunidades requiere, no obstante, superar retos metodológicos relevantes e integrar diversas herramientas analíticas. A nivel de cultivo, dado que la inmensa mayoría de bacterias intestinales son anaerobias estrictas, el ensamblaje y mantenimiento de las SynComs exigen el uso de condiciones principalmente anaerobias (Hong et al., 2021; Müller et al., 2024). Además, para evaluar la dinámica poblacional, las técnicas tradicionales de microbiología se complementan con herramientas moleculares independientes de cultivo, como la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y la metagenómica shotgun (Arboleya et al., 2012; W. Taylor et al., 2025)

1.5 Justificación de la investigación

Observamos que el periodo gestacional y los primeros meses de vida son etapas esenciales para el establecimiento de un microbioma equilibrado. No obstante, diversos factores, como el tipo de parto, el entorno de crecimiento del niño e incluso el tipo de dieta, así como patologías severas como la PE durante el embarazo, ponen constantemente en riesgo la estabilidad del ecosistema materno-infantil. Aunque se ha descrito que los componentes bioactivos de la dieta, como el AOVE y los HMOs, tienen un gran potencial para prevenir dichos desajustes, la complejidad de las interacciones bacterianas *in vivo* dificulta su estudio. Por ello, el uso de SynComs resulta indispensable como herramienta biotecnológica, ya que, con ella se podría aislar y comprender de forma más clara cómo algunos nutrientes modulan la competitividad y cooperación de especies clave del microbioma.

En sí, comprender la dinámica poblacional de estas comunidades frente a HMOs como el 2'-FL y digesto de AOVE (dAV), permitirá sentar las bases para futuras intervenciones de nutrición y el desarrollo de posibles terapias basadas en postbióticos. Este hecho tiene un gran potencial revolucionario para la industria y la clínica. Por un lado, la identificación de sinergias específicas con el AOVE permitirá el diseño de simbióticos de precisión que podrían pautarse como potencial tratamiento coadyuvante en mujeres gestantes con alto riesgo de desarrollar PE, mitigando el estrés inflamatorio placentario desde el intestino. Por otro lado, conocer las redes de "cross-feeding" de los HMOs facilitará la formulación de fórmulas infantiles de nueva generación capaces de mimetizar el entorno ecológico idóneo, y proteger a los neonatos y sobre todo a bebés prematuros de las disbiosis inducidas por posibles terapias antibióticas tempranas.

De esta forma, el presente proyecto se integra perfectamente en la Agenda 2030 de las Naciones Unidas. Específicamente, contribuye a la **ODS 3** (Salud y Bienestar), mediante la generación de conocimiento científico enfocado en la prevención de trastornos hipertensivos del embarazo, como la preeclampsia, lo cual repercute en la reducción de la mortalidad materna. Asimismo, sienta bases para el desarrollo de estrategias orientadas a la protección del MIN y la promoción de un sistema inmune robusto. Paralelamente, al evidenciar el valor intrínseco de los HMOs y de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, el estudio da soporte a la **ODS 2** (Hambre cero), consolidando la importancia de una nutrición de calidad como pilar preventivo y terapéutico.

2 Hipótesis.

La suplementación con compuestos bioactivos de la dieta materna-infantil, específicamente el HMO 2'-FL y el digesto de AOVE, altera diferencialmente la cinética de crecimiento y la abundancia relativa de las cepas representativas del microbioma materno-infantil. Se hipotetiza que la complejidad estructural de estos sustratos inducirá interacciones ecológicas específicas, como la retroalimentación metabólica (cross-feeding) y la exclusión competitiva dentro de las comunidades sintéticas, generando un perfil fenotípico y taxonómico significativamente distinto al observado en monocultivos y al obtenido mediante el uso de fuentes de carbono simples como la glucosa (Glu).

3 Objetivos.

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es evaluar el efecto de componentes dietéticos materno-infantiles, concretamente oligosacáridos de la leche humana y digesto de Aceite de Oliva Virgen Extra sobre el crecimiento y la dinámica poblacional de bacterias representativas del microbioma materno-infantil, investigando y optimizando para ello el uso de comunidades sintéticas como modelos *in vitro*.

Para alcanzar esta meta, definimos los siguientes objetivos específicos:

♦ **Evaluar en monocultivo** el crecimiento y la viabilidad de diferentes cepas predominantes del microbioma infantil, tales como *Escherichia coli, Lacticaseibacillus rhamnosus, Bifidobacterium bifidum y Bifidobacterium breve, así como del microbioma materno como Akkermansia muciniphila* y *Christensenella minuta,* frente a distintas fuentes de carbono, comparando su respuesta basal frente a la suplementación con los sustratos dietéticos complejos en estudio.

♦ **Diseñar, optimizar y estabilizar comunidades sintéticas bacterianas (SynComs)** a partir de la combinación de dos o más microorganismos seleccionados, estableciendo modelos *in vitro* que permitan evaluar interacciones ecológicas complejas.

♦ **Determinar variaciones en la abundancia relativa y la viabilidad celular** de cada taxón dentro de las SynComs al ser sometidas a los diferentes tratamientos nutricionales. Esta monitorización se llevará a cabo empleando técnicas dependientes de cultivo como el recuento en placa y herramientas de cuantificación molecular absoluta como la qPCR.

♦ **Analizar estadísticamente de forma comparativa** las dinámicas poblacionales obtenidas en monocultivo frente a las desarrolladas en los consorcios, contrastando simultáneamente con los resultados cuantitativos arrojados por las técnicas dependientes e

independientes de cultivo. Este análisis permitirá identificar posibles relaciones de cooperación metabólica o exclusión competitiva impulsadas por los suplementos de HMOs y dAV, además de validar la congruencia y robustez metodológica entre ambos enfoques analíticos.

♦**Sentar las bases metodológicas y validar un protocolo de trabajo estandarizado** mediante el uso de SynComs, estableciendo una plataforma de evaluación in vitro versátil y extrapolable para futuras investigaciones, orientadas a explorar el impacto de nuevos componentes dietéticos o intervenciones nutricionales sobre el microbioma humano.

4 Materiales y métodos.

Declaración sobre el uso de IA. Este trabajo ha contado con el apoyo de herramientas de IA para tareas organizativas y de revisión lingüística. No obstante, la elaboración intelectual, el análisis crítico y las conclusiones corresponden íntegramente al autor de dicha obra,

4.1 Material biológico y condiciones generales de mantenimiento.

Para la realización de los ensayos *in vitro*, se seleccionaron seis cepas bacterianas representativas del ecosistema gastrointestinal materno-infantil, que abarcan tanto colonizadores iniciales como degradadores primarios de sustratos complejos. Específicamente, se seleccionaron aislados provenientes de muestra fecal de niño para el ensayo de microbiota infantil por si hubiera alguna especificidad de cepa. El diseño experimental general de las co-incubaciones y la estructuración de los tratamientos en forma de matriz multipocillo se llevó a cabo mediante una adaptación metodológica propia del grupo MAINBiotics, inspirada en literatura (Clark et al., 2021; Garcia-Santamarina et al., 2024) Las características y el origen taxonómico de los microorganismos empleados en este estudio se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas seleccionadas para el ensamblaje de las SynComs y sus condiciones óptimas de cultivo.

Microorganismo	Cepa	Origen	Condiciones de cultivo	Ensayo
Escherichia coli	DSM 115365	DSMZ	Cultivo aerobio o anaerobio 37ºC Medio basal: MRS	Ensayo SyHO
Bifidobacterium bifidum	DSM 20213	DSSMZ	Cultivo anaerobio 37ºC Medio basal: MRS	Ensayo SyHO
Bifidobacterium breve	Colección IATA-CSIC MAINBiotics (A356y23)	Aislado de muestra fecal infantil de cohorte MAMI	Cultivo anaerobio 37ºC Medio basal: MRS	Ensayo SyHO
Lacticaseibacillus rhamnosus	Colección IATA-CSIC MAINBiotics (A447y18)	Aislado de muestra fecal infantil de cohorte MAMI	Cultivo anaerobio 37ºC Medio basal: MRS	Ensayo SyHO
Akkermansia muciniphila	DSM 22959	DSMZ	Cultivo anaerobio estricto 37ºC Medio basal: GAM + 0,1% mucina	Ensayo SyAO

			Cultivo anaerobio estricto	
Christensenella minuta	DSM 22607	DSMZ	37ºC Medio basal: GAM + 0,1 % mucina	Ensayo SyAO

Nota. Con el objetivo de estandarizar las condiciones del ensayo y evitar sesgos nutricionales cruzados, todas las cepas integrantes del ensayo de microbiota infantil fueron cultivadas experimentalmente utilizando MRS como medio basal común. Ensayo de microbiota infantil (SyHO**). Ensayo de microbiota materna (**SyAO**). Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (**DSMZ**).*

Para garantizar la estabilidad genética y fenotípica a largo plazo, así como una concentración estandarizada de biomasa, todas las cepas se cultivaron y su densidad óptica (OD_{600}) se ajustó a 0,8 de forma previa a su congelación. Posteriormente se conservaron criopreservadas a – 80º C en un stock general usando como crioprotector glicerol al 20% (v/v) (Panreac, AppliChem, Barcelona, España). Además de este stock general, se prepararon crioviales en formato monousos utilizando, en el caso del ensayo de microbiota infantil (SyHO), el medio de cultivo MRS (Becton, Dickinson and Company, Franklin, NJ, EE.UU.) suplementado con cisteína al 0,05% (Cys, p/v) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.); y en el caso del ensayo de microbiota materno (SyAO), GAM suplementado con cisteína al 0,05 %; maltosa (Duchefa Biochemie, Harlem, Países Bajos) , celobiosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.)., almidón (Labbox Labware, Barcelona, España) y mucina (Sigma-Aldrich) al 0,1%, hemina 0,5 g/L (Thermo Fisher Scientific) y vitamina K1 10 μg/mL (Sigma-Aldrich) De ahora en adelante este medio será denominado como "medio GAM básico". El empleo de un medio basal unificado para la totalidad de los taxones en cada modelo experimental, independientemente de que no represente el entorno nutricional óptimo para el crecimiento individual de ciertas cepas, se implementó con el objetivo de garantizar la comparabilidad analítica y aislar exclusivamente los efectos de los suplementos dietéticos (HMOs y dAV) sobre las dinámicas poblacionales de las comunidades sintéticas.

Previamente a la realización de los ensayos de interacción, las bacterias se reactivaron a partir de los stocks congelados. Para ello se inoculó el monouso al completo en 5 ml de medio de cultivo líquido MRS suplementado con Cys al 0,05 % (p/v), hemina (0,5 g/L) y vitamina k1 (10 μg/mL) en el caso del ensayo SyHO, y se incubó a 37ºC durante aproximadamente 24 horas. Por otro lado, en el caso del ensayo SyAO los monousos de inocularon en 5 ml de medio GAM básico y se incubaron durante 48 horas. Dado el metabolismo diferencial de las cepas, la manipulación y el cultivo rutinario de los taxones anaerobios se llevaron a cabo en condiciones controladas de anaerobiosis. Debido a la alta sensibilidad de las cepas del ensayo SyAO, *Akkermansia muciniphila* y *Christensenella minuta,* al oxígeno, el trabajo experimental de estas especies se realizó en una cabina de anaerobiosis (Whitley A25 Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific, Bingley, Reino Unido) que se mantiene a una atmósfera de 80% N_2 + 10% CO_2 + 10% H_2. En el caso de las cepas del ensayo SyHO, las cuales presentan una menor susceptibilidad a la exposición ambiental transitoria a pesar de su metabolismo anaerobio, su manipulación se realizó en cabina de bioseguridad tipo II (Telstar, certificada conforme a la norma EN 12469:2000; Azbil Telstar, Terrasa, España), garantizando la anaerobiosis durante su incubación mediante el empleo de jarras herméticas GasPak™ EZ (Becton, Dickinson and Company) provistas de sobres generadores de atmósfera AnaeronGen (Thermo Fisher Scientific)

Tras esta reactivación y de forma previa a la conformación de los consorcios, la pureza y morfología celular de los cultivos individuales se verificó de forma rutinaria mediante tinción específica, cuyas imágenes representativas se recogen en el Anexo 6.

4.2 Preparación de sustratos experimentales.

Para la realización de los ensayos *in vitro*, todas y cada una de las soluciones de fuentes de carbono y sustratos bioactivos se prepararon en forma de soluciones stock a una concentración inicial del doble (2x) respecto a la concentración final de trabajo requerida. Este diseño metodológico permite alcanzar la concentración 1x deseada en el pocillo final al mezclar

los sustratos en una proporción 1:1 (v/v) con el inóculo bacteriano resuspendido en el medio de cultivo.

4.2.1 Soluciones de oligosacáridos de la leche materna (HMOs)

Las soluciones madre empleadas en el ensayo de interacción con los HMOs (SyHO) se prepararon disolviendo los respectivos carbohidratos, glucosa (Sigma-Aldrich) y 2'-fucosilactosa (2'-FL) (Glycare A/S, Hørsholm, Dinamarca) en agua ultrapura (grado Mili-Q). Se prepararon tres soluciones de azúcares: solución de Glu al 4% (p/v; concentración final experimental 2%), solución de Glu al 0,4 % (p/v; concentración final experimental 0,2%) y Glu 0,4 % + HMO 4% (p/v; concentración final experimental 0,2 % + 2 %). Para evitar la degradación de las estructuras de los azúcares y, a su vez, prevenir posibles contaminaciones microbianas que pudieran interferir con el ensayo, las soluciones se esterilizaron mediante filtración empleando membranas de 0,22 µm de tamaño de poro (Labbox Labware). Estas soluciones estériles se almacenaron a 4ºC hasta su posterior uso en las condiciones experimentales.

4.2.2 Digestión in vitro de Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE)

La simulación de la digestión gastrointestinal del AOVE (Centros Comerciales Carrefour, S.A, Madrid, España) se llevó a cabo siguiendo el protocolo estandarizado internacional INFOGEST descrito por Brodkorb et al., 2019), aplicando modificaciones específicas adaptadas a la naturaleza lipídica de la matriz. Las soluciones de fluidos digestivos simulados se prepararon con sus respectivos reactivos y tampones para ajustes de pH para replicar las condiciones fisiológicas (ver **Figura A1.2**, Anexo 1)

En la fase oral, se mezclaron 5 mL de AOVE con 4 mL de fluido salival simulado (SSF) a una concentración de 1,25x. Asimismo, al carecer de carbohidratos complejos, se excluyó la adición de la enzima α-amilasa, sustituyendo su volumen correspondiente por agua ultrapura, y se omitió el tiempo de incubación enzimática. Para simular el proceso físico de la masticación y lograr la emulsión inicial, la mezcla se agitó con vortex (Sigma Aldrich) tras la adición de CaCl2 (1,5 mM final) (Sigma-Aldrich). Para la fase gástrica, el bolo oral resultante se mezcló con 9 mL de fluido gástrico simulado (SGF) a 1,25X. El pH se ajustó a 3,0 mediante la adición de 300 µl de HCL (Panreac) (1M). Se incorporó CaCl2 (0,15 mM final) y las enzimas correspondientes, lipasa gástrica (60 U/mL) (Sigma-Aldrich) y pepsina (20.000 U/mL) (Sigma-Aldrich). Tras la verificación final del pH, se enrasó el volumen con agua miliQ hasta alcanzar una concentración final de SGF 1X. La mezcla se incubó a 37ºC bajo agitación continua durante 2 horas. Finalmente, para iniciar la fase intestinal, la solución gástrica se mezcló con fluido intestinal simulado (SIF) a 1,25X. El volumen de SIF añadido (3,359 mL) se calculó restando el volumen total teórico (16 mL) de los volúmenes correspondientes a las soluciones enzimáticas y biliares que se añadirían posteriormente. La mezcla se burbujeó con nitrógeno gas para favorecer el ambiente anaeróbico del intestino. A continuación, se añadieron sales biliares (10 mM) (Sigma-Aldrich) y la mezcla se incubó durante 30 minutos en agitación. Pasado ese tiempo, se incorporó CaCl2 (0,6 mM final) y pancreatina (100 U/ml) (Sigma-Aldrich), reajustando el pH a 7,0 con 280 µl de NaOH (1M) (Panreac). El volumen final se completó con agua miliQ para obtener SIF 1X, y se procedió a una incubación de 2 horas a 37ºC. Al finalizar la digestión, se detuvo parte de la actividad enzimática mediante un inhibidor de proteasas (PMSF) (Sigma-Aldrich), y las muestras se almacenaron a -80ºC hasta su posterior uso en los ensayos microbiológicos.

En el Anexo 2 (**Figura A2.1**) aparece representado un esquema del protocolo.

4.3 Ensamblaje y cultivo de SynComs.

Previamente al ensamblaje de los consorcios, los cultivos bacterianos crecidos durante 24 horas a 37 °C se recolectaron para estandarizar su biomasa desde los stock monosuso. La densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) se determinó espectrofotométricamente (Labbox) realizando una dilución 1:10 en PBS estéril (Sigma-Aldrich). Para la elaboración del ensayo, se preparó un volumen final de 7 ml de medio en el caso del ensayo SyHO o de 13 ml de medio en el caso del ensayo SyAO, en el que se inocularon las cepas correspondientes tanto en monocultivo como en comunidad. El volumen del inóculo de cada cultivo se calculó de forma individual para su contribución parcial a la mezcla de forma equitativa. Por ejemplo, para un consorcio constituido por dos cepas, a cada microorganismo se añadió hasta alcanzar una OD_{600} parcial de 0,05 en un

volumen de 7 o 13 mL, garantizando así que la suma total de las biomasas iniciales de la comunidad sintética arrojara un valor de OD_{600} exacto de 0,1.

4.3.1 Ensayo de microbiota infantil y su interacción con HMOs (SyHO)

Para evaluar la capacidad de la SynCom para degradar los oligosacáridos, el diseño experimental se estructuró en formato de matriz utilizando placas multipocillo de fondo profundo (Axygen Scientific, Union city, CA, Estados Unidos). Todas las cepas se cultivaron en medio MRS doble concentrado, denominado de ahora en adelante MRS 2X, suplementado con L-cisteína al 0,1% (p/V), hemina (1 g/L) y vitamina K1 (20 μg/mL). El diseño constó de tres condiciones nutricionales evaluadoras (dispuestas en columnas) y diversas condiciones microbiológicas (dispuestas en filas). Todos los tratamientos se evaluaron por triplicado para asegurar la reproducibilidad técnica y significancia estadística de los resultados.

Las condiciones nutricionales evaluadas constaron de: una primera condición o control basal que contenía glucosa al 0,2% con el objetivo de establecer el crecimiento mínimo, la segunda condición o experimental se compuso de glucosa al 0,2% y HMO al 2%, y, adicionalmente, se incluyó un control positivo cualitativo, con glucosa al 2%, con el fin de asegurar la viabilidad del inóculo y descartar la toxicidad del medio basal. Esta última condición no se incluyó en los análisis cuantitativos posteriores.

De forma transversal, estas condiciones se cruzaron con las siguientes condiciones microbiológicas: un control negativo (medio estéril sin inóculo), los monocultivos de cada una de las cepas de forma aislada, y la propia SynCom. Las SynComs evaluadas se representan en la **Figura 4**, y la disposición esquemática detallada de la placa se ilustra en el esquema de la **Figura A2.2**, Anexo 2.



Figura 4. Esquema representativo de la composición de cada SynCom evaluada en los ensayos SyHO y SyAO. Las celdas coloreadas indican la presencia de la cepa bacteriana en el consorcio correspondiente, estableciendo además un código de color que se mantendrá en gráficos posteriores para identificar a cada especie concreta, mientras que las celdas en gris denotan su ausencia. Las comunidades I, II, III y V se consideran de baja complejidad al estar formadas exclusivamente por dos cepas. Por el contrario, la SynCom IV se clasifica como de alta complejidad al integrar 4 microorganismos distintos. Las SynComs I, II, III y IV fueron empleadas en los ensayos de interacción con HMOs (SyOH), mientras que la SynCom V se destinó exclusivamente al ensayo con digeridos de AOVE (SyAO)

El ensamblaje final en cada pocillo se realizó combinando 500 μL de las soluciones de sustratos (preparadas a concentración 2X) con 500 μL de la suspensión bacteriana correspondiente en MRS 2X (OD_{600} = 0,1). Esta dilución en proporción 1:1 (v/V) redujo la OD_{600} bacteriana inicial neta del ensayo a un valor de 0,05 en cada pocillo. Una vez inoculadas, las placas se incubaron a 37ºC en condiciones de anaerobiosis utilizando las jarras con sobres generadores de atmósfera AnaeroGen. Para la evaluación de las dinámicas poblacionales y metabólicas, se procedió a la extracción de muestras a diferentes tiempos de incubación en función de la técnica analítica diana: monitorización del crecimiento global por densidad óptica (OD_{600}) (t = 24 y t = 48 H), recuento en placa (t=0 y t=24 h) y cuantificación molecular mediante qPCR: SynComs I, II y III (t=0 y t=24 H) y SynCom IV (t = 0 h, t = 24 h y t = 48 h).

4.3.2 Ensayo de microbiota materna y su interacción con digesto de AOVE (SyAO)

Para evaluar el impacto del aceite de oliva sobre el crecimiento poblacional de cepas seleccionadas características del microbioma materno, el diseño experimental se estructuró de forma similar al ensayo SyHO, basado en una matriz utilizando placas multipocillo de fondo profundo. Todas las cepas se cultivaron en el medio GAM básico previamente descrito. El diseño constó de tres condiciones nutricionales evaluadoras (dispuestas en columnas) y 3 condiciones microbiológicas, junto con un control negativo, dispuestas en filas. Todos los tratamientos se evaluaron por cuadruplicado para asegurar la reproducibilidad técnica y la significancia estadística de los resultados.

Las condiciones nutricionales evaluadas constaron de: una primera condición que actuó como control positivo cualitativo (GAM básico suplementado) con el fin de asegurar la viabilidad del inóculo; una segunda condición o control basal correspondiente al blanco de la digestión in vitro (agua sometida al mismo proceso de digestión del AOVE); y una tercera condición experimental constituida por el digerido de AOVE. Cabe destacar que, debido a la imposibilidad de esterilizar el aceite mediante filtración convencional, la inclusión transversal de controles sin inóculo resultó fundamental en el diseño para monitorizar y descartar posibles crecimientos bacterianos intrínsecos procedentes de los propios digestos.

De forma transversal, estas condiciones nutricionales se cruzaron con las siguientes condiciones microbiológicas: monocultivos de *Akkermansia muciniphila* y *Christensenella minuta* de forma aislada, la co-incubación de ambas cepas (SynCom), y un control negativo transversal (medio estéril sin inóculo). Las SynCom evaluada se representa en la Figura 4, y la disposición esquemática detallada de la placa se ilustra en la **Figura A2.2**, Anexo 2.

El ensamblaje final en cada pocillo profundo se realizó combinando 100 μL de las respectivas soluciones a evaluar (GAM básico extra, digerido de agua y digerido de AOVE) con 900 μL de la suspensión bacteriana correspondiente en medio GAM básico (OD_{600} = 0,1).

Una vez inoculadas, las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de anaerobiosis estricta dentro de una cabina anaeróbica durante un periodo total de 48 h. Para la evaluación de las dinámicas poblacionales, se procedió a la extracción de alícuotas de 100 μL a diferentes tiempos de incubación (t = 0 y t = 24), transfiriendo el volumen extraído a placas multipocillo estándar (Deltalab S.L., Barcelona, España) (para la monitorización del crecimiento global mediante lectura de densidad óptica (OD600).

Para el punto final del ensayo (t = 48 h), dada la alta carga lipídica de los digestos, se incorporó un paso de lavado de la biomasa previo a la lectura para evitar interferencias ópticas. Para ello, se procesó la totalidad del volumen restante en la placa de fondo profundo transfiriéndolo a tubos Eppendorf (Sigma Aldrich), los cuales se centrifugaron (Sigma Aldrich) durante 3 minutos a 8000 rpm. Tras descartar el sobrenadante, el pellet celular se resuspendió en 800 µL de tampón PBS, volumen equivalente al remanente original del pocillo. Esta suspensión limpia se transfirió a una placa multipocillo estándar para la medición de la OD600. Finalmente, tanto estas muestras purificadas de 48 h como las alícuotas de los tiempos anteriores se destinaron a la posterior cuantificación molecular específica mediante qPCR.

4.4 Evaluación de la dinámica poblacional.

Para monitorizar el crecimiento y las interacciones microbianas a lo largo del tiempo, se diseñó una estrategia basada en tres aproximaciones metodológicas complementarias. En el ensayo SyHO, la dinámica de las SynComs de baja complejidad (I, II y III) se evaluó mediante recuento diferencial en placa y cuantificación molecular a t = 0 h y t = 24 h. Esta doble aproximación permitió comparar la eficiencia de ambas técnicas en el seguimiento poblacional y establecer la mejor técnica para futuras aplicaciones. En cambio, para la comunidad de alta complejidad (IV), se prescindió de la técnica de recuento clásica debido a las limitaciones técnicas del aislamiento diferencial, optando directamente por la cuantificación molecular a t = 0, t = 24 h y t = 48 h. Por su parte, para el ensayo SyAO, el diseño experimental se planteó la evaluación poblacional exclusivamente mediante cuantificación molecular por qPCR a los tiempos de incubación establecidos (t = 0 h, t = 24 h y t = 48 h)l

De forma transversal a todos los ensayos, exceptuando con la SynCom IV, la evaluación preliminar del crecimiento global se determinó mediante lectura espectrofotométrica de la densidad óptica (OD_{600}). No se consideró necesaria la medición empírica a tiempo cero (t = 0 h), asumiéndose como línea base la OD_{600} estandarizada a 0,05 (valor teórico del inóculo diluido).

4.4.1 Recuento de viables en placa

La cuantificación poblacional mediante la técnica de viables en placa se realizó mediante diluciones seriadas en base 10. Para ello, en los tiempos de muestreo establecidos (t = 0 h y t = 24 h), se extrajeron alícuotas de las placas multipocillo de fondo profundo donde se realizaba la incubación. De forma paralela a la toma de muestras para los recuentos, se extrajeron alícuotas adicionales de 200 μl para la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica a las 24 y 48 horas. No se consideró necesaria la medición empírica a tiempo cero (t = 0 h), dado que la biomasa de todos los pocillos partía de una OD_{600} inicial estandarizada a 0,1 (0,05 diluido) asumiéndose este valor teórico como línea base para la posterior representación gráfica de los resultados. Asimismo, esta misma alícuota o placa se empleó, almacenada a -80ºC, para la posterior cuantificación por qPCR.

Las diluciones para el recuento se prepararon en placas multipocillo estándar utilizando tampón PBS estéril como diluyente, con cada réplica biológica y cada condición nutricional de forma independiente. Con el objetivo de obtener un rango de recuento estadísticamente significativo, se inocularon por triplicado las diluciones correspondientes a 10^{-2} y 10^{-3} para el inóculo (t = 0 h), y las diluciones 10^{-4}, 10^{-5} o 10^{-6} para el punto final (t = 24 h).

El aislamiento y recuento diferencial de las cepas se logró mediante el empleo de medios de cultivo selectivos. Para la cuantificación de enterobacterias como *E. coli,* se utilizó agar cromogénico Brilliance o en su defecto, agar BHI; para *L. rhamnosus* se utilizó agar MRS acidificado a pH 5,0 mediante la adición de HCl 1M al medio y suplementado con L-cisteína al 0,05 % (p/v); finalmente, para la cuantificación del género *Bifidobacterium*, se utilizó agar MRS suplementado con L-cisteína al 0,05 % (p/v) y tetraciclina (200 μg/ml) (Sigma-Aldrich). Es importante destacar que, para el recuento de las condiciones microbiológicas mixtas (SynComs), las muestras procedentes de un mismo pocillo se sembraron de forma paralela en todos los medios selectivos correspondientes a las especies que conformaban dicho consorcio, permitiendo así la cuantificación individualizada y el seguimiento de cada población bacteriana dentro de la comunidad.

La siembra se realizó inoculando 50 μl de las diluciones seleccionadas en cada placa Petri (Sigma Aldrich), empleando la técnica de extensión en la superficie con perlas de vidrio estériles (Assistent, Sondheim vor der Rhön, Alemania) para garantizar una distribución homogénea. Las placas destinadas al recuento de *E. coli* se incubaron en condiciones de aerobiosis durante 24 horas, mientras que el resto de los monocultivos y consorcios anaerobios se incubaron en jarras de anaerobiosis durante 48-72 h a 37ºC.

Finalizado el periodo de incubación, el recuento se restringió a aquellas placas que presentaban un número de colonias estadísticamente representativo (entre 25 y 300 colonias). En aquellas condiciones experimentales donde la viabilidad celular fue críticamente baja (<25 colonias), los valores se registraron en forma de estimación poblacional límite para evidenciar la supervivencia residual. A partir de estos recuentos, se calculó la concentración bacteriana expresada en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) aplicando la **Ecuación 1** estándar de recuento. Los registros completos de estos recuentos se detallan en el Anexo 5.

$$UFC/mL = \frac{Colonias\ en\ placa\ \cdot Factor\ de\ dilución}{Volumen\ sembrado\ (mL)} \quad \textbf{(1)}$$

4.4.1 Cuantificación molecular qPCR.

Para la determinación precisa de la abundancia de cada taxón dentro de las SynComs, se llevó a cabo una cuantificación absoluta mediante qPCR a partir de las alícuotas almacenadas de 100-200 μl.

Para posibilitar la cuantificación absoluta, se requirió la generación previa de curvas patrón estandarizadas para cada uno de los tipos bacterianos en estudio. Los estándares se generaron mediante amplificación por PCR de punto final, utilizando la mezcla maestra DreamTaq (2X) (Thermo Fisher Scientific) ADN genómico de referencia para cada una de las especies a cuantificar utilizando los mismos *primers* que se utilizarían posteriormente en la reacción de cuantificación (ver **Tabla A3.1**, Anexo 3). La correcta amplificación y especificidad del producto se verificaron cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % empleando un marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific) como referencia de tamaño. La visualización de las bandas de DNA se realizó utilizando SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) como agente intercalante para la visualización de las bandas de ADN bajo iluminación ultravioleta. A continuación, los amplicones obtenidos se purificaron empleando un sistema de perlas magnéticas (Magtivio B.V., Nuth, Países Bajos) para asegurar la eliminación de cebadores residuales y nucleótidos libres. Tras la cuantificación del ADN purificado, se calculó el número de copias exacto, tal y como se detalla en la **Ecuación 2**, y se prepararon cinco diluciones seriadas en base 10, abarcando un rango entre 10^{10} y 10^{2} número de copias, para la construcción de las rectas patrón de cada microorganismo.

$$Numero\ de\ copias = \frac{cantidad\ DNA\ (ng) \cdot número\ Avogadro}{Longitud\ genoma\ (pB)\ \cdot 10^{9} \cdot 660} \quad \textbf{(2)}$$

Las reacciones de qPCR se ensamblaron en un volumen final de 10 μL por pocillo. La mezcla de la reacción se compuso de 5 μL de una mezcla maestra comercial basada en la química de detección SYBR Green (Thermo Fisher Scientific), *primers* forward y reverse (concentración final 0,5 μM), 3 μL de agua Milli-Q y finalmente, 1 μL de las alícuotas almacenadas. De igual forma, para mantener un estricto seguimiento con los ensayos de recuento en placa, la cuantificación molecular se aplicó sistemáticamente sobre tres réplicas biológicas independientes para cada condición nutricional evaluada. Específicamente, control basal de Glu 0,2 % frente a condición experimental con HMO 2% + Glu 0,2%. Esta simetría analítica nos permitió asegurar la máxima fiabilidad estadística y una comparación metodológica directa entre los datos de viabilidad clásica y la cuantificación genómica. Dadas las diferencias en las temperaturas de hibridación (*annealing*) de los respectivos *primers* (Tabla 2), las reacciones se ejecutaron en placas independientes para cada especie respetando así sus requerimientos termodinámicos.

La concentración celular de las muestras experimentales se determinó interpolando sus ciclos de cuantificación (Cq) en las curvas patrón estandarizadas haciendo uso de la ecuación de la recta (ver Anexo 4), donde “y” es el valor de Cq, y “x” es el logaritmo decimal de la concentración. Para obtener el número absoluto de copias/μL, se calculó el antilogaritmo base 10 (10^{x}). La fiabilidad de estas curvas se validó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (R^2), exigiendo valores superiores o muy cercanos a 0,99, para garantizar la estricta linealidad del ensayo. Asimismo, la eficiencia de la amplificación (E) se evaluó a partir de la pendiente (m) de la recta de regresión (ver Anexo 4) según la **Ecuación 3**.

$$E = 10^{\frac{-1}{m}} \quad \textbf{(3)}$$

La generación de estas rectas patrón a partir de las diluciones seriadas y el cálculo de las concentraciones absolutas se llevó a cabo utilizando el software Microsoft Excel. Posteriormente, el análisis estadístico de las medias y desviaciones, así como la representación gráfica de las dinámicas poblacionales, se desarrollaron mediante el software GraphPad Prism, garantizando una alta fiabilidad en la interpretación y visualización de los datos. Las secuencias de los *primers* empleados y sus respectivas temperaturas de annealing se detallan en la **Tabla A3.1**, Anexo 3.

4.5 Tratamiento de datos y análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos experimentales y las representaciones gráficas se llevaron a cabo utilizando el software Graphad Prism (versión 10.1.1 para macOS, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EE. UU., wwwgraphpad.com). Previamente al análisis, los datos brutos procedentes tanto de la cuantificación por qPCR (crecimiento relativo) como de los

recuentos en placa (viabilidad poblacional en UFC/ml) fueron transformados a su base logarítmica (Log_{10}) con el objetivo de estabilizar la varianza.

La normalidad de la distribución de los datos transformados se evaluó estadísticamente mediante el test de Shapiro-Wilk. Para determinar las diferencias significativas entre las distintas condiciones de cultivo, se empleó de manera unificada un análisis de varianza unidireccional (ANOVA de una vía). Asimismo, para evaluar las dinámicas poblacionales, considerando simultáneamente el efecto del tratamiento nutricional y el tiempo de incubación, se aplicó un análisis de varianza bidireccional (ANOVA de dos vías). En ambos modelos el análisis fue seguido por el test de comparaciones múltiples de Turkey, a excepción de los datos de densidad óptica (OD) correspondientes a los ensayos con HMOs, en los cuales se aplicó el test de comparaciones múltiples de Šidák

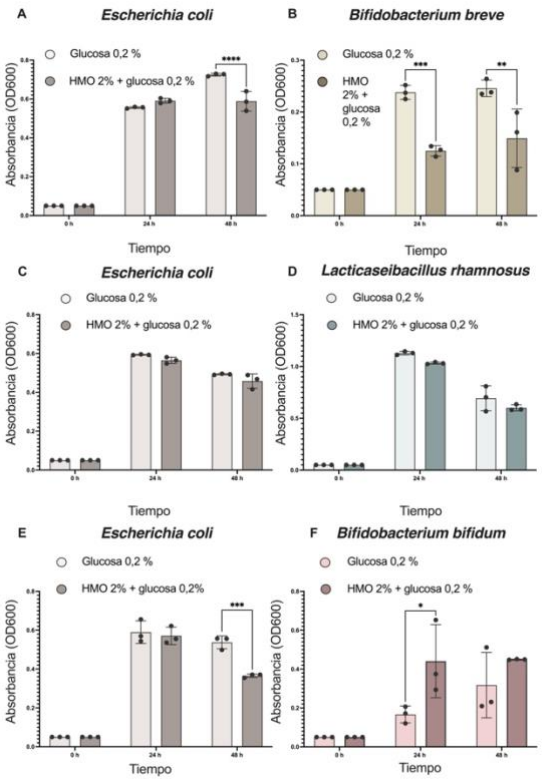
Todos los ensayos experimentales se realizaron en triplicado biológico (n = 3), a excepción de las evaluaciones correspondientes a la suplementación con digesto de AOVE, las cuales se ejecutaron en cuadriplicado biológico (n=4). Los resultados se expresan como la media poblacional ± la desviación estándar (SD). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellos valores de $p < 0,05$, indicándose en las representaciones gráficas mediante el sistema estándar de asteriscos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$)

5 Resultados

5.1 Efecto de los HMOs en comunidades sintéticas del ecosistema infantil

Para evaluar el impacto de la co-íncubación y la suplementación con HMOs en el crecimiento bacteriano, se monitorizó inicialmente la viabilidad global mediante densidad óptica (OD_{600}) (Figura 5). Para un análisis detallado, se analizaron la diferencia de crecimiento y las dinámicas poblacionales de cada bacteria, tanto individualmente como en comunidad, mediante recuento de viabilidad en placa y cuantificación de ADN por qPCR.

5.1.1 Crecimiento y viabilidad en el co-cultivo de *Escherichia coli* – *Lacticaseibacillus rhamnosus*



Como paso previo a la evaluación de las interacciones microbianas, se monitorizó el crecimiento global de los monocultivos de *E. coli* y *L. rhamnosus* mediante densidad óptica (OD600). Los resultados (Figura 5) confirmaron una proliferación adecuada de ambas cepas a las 24-48 horas. Notablemente, no se observaron diferencias significativas en los valores de OD600 entre el medio control con glucosa y el suplementado con HMOs para ninguna de las especies en aislamiento. Tras validar esta línea base espectrofotométrica, y dada la limitación de la técnica para discriminar poblaciones mixtas, el análisis detallado de la SynCom III se abordó mediante recuento diferencial en placa y la cuantificación molecular.

Figura 5. Cinética de crecimiento en monocultivo de las cepas integrantes de las SynComs I, II y III. Generación de biomasa evaluada mediante la monitorización de densidad óptica (OD600) a las 0, 24 y 48 h de incubación. Los paneles muestran el crecimiento individual frente a condiciones nutricionales: medio basal con glucosa al 0,2% diluido y medio suplementado con HMO al 2% + glucosa al 0,2 % diluido. Las barras indican el valor medio poblacional y las líneas de error representan la desviación estándar de las réplicas biológicas independientes. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con prebiótico y su respectivo control basal (*p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001)

El análisis de viabilidad poblacional mediante recuento en placa mostró niveles constantes de UFC/mL para *L. rhamnosus,* sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos (Figura 6D). Sin embargo, el recuento de *E. coli* reveló un impacto condicionado por la fuente de carbono (Figura 6C). Mientras que en monocultivo *E. coli* mantuvo recuentos elevados en presencia de HMO comparada con el control de glucosa, su co-incubación con *L. rhamnosus* en este mismo sustrato provocó una caída muy acentuada en el número de colonias recuperadas (p < 0,001). Esta reducción fue también significativamente mayor que la observada en el co-cultivo control con glucosa basal (p < 0,01).

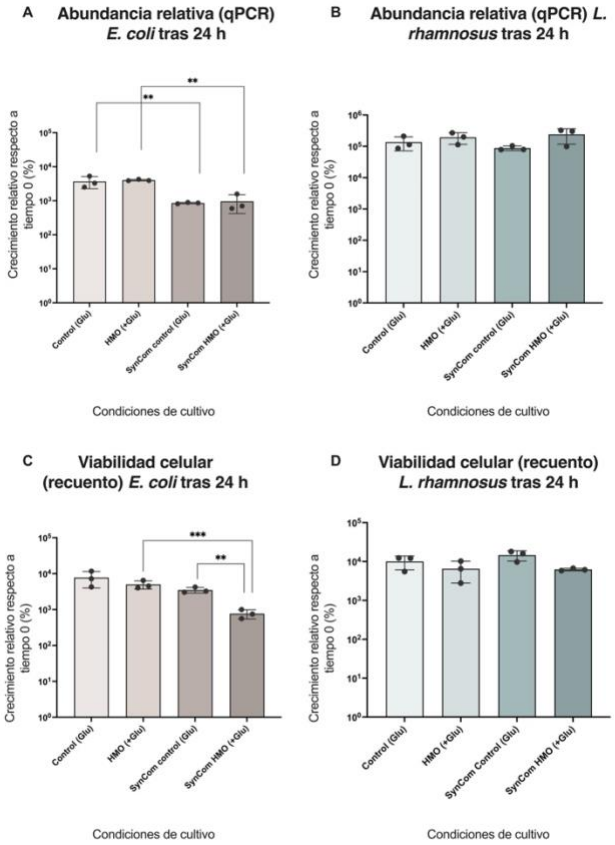


Figura 6. Dinámica poblacional del co-cultivo de *E. coli* y *L. rhamnosus* tras 24 horas de incubación. Los paneles muestran el crecimiento en medios basales con glucosa (Glu) y suplementados con oligosacáridos de la leche materna (HMO), tanto en monocultivo como en comunidad. (A, B) Crecimiento relativo cuantificado mediante qPCR para *E. coli* y *L. rhamnosus,* respectivamente. (C, D) Viabilidad poblacional cuantificada mediante recuento en placa (UFC/ml) para *E. coli* y *L. rhamnosus,* respectivamente. Las barras representan la media poblacional y las barras de error indican la desviación estándar de las tres réplicas biológicas independientes (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas (** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001). Las comparaciones sin asterisco no mostraron significancia estadística.

Por otro lado, los datos de la qPCR (previamente validados mediante curva estándar, *L. Rhamnosus*: R^2 = *0,9997*, *E = 1,889; E. coli:* R^2 = *0,9946*, *E = 1,83*) (ver Anexo 4) corroboran, que *L. rhamnosus* no mostró alteraciones significativas en su abundancia relativa en ninguna de las condiciones evaluadas, manteniendo niveles estables tanto en monocultivo como en co-cultivo (Figura 6B). Por el contrario, la abundancia de *E. coli* se vio significativamente reducida al cultivarse en presencia de *L. rhamnosus* (Figura 6A), observándose esta disminución tanto en el medio basal con glucosa (p < 0,01) como en el medio suplementado con HMO (p < 0,01). No obstante, no se observaron diferencias significativas en la evaluación de la influencia del sustrato sobre el crecimiento en monocultivo y en co-cultivo.

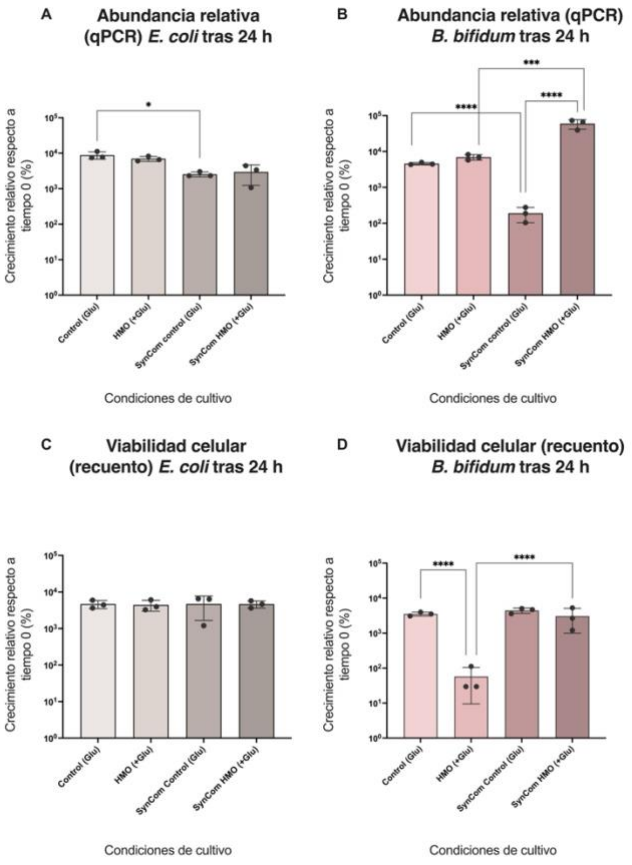
5.1.2 Crecimiento y viabilidad en el co-cultivo de *Escherichia coli – Bifidobacterium bifidum*

La evaluación de la SynCom formada por *E. coli y B. bifidum* reveló una alta dependencia del entorno de cultivo, así como discrepancias técnicas según el método de cuantificación empleado.

Como aproximación inicial, la monitorización de la densidad óptica (OD600) en los monocultivos a las 24 horas (Figura 5) mostró un impacto diferencial del sustrato. Mientras *E. coli* mantuvo una biomasa total similar en ambos medios, *B. bifidum* experimentó un aumento significativo ($p < 0,05$) de su biomasa en presencia de HMO respecto al control con glucosa. Cabe destacar que la prolongación de la lectura hasta las 48 horas reveló una caída significativa ($p < 0,001$) de la biomasa de *E. coli* en el medio con HMO frente a su control. Por otro lado, *B. bifidum* aunque la alta dispersión biológica en el medio control impidió alcanzar significancia estadística a las 48 h, el medio suplementado con HMO demostró estabilizar su crecimiento poblacional. Para comprender cómo estas capacidades individuales afectan a las dinámicas de la comunidad, se procedió al análisis detallado mediante técnicas de alta resolución.

Comenzando por el análisis de *E. coli*, la evaluación de la viabilidad poblacional mediante recuento en placa corroboró su alta resistencia, manteniendo niveles estables de células viables (UFC/ml) en la totalidad de los tratamientos evaluados, sin presentar diferencias estadísticamente significativas (Figura 7C). Por su parte, la cuantificación mediante qPCR (previamente validada mediante curva estándar, $R^2 = 0,9946$, $E = 1,83$) (ver ANEXO 4) mostró una tendencia de estabilidad muy similar, aunque logró detectar una ligera pero significativa reducción ($p<0,05$) en su abundancia relativa al co-incubarse en el medio basal con glucosa respecto a su monocultivo control (figura 7A).

En el caso de *B. bifidum*, los resultados mostraron una fuerte dependencia de las interacciones ecológicas. El recuento de viabilidad en placa (Figura 7D) evidenció que su cultivo en solitario con HMO registró una caída drástica y altamente significativa de su número de colonias a las 24 horas en comparación con el control de glucosa ($p<0,0001$). Notablemente, la co-incubación con *E. coli* en este mismo sustrato suplementado ejerció un fuerte efecto de rescate poblacional, recuperando la cantidad de células viables hasta niveles significativamente superiores a los de su monocultivo en HMO ($p<0,0001$) y equiparándose a las condiciones de control.



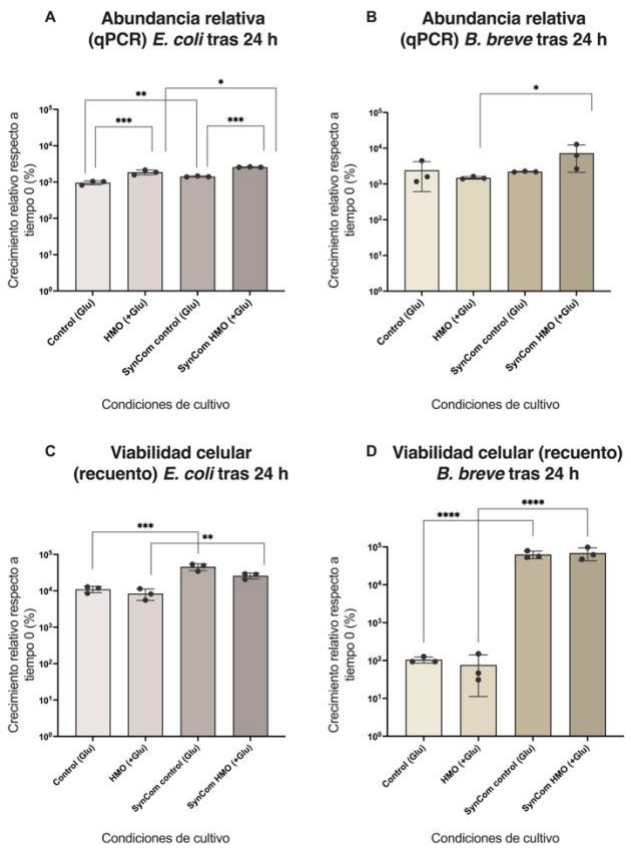
Al evaluar la abundancia de *B. bifidum* por qPCR (previamente validada mediante curva estándar, $R^2 = 0,9974$, $E = 1,96$) (ver Anexo 4) (Figura 7B), se detectaron patrones diferentes en el crecimiento. En condiciones basales con glucosa, la co-incubación con *E.coli* provocó una disminución altamente significativa de su abundancia ($p<0,0001$) que no se reflejaba en las placas. Sin embargo, en el medio suplementado con HMO se corroboró la misma dinámica positiva observada en la viabilidad, en el que el co-cultivo incrementó de forma significativa la abundancia de *B.bifidum* tanto respecto a la condición de co-cultivo control ($p<0,0001$) como a su correspondiente monocultivo basal ($p<0,001$).

Figura 7. Dinámica poblacional del co-cultivo de *E. coli* y *B. bifidum* tras 24 horas de incubación. Los paneles muestran el crecimiento en medios basales con glucosa (Glu) y suplementados con oligosacáridos de la leche materna (HMO), tanto en monocultivo como en comunidad. (A, B) Crecimiento relativo cuantificado mediante qPCR para *E. coli* y *B. bifidum*, respectivamente. (C, D) Viabilidad poblacional cuantificada mediante recuento en placa (UFC/ml) para *E. coli* y *B. bifidum*, respectivamente. Las barras representan la media poblacional y las barras de error indican la desviación estándar de las tres réplicas biológicas independientes (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas (*** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). Las comparaciones sin asterisco no mostraron significancia estadística.

5.1.3 Crecimiento y viabilidad en el co-cultivo de *Escherichia coli – Bifidobacterium breve*.

El análisis de la SynCom II (figura 8) evidenció una clara influencia del co-cultivo en ambas poblaciones, observándose de nuevo variaciones en la magnitud de los resultados según el método de cuantificación empleado.

De forma análoga a los ensayos previos, la monitorización inicial de la biomasa en monocultivo mediante densidad óptica (OD600) (Figura 5) reveló dinámicas sustrato-dependientes. Mientras que *E. coli* mantuvo su patrón característico, estabilidad a las 24 h y caída significativa a las 48 h en HMO frente a glucosa $p < 0,0001$, *B. breve* mostró una reducción en este parámetro. A diferencia de *B. bifidum*, el cultivo de *B. breve* en presencia de HMO redujo significativamente su generación de biomasa respecto al control basal con glucosa, tanto a las 24 horas ($p < 0,001$) como a las 48 horas ($p < 0,01$). Ante esto, se procedió a evaluar el sistema en co-cultivo a las 24 horas



Comenzando por *E. coli*, los recuentos en placa confirmaron mayores niveles de recuperación poblacional en co-cultivo (Figura 8C). Los valores de UFC/mL aumentaron drásticamente al co-incubarse con *B. breve*, obteniéndose recuentos significativamente superiores al monocultivo tanto en medio con glucosa ($p< 0,001$) como con HMO ($p < 0,01$). A nivel genómico por qPCR (previamente validada mediante curva estándar, $R^2 = 0,9946$, $E = 1,83$) (ver Anexo 4), *E. coli* experimentó un aumento generalizado (Figura 8A). Su abundancia relativa creció significativamente en monocultivo al añadir HMO ($p < 0,001$) respecto al control basal con Glu. Asimismo, al comparar el monocultivo en medio basal con glucosa con el co-cultivo en esta misma condición se vio también un ligero aumento en el crecimiento de *E. coli* ($p < 0,01$). Este estímulo se maximizó en la SynCom con HMO, superando significativamente al control basal ($p < 0,001$) y a su correspondiente monocultivo con HMO ($p < 0,05$)

Figura 8. Dinámica poblacional del co-cultivo de *E. coli* y *B. breve* tras 24 horas de incubación. Los paneles muestran el crecimiento en medios basales con glucosa (Glu) y suplementados con oligosacáridos de la leche materna (HMO), tanto en monocultivo como en comunidad. (A, B) Crecimiento relativo cuantificado mediante qPCR para *E. coli* y *B. breve*, respectivamente. (C, D) Viabilidad poblacional cuantificada mediante recuento en placa (UFC/ml) para *E. coli* y *B. breve*, respectivamente. Las barras representan la media poblacional y las barras de error indican la desviación estándar de las tres réplicas biológicas independientes (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas (*$p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Las comparaciones sin asterisco no mostraron significancia estadística.

En el caso de *B. breve*, la viabilidad poblacional en placa mostró una dinámica marcada (Figura 8D). En monocultivo, se observó una caída en el número de colonias recuperadas a las 24 horas, tanto en glucosa como en HMO. Sin embargo, la co-incubación con *E. coli* revirtió esta tendencia de forma contundente, elevando los recuentos de la bifidobacteria con aumentos altamente significativos ($p < 0,0001$) bajo ambas condiciones nutricionales. Por el contrario, la cuantificación genómica (Figura 8B) (previamente validada mediante curva estándar, $R^2 = 0,9974$, $E = 1,96$) (ver Anexo 4) reveló una mayor estabilidad; la abundancia de *B. breve* en monocultivo no se vio alterada por el sustrato. Pese a ello, se detectó una abundancia relativa

significativamente mayor al co-incubarse en la SynCom con HMO respecto a su monocultivo ($p < 0,05$).

5.1.4 Dinámica de poblaciones del consorcio microbiano completo.

La evaluación de la SynCom IV compuesta por las cuatro cepas simultáneamente (*E. coli, L rhamnosus, B. breve y B. bifidum*) mediante qPCR mostró variaciones en la proporción de cada integrante, cuyo análisis requirió la evaluación complementaria de la abundancia relativa y absoluta para comprender la composición real del consorcio.

A nivel de abundancia relativa (Figura 9), los datos de qPCR mostraron un desplazamiento poblacional a lo largo del tiempo. En el inóculo inicial (0 h), *E. coli* y *B. bifidum* constituían las fracciones mayoritarias de la comunidad. Sin embargo, a las 24 y 48 horas la proporción de *L. rhamnosus* representó entre el 75-90% de la composición total de la SynCom, tanto en la condición basal como en la suplementada con HMO, mientras que las proporciones de *E. coli* y *B. breve* quedó reducida a fracciones gráficamente marginales.

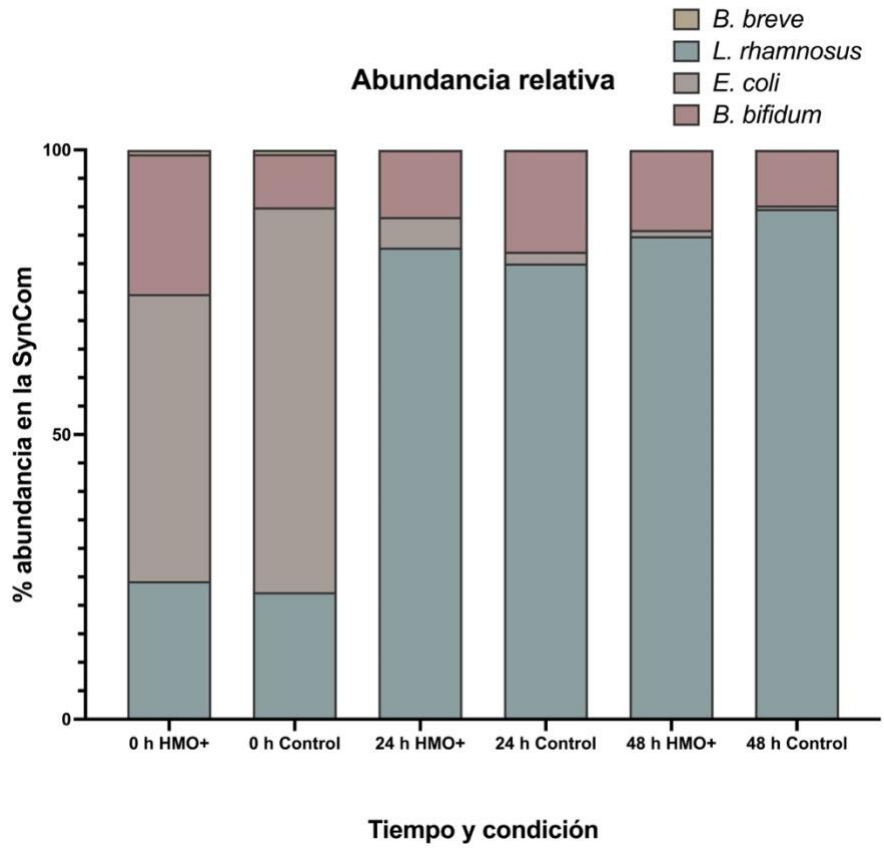


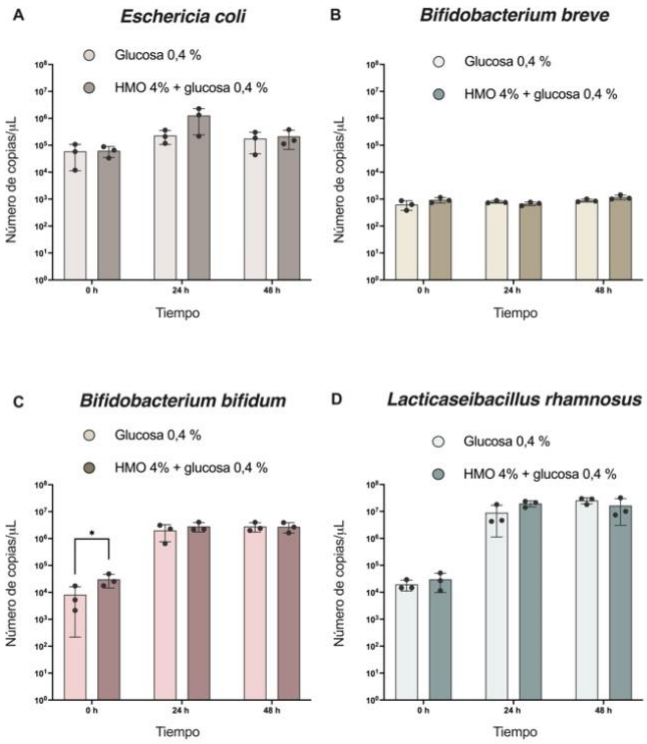
Figura 9. Evolución de la abundancia relativa en el consorcio multiespecie (SynCom IV). Dinámica poblacional expresada como porcentaje de abundancia relativa de cada cepa dentro de la comunidad, evaluada mediante qPCR a tiempos 0, 24 y 48 h de incubación. Las barras apiladas muestran la reestructuración ecológica bajo dos condiciones de cultivo: medio basal (Control) y medio suplementado con HMOs. Los distintos colores representan la proporción individual de cada una de las cepas respecto a la carga genómica total detecta en el consorcio para cada punto temporal y condición

Por otro lado, la cuantificación absoluta, respaldada por unos parámetros de linealidad y eficiencia para cada cepa (*E. coli*: $R^2 = 0,999$, $E = 1,85$; *B. bifidum* $R^2 = 0,9932$, $E = 1,87$: *B. breve* $R^2 = 0,9897$, $E = 1,82$: *L. rhamnosus* $R^2 = 0,9984$, $E = 1,77$) (ver Anexo 4) permitió observar los niveles genómicos reales de las cepas minoritarias en el análisis relativo. De forma general, la adición de HMO no generó, diferencias estadísticamente significativas en el número de copias genómicas detectadas frente a su respectivo control basal con glucosa, exceptuando a *B. bifidum.*

Concretamente, *B. bifidum* (Figura 10A) mostró una diferencia inicial significativa ($p < 0,05$) en su abundancia genómica a las 0 horas, presentando mayor número de copias en la condición

con HMO. Posteriormente los valores aumentaron y se estabilizaron en el orden de 10^6 copias/μL a las 24 y 48 horas, sin mostrar diferencias significativas entre ambos sustratos.

En el caso de *B. breve* (Figura 10B) se detectaron valores estables en torno a 10^3 copias/μL durante las 48 horas del ensayo, manteniéndose constantes en ambas condiciones.



E. coli (Figura 10C), en cambio, mostró niveles genómicos en el rango de 10^5-10^6 copias/μL . Aunque se observó un ligero incremento del valor medio a las 24 horas en el medio con HMO frente al control, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas en ninguno de los tiempo evaluados.

Por último, los niveles genómicos de *L. rhamnosus* (Figura 10D) ascendieron desde el inóculo inicial hasta alcanzar valores entre 10^7-10^8 número de copias/μL a las 24 y 48 horas en ambos sustratos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la condición suplementada y el control basal.

Figura 10. Cuantificación absoluta de cada taxón dentro de la comunidad de cuatro cepas, evaluadas mediante qPCR a las 0, 24 y 48 horas de incubación. Los datos se representan en escala logarítmica expresados en equivalente de viabilidad celular (UFC/mL). Los paneles detallan la evolución de **A.** *Escherichia coli*; **B.** *Bifidobacterium breve*; **C.** *Bifidobacterium bifidum* y **D.** *Lacticaseibacillus rhamnosus,* bajo dos condiciones nutricionales: medio basal de control y medio suplementado con HMO. Las barras indican el valor medio poblacional y las líneas de error representan la desviación estándar de lsa réplicas biológicas independientes. El asterisco denota diferencias significativas entre la condición con prebiótico y el control basal para ese punto temporal (* $p < 0,05$).

5.2 Impacto del aceite de oliva en la modulación del ecosistema materno.

Para el ensayo de interacción con el digesto de AOVE (SyAO), el crecimiento poblacional se evaluó principalmente mediante la monitorización de la densidad óptica (OD_{600}). Debido a la alta complejidad y carga lipídica de la matriz del digesto, las alícuotas almacenadas a tiempo iniciales (t = 0 y t = 24) sin purificación previa presentaron una fuerte inhibición, comprometiendo la cuantificación por qPCR. Por tanto, la absorbancia (Figura 11) se empleó como el parámetro principal para determinar la capacidad de las cepas para proliferar o no en presencia de este sustrato. De igual modo, las alícuotas extraídas al tiempo final (t = 48 h), que sí fueron purificadas, fueron las únicas empleadas en la qPCR. Asimismo, la densidad óptica de estas muestras purificadas a las 48 h se utilizó como dato complementario para establecer una validación cruzada con los resultados de dicha qPCR.

5.2.1 Crecimiento y viabilidad de *Akkermnasia muciniphila* – *Chrystensenella minuta* frente al digesto de AOVE.

La monitorización de la densidad óptica (Figura 11) a lo largo de las 48 horas reveló variaciones dependientes del sustrato, mostrando perfiles distintos para cada especie. En el caso de *Akkermnasia muciniphila*, a las 24 horas, los valores de absorbancia en el medio suplementado con el dAV fueron significativamente superiores tanto frente al control en medio GAM ($p < 0,01$) como frente al blanco del digerido ($p < 0,001$). Esta tendencia estimuladora se mantuvo a las 48 horas, donde los valores de absorbancia con AOVE superaron con una

altísima significancia al medio basal con GAM ($p < 0,05$). Cabe destacar que el propio blanco del digesto pareció aportar un ligero estímulo a las 48 horas respecto al GAM.

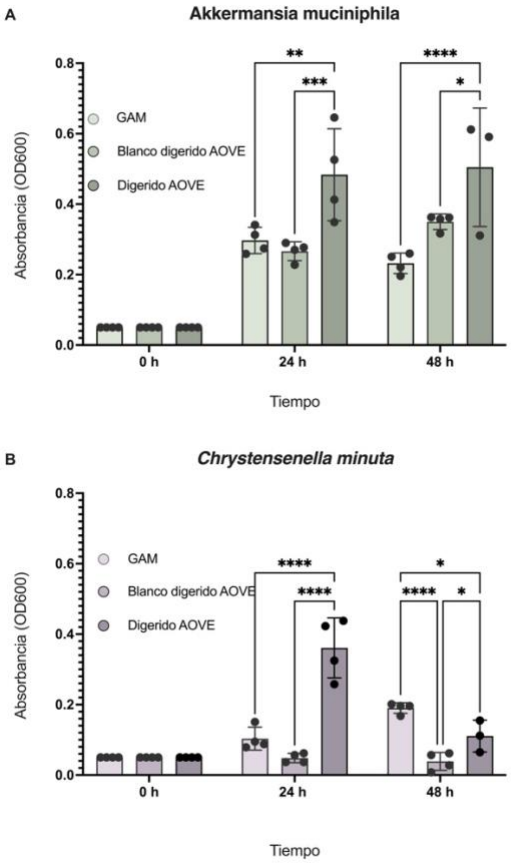


Figura 11. Cinética de crecimiento de cepas representativas del ecosistema materno frente al digesto de AOVE. Generación de biomasa evaluada mediante monitorización de la densidad óptica (OD600) a las 0, 24 y 48 h. Los paneles detallan la evolución poblacional individual de A. *Akkermansia muciniphila* y B. *Christensenella minuta*. Se contrastan tres condiciones experimentales: medio basal GAM, medio suplementado con el blanco de la digestión y medio suplementado con digesto de AOVE. Las barras indican el valor medio y las líneas de error representan la desviación estándar de las réplicas biológicas. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para cada punto temporal (*$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$; ****$p < 0,0001$)

Por otro lado, *Christensenella minuta*, experimentó variaciones dependiente del tiempo. A las 24 horas, la adición del dAV indujo un incremento significativo en los valores de OD superiores a los obtenidos en el medio GAM y en el blanco del digerido (ambas comparaciones $p < 0,0001$). Sin embargo, a las 48 horas se observó un colapso generalizado de la absorbancia en todas las condiciones. Durante esta fase, el medio basal GAM presentó los valores más altos, de hecho, el blanco del digesto mostró una severa reducción ($p < 0,0001$) respecto al GAM. No obstante, la presencia del dAV mitigó parcialmente esta reducción, manteniendo valores de absorbancia significativamente superiores a los del blanco ($p < 0,05$)

Paralelamente a la monitorización de OD, se pretendió determinar la carga genómica de ambas cepas mediante qPCR. Durante la validación metodológica previa mediante curvas patrón, *C. minuta* arrojó parámetros de linealidad (R^2=0,9857) y eficiencia (E = 1,97) adecuados (ver Anexo 4), mientras que *A. muciniphila*, presentó un valor de R^2 adecuado (R^2 = 0,9926) y una eficiencia de amplificación algo reducida (*E* = 1,80) (ver Anexo 4). No obstante, al analizar las muestras experimentales en presencia del suplemento, se detectó una inhibición técnica severa de la reacción, resultando en valores de ciclo de cuantificación (Cq) inusualmente altos o indetectables a las 0 y 24 horas en condiciones relevantes para el estudio, como el digerido de aceite. Aunque se implementaron estrategias de purificación adicionales para las muestras de 48 horas, consistentes en lavados sucesivos por centrifugación y resuspensión del pellet celular en tampón PBS, los resultados genómicos continuaron mostrando interferencias. En consecuencia, los datos de qPCR no resultaron extrapolables, basando la caracterización de

este modelo de forma exclusiva en las dinámicas de densidad óptica y reservando la evaluación genómica para futuras optimizaciones del protocolo.

6 Discusión.

El establecimiento de la microbiota materno-infantil es un proceso ecológico altamente dinámico donde las interacciones entre especies determinan la colonización exitosa del tracto gastrointestinal (Ioannou et al., 2024; Laursen & Roager, 2023; Lordan et al., 2024; Pathak et al., 2018; Robertson et al., 2019). Los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado mediante el uso de SynComs sugieren que la presencia de sustratos específicos, como los HMOs o alimentos comunes de la dieta mediterránea como el aceite de oliva, actúan como moduladores clave en la direccionalidad de estas interacciones, generando escenarios que abarcan desde la exclusión competitiva hasta el mutualismo estricto.

El análisis de la co-incubación entre *E. coli* y *L. rhamnosus* mostró una clara dinámica compatible con amensalismo y exclusión competitiva (Siedler et al., 2020). Dado que ninguna de las dos cepas posee la maquinaria para hidrolizar eficazmente los HMOs (Mathipa-Mdakane & Thantsha, 2022), pareció fomentarse una competición abrupta por la glucosa basal. *L. rhamnosus* presenta una ventaja metabólica clave, al fermentar velozmente estos azúcares y secretar ácido láctico. Esta combinación de inanición competitiva y drástica caída del pH podría resultar letal para *E. coli*, un comportamiento que concordaría con las dinámica de exclusión *in vivo* por las cuales los lactobacilos se emplean clínicamente como probióticos contra enterobacterias oportunistas (Chen et al., 2019; Ismael et al., 2024; Mathipa-Mdakane & Thantsha, 2022; Suissa et al., 2023)

A nivel metodológico, inicialmente, la OD_{600} sirvió como un método de cribado preliminar eficaz para confirmar el crecimiento basal en monocultivo. No obstante, el cruce de datos entre las otras dos técnicas analíticas reveló una discrepancia fundamental. Mientras que el recuento en placa mostró un colapso agudo de *E coli* en comunidad suplementada con HMO, la qPCR detectó una reducción mucho menos severa. Esta diferencia sugiere fuertemente que, ante el estrés ácido extremo generado por el lactobacilo, la enterobacteria podría entrar en un estado Viable pero No Cultivable (VBNC), manteniendo su integridad genómica a pesar de no poder formar colonias (Mathipa-Mdakane & Thantsha, 2022)

Finalmente, la fiabilidad de estas observaciones se respalda en la robustez de la qPCR (ver Anexo 4). Si bien la eficiencia de amplificación de la qPCR presentó una leve desviación (E = 1,889), la excepcional linealidad de la curva patrón (R^2 = 0,9997) asegura que este factor actúa como una variable sistemática constante. En consecuencia, este desvío cinético no altera las proporciones relativas, validando que la aplastante dominancia del lactobacilo observada responde a un patrón biológico fundamentado y no un artefacto de la técnica.

El análisis de la comunidad formada por *E. coli* y *B. bifidum* sugirió una fuerte dependencia ecológica. Mientras *E. coli* mantuvo una alta resiliencia basal, *B. bifidum* sufrió una reducción drástica de su viabilidad en monocultivo, la cual fue revertida al co-incubarse, observándose un claro efecto de rescate poblacional. Recientemente, (Lawson et al., 2019; Seki et al., 2026)demostraron en modelos in vitro que las interacciones entre *E. coli* y *B. bifidum* son mutualistas en co-cultivo, donde *E. coli* suministra cisteína a su socio auxótrofo para facilitar la degradación cooperativa de HMOs, beneficiándose a su vez de monosacáridos liberados. No obstante, dado que nuestro medio experimental ya contaba con suplementación basal de cisteína, el mutualismo direccional detectado en nuestro ensayo podría no depender de este intercambio de sustratos. En su lugar, hipotetizamos que el efecto protector sobre *B. bifidum* se deba a que *E. coli* actúa como un sumidero captador de oxígeno, acondicionando el medio y reduciendo el estrés oxidativo fisiológicamente, (Collado et al., 2012; Ferretti et al., 2018), al mismo tiempo que consume rápidamente los azúcares liberados y evita la inhibición por acumulación de metabolitos (Robertson et al., 2019)

A nivel metodológico, la supuesta caída poblacional de *B. bifidum* en placa en monocultivo contrastó enormemente con la estabilidad de su turbidez (OD_{600}) y de su carga genómica (qPCR). Esta falta de concordancia subraya la probable existencia de sesgos técnicos intrínsecos al proceso de plaqueo. Específicamente, el tiempo prolongado de manipulación fuera de la atmósfera controlada podría haber supuesto una exposición crítica al oxígeno ambiental,

induciendo la entrada de la bacteria en un estado VBNC. Asimismo, no se puede descartar la influencia añadida de errores en la homogenización del medio durante las diluciones seriadas sucesivas.

La solidez de esta interpretación técnica se apoya en la alta precisión de la cuantificación molecular empleada. La curva patrón para *B. bifidum* arrojó una eficiencia de amplificación excelente (*E* = 1,96), y una estricta correlación lineal (R^2*=0,9974*). Esta altísima robustez analítica asegura que, a pesar de las posibles dificultades intrínsecas en la lisis de la pared celular bacteriana, los datos genómicos obtenidos representan con extrema fidelidad la abundancia real del ecosistema, validando el efecto protector de la SynCom frente a los sesgos del cultivo tradicional.

El consorcio conformado por *E. coli* y *B. breve* presentó la mayor sinergia del estudio, sugiriendo un posible mutualismo bidireccional. Tanto la viabilidad en placa como la qPCR indicaron que *E. coli* maximizó su proliferación dentro de la SynCom en presencia de HMO, superando significativamente los niveles observados en su monocultivo basal. Dado que la enterobacteria no hidroliza HMOs de forma autónoma (Seki et al., 2026), este estímulo sugiere que, al estar en comunidad, *B. breve* podría metabolizar el prebiótico, liberando monosacáridos que *E. coli* aprovecharía como fuente de carbono secundaria. Por el contrario, el monocultivo de *B. breve* registró una letal caída drástica de su cultivabilidad que logró ser mitigada al co-incubarse en la SynCom. Este marcado declive poblacional en solitario podría estar directamente ligado a su perfil genético. Concretamente, la exploración bioinformática de la cepa (Tabla 1) a través de la base de datos BV-BRC corroboró la ausencia del gen de la α-L-fucosidasa. Esta carencia apuntaría a una limitación metabólica intrínseca para hidrolizar el 2'-FL, lo que podría inducir un estado de inanición al cultivarse de forma aislada (Lou et al., 2023)

A nivel metodológico, la evaluación exclusiva del monocultivo de *B. breve* mostró discrepancias fundamentales entre técnicas. Mientras el plaqueo detectó una mortalidad masiva, la espectrofotometría detectó una caída más moderada y la qPCR evidenció una gran estabilidad genómica. Esta fuerte divergencia sugiere que el colapso detectado en placa no implica una lisis celular inmediata sino una pérdida de cultivabilidad o VBNC. Este declive parece estar inducido por estrés ambiental, provocado por la sensibilidad de la cepa al oxígeno, sumado a posibles errores ineludibles de pipeteo o manipulación durante las diluciones seriadas manuales. El posterior rescate poblacional observado dentro de la SynCom parecería ocurrir porque la enterobacteria estabiliza el nicho, actuando como sumidero de oxígeno y consumiendo metabolitos que evitarían la inhibición ácida de la bifidobacteria.

La fidelidad de algunas de estas dinámicas queda avalada por la alta fiabilidad de la técnica molecular. Al evaluarse los consorcios de forma individualizada, la cuantificación genómica empleó el mismo primer a nivel de género (*Bifidobacterium*, **Tabla 2**), manteniendo así una eficiencia de amplificación casi óptima (E = 1,96) y una linealidad estricta (R^2 = 0,9974). Esta altísima precisión consolida a la qPCR como una herramienta más fiel a la realidad biológica frente a los fallos del cultivo tradicional. Por ello, futuros ensayos comparativos en anaerobiosis estricta resultarán determinantes para discernir definitivamente el peso real de la toxicidad por oxígeno en el monocultivo frente a los artefactos derivados del manejo manual.

El análisis del consorcio multiespecie sugiere que, en ecosistemas complejos, la fuerte presión competitiva enmascara por completo los efectos prebióticos observados en monocultivos (Canon et al., 2020). El hallazgo más revelador es el bajo efecto bífidogénico del HMO (Seki et al., 2026) sobre la carga poblacional absoluta. Es preciso matizar la divergencia significativa en *B. bifidum* a las 0 h, la cual resulta atribuible a fluctuaciones técnicas en la preparación de inóculo, dado que no existió tiempo físico de incubación (Lawson et al., 2019).

Esta aparente falta de estímulo por el sustrato podría explicarse por la marcada dominancia y ausencia de *L. rhamnosus*. Su rápida tasa de duplicación y alta tolerancia ácida le permiten actuar como un competidor primario, consumiendo aceleradamente los recursos energéticos basales. Se hipotetiza que, al alcanzar tempranamente la capacidad de carga y reducir drásticamente el pH, este lactobacilo establece un entorno restrictivo antes de que las bifidobacterias logren asentar un metabolismo degradativo eficiente del 2'-FL(Canon et al., 2020; De Keersmaecker et al., 2006).

No obstante, los datos absolutos sugieren una estabilización poblacional que en lugar de una exclusión competitiva real. El caso de *B. breve* resulta notable; mientras en monocultivo colapsaba por su incapacidad genética para degradar el 2'-FL, en la SynCom logró una estabilización a lo largo de las 48 horas. Este fenómeno apunta a un posible efecto de rescate ecológico, donde la intensa actividad metabólica de *B. bifidum*, actuando como único degradador primario de 2'-FL, genera esta red de seguridad. Esta sinergia colectiva permite a las especies menos competitivas persistir como poblaciones "satélites", sugiriendo que el ligero aumento no significativo observado en su crecimiento con HMO podría ser atribuible a este ligero efecto bífidogénico (Lawson et al., 2019).

Finalmente, la validación de estas complejas dinámicas comunitarias se respalda en la solidez de la qPCR mediante el uso de *primers* especie-específicos. Las curvas patrón mostraron una linealidad estricta (R^2 > 0,989) y eficiencias de amplificación constantes y aceptables (E = 1,75 – 1,87) para todos los taxones evaluados. Estos parámetros óptimos respaldan que las variaciones proporcionales detectadas responden a una reestructuración biológica real del consorcio y no a artefactos técnicos derivados de la amplificación.

La modulación del microbioma también está fuertemente dictada por la asimilación de matrices ricas en lípidos y polifenoles como el AOVE (Pathak et al., 2018). La evaluación mediante densidad óptica sugiere que el digesto de AOVE actúa como un poderoso modulador del ecosistema materno. Para *A. muciniphila*, su crecimiento sostenido durante 48 horas evidencia una gran versatilidad metabólica. Al superar sistemáticamente al blanco, se confirma que esta bacteria es capaz de asimilar directamente los lípidos y compuestos fenólicos del aceite, más de allá de su clásico perfil mucolítico. Esto respalda la literatura que asocia el consumo de AOVE con la proliferación de esta especie y sus consiguientes beneficios metabólicos (D'Archivio et al., 2022; Farràs et al., 2020)

Por su parte, la dinámica de *C. minuta* apunta a una rápida asimilación inicial de los bioactivos a las 24 h, seguida de un declive a las 48 h. En una primera aproximación, esta caída podría sugerir un agotamiento acelerado de nutrientes o una autointoxicación por acidificación del medio y toxicidad de los fluidos de digestión. No obstante, estudios recientes (Sun et al., 2024) han demostrado que las cepas de *Christensenellaceae* exhiben una alta capacidad de adaptación al huésped, destacando por su notable tolerancia a la acidez (supervivencia a pH 2,0), y a la exposición biliar. De hecho, se ha descrito que estas bacterias son capaces de metabolizar los ácidos biliares primarios mediante reacciones de deshidrogenación, acilación, amidación e hidrólisis. A la luz de esta robustez fisiológica, hipotetizamos que el declive detectado a las 48 h podría no responder a una pérdida de viabilidad. Resulta plausible que la alta carga lipídica del AOVE induzca la formación de agregados celulares y micelas que interfieran con la medición espectrofotométrica en las fases tardías del cultivo, provocando un sesgo de lectura óptica.

Paradójicamente, esta misma naturaleza lipídica supuso una barrera metodológica crítica. Al intentar validar estas dinámicas por qPCR, se detectó una severa inhibición técnica. Sugerimos que los componentes del digesto oleoso combinados con el medio GAM podrían generar un secuestro físico del ADN o una inhibición directa de la polimerasa. Adicionalmente, durante la validación previa de las curvas patrón (ver Anexo 4), se observó que la eficiencia de los *primers* de *A. muciniphila* (*E* = 1,800) fue algo reducida en comparación con la obtenida para *C. minuta* (*E* = 1,97), aunque ambas presentaron un valor adecuado de R^2 (0,9926 y 0,9868, respectivamente). A pesar de estos valores, no fue posible extrapolar los datos de forma fiable para ninguna de las dos bacterias debido a interferencias producidas por la matriz del dAV, el medio o restos del mismo. Por consiguiente, aunque la biomasa sugiere un claro potencial prebiótico y protector del AOVE, los datos genómicos directos no son concluyentes. Para otorgar mayor seguridad a estos resultados, futuras replicaciones del experimento requerirán la implementación de protocolos exhaustivos de extracción y purificación del ADN total previos a la qPCR que eliminen cualquier rastro lipídico, o bien la adopción de técnicas alternativas independientes de la inhibición enzimática, como el recuento en placa optimizado o la secuenciación por metagenómica shotgun.

De forma global, aunque el desarrollo de estas comunidades sintéticas subraya la necesidad de evaluar los prebióticos en modelos interactivos, la extrapolación de este modelo in vitro presenta limitaciones inherentes. Para validar sólidamente estas dinámicas ecológicas, futuras investigaciones deberían abordar tres ejes metodológicos: (I) ejecutar los procedimientos dependientes de cultivo en anaerobiosis estricta para mitigar la inducción del estado VBNC por estrés oxidativo; (II) implementar protocolos exhaustivos de extracción de ADN para transicionar hacia plataformas de secuenciación masiva donde eludir la inhibición enzimática en matrices complejas como el AOVE; y (III) optimizar el diseño termodinámico de *primers* subóptimo e incrementar sistemáticamente el número de replicas biológicas. La superación paulatina de estos retos consolidará este modelo biotecnológico para el diseño de futuras intervenciones nutricionales de precisión.

7 Conclusiones.

♦ Los sistemas de comunidades sintéticas (SynComs) constituyen una herramienta útil para estudiar la utilización de sustratos y las interacciones entre microorganismos, permitiendo identificar diferencias entre el crecimiento en monocultivo y en comunidad bajo condiciones experimentales.

♦ En las condiciones evaluadas, *Lactobacillus rhamnosus* mostró una ventaja ecológica frente a *Escherichia coli*, compatible con su capacidad de acidificar el medio. Asimismo, *Bifidobacterium bifidum* fue la única cepa que presentó una ventaja competitiva clara en presencia de HMO respecto al resto de microorganismos estudiados.

♦ Los resultados obtenidos sugieren que *Akkermansia muciniphila* incrementa su crecimiento en entornos enriquecidos con aceite de oliva virgen extra (AOVE), aunque serán necesarios estudios adicionales para confirmar este efecto y determinar los mecanismos implicados.

♦ Cuando los cultivos se realizaron en medio MRS suplementado con sustratos de naturaleza glucídica, la qPCR directa a partir del cultivo, sin extracción previa de ADN, se mostró como una metodología válida para el seguimiento de la dinámica poblacional. En comparación, el recuento en placa requiere un mayor tiempo de procesamiento y mostró una mayor sensibilidad a variaciones técnicas.

♦ La presencia de AOVE introdujo limitaciones analíticas relevantes, ya que probablemente interfirió en las medidas de OD600 y afectó negativamente a la amplificación por qPCR. Estos resultados indican la necesidad de emplear metodologías alternativas o protocolos de preparación de muestra específicos para monitorizar comunidades microbianas en matrices lipídicas.

♦ En conjunto, este trabajo demuestra el potencial de las SynComs como plataforma experimental para estudiar la respuesta de microorganismos intestinales frente a distintos sustratos y pone de manifiesto la importancia de seleccionar metodologías analíticas adecuadas según la naturaleza de la matriz estudiada

8 Bibliografía.

Aggarwal, N., Kitano, S., Puah, G. R. Y., Kittelmann, S., Hwang, I. Y., & Chang, M. W. (2022). Microbiome and Human Health: Current Understanding, Engineering, and Enabling Technologies. *Chemical Reviews*, *123*(1), 31–72. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00431

Alsharairi, N. A. (2020). The Infant Gut Microbiota and Risk of Asthma: The Effect of Maternal Nutrition during Pregnancy and Lactation. *Microorganisms 2020, Vol. 8, Page 1119*, *8*(8), 1119. https://doi.org/10.3390/microorganisms8081119

Arboleya, S., Ang, L., Margolles, A., Yiyuan, L., Dongya, Z., Liang, X., Solís, G., Fernández, N., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Gueimonde, M. (2012). Deep 16S rRNA metagenomics and quantitative PCR analyses of the premature infant fecal microbiota. *Anaerobe*, *18*(3), 378–380. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.013

Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T., & McMurdo, M. E. T. (2004). Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(6), 3575. https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004

Bokulich, N. A., Chung, J., Battaglia, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., Lieber, A. D., Wu, F., Perez-Perez, G. I., Chen, Y., Schweizer, W., Zheng, X., Contreras, M., Dominguez-Bello, M. G., & Blaser, M. J. (2016). Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Science Translational Medicine*, *8*(343). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7121

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., … Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1

Canon, F., Nidelet, T., Guédon, E., Thierry, A., & Gagnaire, V. (2020). Understanding the Mechanisms of Positive Microbial Interactions That Benefit Lactic Acid Bacteria Co-cultures. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02088

Chen, C. C., Lai, C. C., Huang, H. L., Huang, W. Y., Toh, H. S., Weng, T. C., Chuang, Y. C., Lu, Y. C., & Tang, H. J. (2019). Antimicrobial Activity of Lactobacillus Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in Microbiology*, *10*(APR), 789. https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00789

Clark, R. L., Connors, B. M., Stevenson, D. M., Hromada, S. E., Hamilton, J. J., Amador-Noguez, D., & Venturelli, O. S. (2021). Design of synthetic human gut microbiome assembly and butyrate production. *Nature Communications*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-22938-y

Collado, M. C., Cernada, M., Baüerl, C., Vento, M., & Pérez-Martínez, G. (2012). Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes*, *3*(4), 352. https://doi.org/10.4161/GMIC.21215

Collado, M. C., Derrien, M., Isolauri, E., De Vos, W. M., & Salminen, S. (2007). Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(23), 7767–7770. https://doi.org/10.1128/AEM.01477-07;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER

Cortez-Ribeiro, A. C., Meireles, M., Ferro-Lebres, V., & Almeida-de-Souza, J. (2023). Olive oil consumption confers protective effects on maternal-fetal outcomes: A systematic review of the evidence. *Nutrition Research*, *110*(1), 87–95. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2022.12.013

D'Archivio, M., Santangelo, C., Silenzi, A., Scazzocchio, B., Varì, R., & Masella, R. (2022). Dietary EVOO Polyphenols and Gut Microbiota Interaction: Are There Any Sex/Gender Influences? *Antioxidants 2022, Vol. 11, Page 1744*, *11*(9), 1744. https://doi.org/10.3390/antiox11091744

De Keersmaecker, S. C. J., Verhoeven, T. L. A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., & Nagy, I. (2006). Strong antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus GG against Salmonella typhimurium is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiology Letters*, *259*(1), 89–96. https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2006.00250.X

Di Simone, N., Santamaria Ortiz, A., Specchia, M., Tersigni, C., Villa, P., Gasbarrini, A., Scambia, G., & D'Ippolito, S. (2020). Recent Insights on the Maternal Microbiota: Impact on Pregnancy Outcomes. *Frontiers in Immunology*, *11*, 528202. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.528202

Du, Y., He, C., An, Y., Huang, Y., Zhang, H., Fu, W., Wang, M., Shan, Z., Xie, J., Yang, Y., & Zhao, B. (2024). The Role of Short Chain Fatty Acids in Inflammation and Body Health. *International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 7379*, *25*(13), 7379. https://doi.org/10.3390/ijms25137379

Farràs, M., Martinez-Gili, L., Portune, K., Arranz, S., Frost, G., Tondo, M., & Blanco-Vaca, F. (2020). Modulation of the Gut Microbiota by Olive Oil Phenolic Compounds: Implications for Lipid Metabolism, Immune System, and Obesity. *Nutrients 2020, Vol. 12, Page 2200*, *12*(8), 2200. https://doi.org/10.3390/nu12082200

Ferretti, P., Pasolli, E., Tett, A., Asnicar, F., Gorfer, V., Fedi, S., Armanini, F., Truong, D. T., Manara, S., Zolfo, M., Beghini, F., Bertorelli, R., De Sanctis, V., Bariletti, I., Canto, R., Clementi, R., Cologna, M., Crifò, T., Cusumano, G., … Segata, N. (2018). Mother-to-Infant Microbial Transmission from Different Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome. *Cell Host and Microbe*, *24*(1), 133-145.e5. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.005

Gao, B., Zhong, M., Shen, Q., Wu, Y., Cao, M., Ju, S., & Chen, L. (2020). Gut microbiota in early pregnancy among women with Hyperglycaemia vs. Normal blood glucose. *BMC Pregnancy and Childbirth 2020 20:1*, *20*(1), 284-. https://doi.org/10.1186/S12884-020-02961-5

Ghaffar, T., Valeriani, F., & Romano Spica, V. (2025). The sex related differences in health and Disease: A systematic review of sex-specific gut microbiota and Possible implications for microbial pathogenesis. *Microbial Pathogenesis*, *209*, 108094. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.108094

Gholamipour-Shirazi, P., & Gholamipour-Shirazi, A. (2025). Infant gut microbiota and functional foods: Opportunities for early health intervention. *Clinical Nutrition ESPEN*, *70*, 516–526. https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2025.10.032

Giugliano, S., Gatti, A., Rusin, M., Schorn, T., Pimazzoni, S., Calanni-Pileri, M., Fraccascia, V., Carloni, S., & Rescigno, M. (2025). Maternal gut microbiota influences immune activation at the maternal-fetal interface affecting pregnancy outcome. *Nature Communications 2025 16:1*, *16*(1), 4326-. https://doi.org/10.1038/s41467-025-58533-8

Gonzalez-Garcia, J., Delgado-Villalobos, A., Hernandez-Ruiz, G., Díaz-Torres, O., García-Cayuela, T., Gradilla-Hernández, M. S., González-Avila, M., Gómez-Sandoval, J. R., Rodríguez-Montaño, R., Bayardo-González, R. A., & García-Gamboa, R. (2025). Synthetic microbial communities as novel models to study gut microbiome–host interactions in metabolic diseases. *Discover Endocrinology and Metabolism*, *1*(1). https://doi.org/10.1007/s44417-025-00012-1

Grice, E. A., & Segre, J. A. (2012). The human microbiome: Our second genome. In *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (Vol. 13, pp. 151–170). https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814

Honda, K., & Littman, D. R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. In *Nature* (Vol. 535, Number 7610, pp. 75–84). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nature18848

Hong, W., Rao, F. qin, Zhao, X. xing, Guo, Z. Y., Chen, Y. mei, Wang, B., Guan, Z. zhong, & Qi, X. lan. (2021). An inexpensive anaerobic chamber for the genetic manipulation of strictly anaerobic bacteria. *Anaerobe*, *69*, 102349. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102349

Hu, M., Li, M., Li, C., Miao, M., & Zhang, T. (2023). Effects of Human Milk Oligosaccharides in Infant Health Based on Gut Microbiota Alteration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*(2), 994–1001. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05734

Ioannou, A., Berkhout, M. D., Scott, W. T., Blijenberg, B., Boeren, S., Mank, M., Knol, J., & Belzer, C. (2024). Resource sharing of an infant gut microbiota synthetic community in combinations of human milk oligosaccharides. *The ISME Journal*, *18*(1), wrae209. https://doi.org/10.1093/ISMEJO/WRAE209

Ismael, M., Huang, M., & Zhong, Q. (2024). The Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria and the Promising Applications in Promoting Gastrointestinal Health. *Foods*, *13*(23), 3887. https://doi.org/10.3390/FOODS13233887

Jin, J., Gao, L., Zou, X., Zhang, Y., Zheng, Z., Zhang, X., Li, J., Tian, Z., Wang, X., Gu, J., Zhang, C., Wu, T., Wang, Z., & Zhang, Q. (2022). Gut Dysbiosis Promotes Preeclampsia by Regulating Macrophages and Trophoblasts. *Circulation Research*, *131*(6), 492–506. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.320771

Kandari, A., Odat, M. Al, Alzaid, F., & Scott, K. P. (2024). Biotics and bacterial function: impact on gut and host health. In *ISME Journal* (Vol. 18, Number 1). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/ismejo/wrae226

Laursen, M. F., & Roager, H. M. (2023). Human milk oligosaccharides modify the strength of priority effects in the *Bifidobacterium* community assembly during infancy. *The ISME Journal 2023 17:12*, *17*(12), 2452–2457. https://doi.org/10.1038/s41396-023-01525-7

Lawson, M. A. E., O'Neill, I. J., Kujawska, M., Gowrinadh Javvadi, S., Wijeyesekera, A., Flegg, Z., Chalklen, L., & Hall, L. J. (2019). Breast milk-derived human milk oligosaccharides promote *Bifidobacterium* interactions within a single ecosystem. *The ISME Journal*, *14*(2), 635. https://doi.org/10.1038/S41396-019-0553-2

Li, Z., Zhang, Y., Wang, L., Deng, T. K., Chiu, W. H., Ming, W. kit, Xu, C., & Xiao, X. (2024). Microbiota of pregnancy, placenta and newborns in the third trimester: A randomized controlled study. *Heliyon*, *10*(3), e24698. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24698

Liu, L., Yin, T., Zhang, X., Sun, L., & Yin, Y. (2024). Temporal and Spatial Variation of the Human Placental Microbiota During Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, *92*(6), e70023. https://doi.org/10.1111/aji.70023

Liu, X., Zeng, X., Li, X., Xin, S., Zhang, F., Liu, F., Zeng, Y., Wu, J., Zou, Y., & Xiong, X. (2024). Landscapes of gut bacterial and fecal metabolic signatures and their relationship in severe preeclampsia. *Journal of Translational Medicine 2024 22:1*, *22*(1), 360-. https://doi.org/10.1186/s12967-024-05143-5

Lordan, C., Roche, A. K., Delsing, D., Nauta, A., Groeneveld, A., MacSharry, J., Cotter, P. D., & van Sinderen, D. (2024). Linking human milk oligosaccharide metabolism and early life gut microbiota: bifidobacteria and beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *88*(1), e00094-23. https://doi.org/10.1128/MMBR.00094-23

Lou, Y. C., Rubin, B. E., Schoelmerich, M. C., DiMarco, K. S., Borges, A. L., Rovinsky, R., Song, L., Doudna, J. A., & Banfield, J. F. (2023). Infant microbiome cultivation and metagenomic analysis reveal *Bifidobacterium* 2'-fucosyllactose utilization can be facilitated by coexisting species. *Nature Communications 2023 14:1*, *14*(1), 7417-. https://doi.org/10.1038/s41467-023-43279-y

Manos, J. (2022). The human microbiome in disease and pathology. In *APMIS* (Vol. 130, Number 12, pp. 690–705). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1111/apm.13225

Mathipa-Mdakane, M. G., & Thantsha, M. S. (2022). *Lacticaseibacillus rhamnosus*: A Suitable Candidate for the Construction of Novel Bioengineered Probiotic Strains for Targeted Pathogen Control. *Foods*, *11*(6), 785. https://doi.org/10.3390/FOODS11060785

Meijer, S., Pasquinelli, E., Renzi, S., Lavasani, S., Nouri, M., Erlandsson, L., Cavalieri, D., & Hansson, S. R. (2023). Gut Micro- and Mycobiota in Preeclampsia: Bacterial Composition Differences Suggest Role in Pathophysiology. *Biomolecules*, *13*(2), 346. https://doi.org/10.3390/biom13020346

Michels, N., Zouiouich, S., Vanderbauwhede, B., Vanacker, J., Indave Ruiz, B. I., & Huybrechts, I. (2022). Human microbiome and metabolic health: An overview of systematic reviews. In *Obesity Reviews* (Vol. 23, Number 4). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1111/obr.13409

Mirpuri, J. (2020). Evidence for maternal diet-mediated effects on the offspring microbiome and immunity: implications for public health initiatives. *Pediatric Research 2020 89:2*, *89*(2), 301–306. https://doi.org/10.1038/s41390-020-01121-x

Müller, P., de la Cuesta-Zuluaga, J., Kuhn, M., Baghai Arassi, M., Treis, T., Blasche, S., Zimmermann, M., Bork, P., Patil, K. R., Typas, A., Garcia-Santamarina, S., & Maier, L. (2024). High-throughput anaerobic screening for identifying compounds acting against gut bacteria in monocultures or communities. *Nature Protocols*, *19*(3), 668–699. https://doi.org/10.1038/s41596-023-00926-4

Pan, N., Su, X., Meng, Y., Liang, Y., Chen, X., Zhang, H., & Wang, X. (2026). Gut microbiota-driven IL-17A production by hepatic γδ T cells enhances neutrophil defense against systemic Staphylococcus aureus infection. *Virulence*, *17*(1). https://doi.org/10.1080/21505594.2026.2629132

Panthee, B., Gyawali, S., Panthee, P., & Techato, K. (2022). Environmental and Human Microbiome for Health. In *Life* (Vol. 12, Number 3). MDPI. https://doi.org/10.3390/life12030456

Pathak, S., Kesavan, P., Banerjee, A., Banerjee, A., Celep, G. S., Bissi, L., & Marotta, F. (2018). Metabolism of dietary polyphenols by human gut microbiota and their health benefits. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (pp. 347–359). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00025-8

Pröschle-Donoso, T., Díaz, R., Vásquez-Dean, J., Serebrinsky-Duek, K., Pezoa-Soto, I., Martin, A. J. M., & Garrido, D. (2025a). Emergent roles of infant gut microbes during the utilization of human milk oligosaccharides. *Npj Biofilms and Microbiomes 2025 11:1*, *11*(1), 233-. https://doi.org/10.1038/s41522-025-00865-w

Rinne, M. M., Gueimonde, M., Kalliomäki, M., Hoppu, U., Salminen, S. J., & Isolauri, E. (2005). Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *43*(1), 59–65. https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.07.005

Robertson, R. C., Manges, A. R., Finlay, B. B., & Prendergast, A. J. (2019). The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. *Trends in Microbiology*, *27*(2), 131–147. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.008

Ross, F. C., Patangia, D., Grimaud, G., Lavelle, A., Dempsey, E. M., Ross, R. P., & Stanton, C. (2024). The interplay between diet and the gut microbiome: implications for health and disease. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 22, Number 11, pp. 671–686). Nature Research. https://doi.org/10.1038/s41579-024-01068-4

Samarra, A., Renwick, S., Arzamasov, A. A., Rodionov, D. A., Spann, K., Cabrera-Rubio, R., Acuna-Gonzalez, A., Martínez-Costa, C., Hall, L., Segata, N., Osterman, A. L., Bode, L., & Collado, Mc. (2025). Human milk oligosaccharide metabolism and antibiotic resistance in early gut colonizers: insights from bifidobacteria and lactobacilli in the maternal-infant microbiome. *Gut Microbes*, *17*(1), 2501192. https://doi.org/10.1080/19490976.2025.2501192

Seki, D., Pollak, S., Kujawska, M., Kiu, R., Acuna-Gonzalez, A., Crouch, L. I., Bakshani, C. R., Chivers, P. T., Mommers, M., van Best, N., Penders, J., & Hall, L. J. (2026). Human milk oligosaccharide mediates mutualism between *Escherichia coli* and *Bifidobacterium bifidum. Nature Communications*, *17*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-026-71764-7

Selma-Royo, M., Dubois, L., Manara, S., Armanini, F., Cabrera-Rubio, R., Valles-Colomer, M., González, S., Parra-Llorca, A., Escuriet, R., Bode, L., Martínez-Costa, C., Segata, N., & Collado, M. C. (2024). Birthmode and environment-dependent microbiota transmission dynamics are complemented by breastfeeding during the first year. *Cell Host & Microbe*, *32*(6), 996-1010.e4. https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.05.005

Siedler, S., Rau, M. H., Bidstrup, S., Vento, J. M., Aunsbjerg, S. D., Bosma, E. F., Mcnair, L. M., Beisel, C. L., & Neves, A. R. (2020). Competitive Exclusion Is a Major Bioprotective Mechanism of Lactobacilli against Fungal Spoilage in Fermented Milk Products. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(7), e02312-19. https://doi.org/10.1128/AEM.02312-19

Song, S. J., Wang, J., Martino, C., Jiang, L., Thompson, W. K., Shenhav, L., McDonald, D., Marotz, C., Harris, P. R., Hernandez, C. D., Henderson, N., Ackley, E., Nardella, D., Gillihan, C., Montacuti, V., Schweizer, W., Jay, M., Combellick, J., Sun, H., … Dominguez-Bello, M. G. (2021). Naturalization of the microbiota developmental trajectory of Cesarean-born neonates after vaginal seeding. *Med*, *2*(8), 951-964.e5. https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.05.003

Suárez-Martínez, C., Santaella-Pascual, M., Yagüe-Guirao, G., & Martínez-Graciá, C. (2023). Infant gut microbiota colonization: influence of prenatal and postnatal factors, focusing on diet. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1236254. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236254

Suissa, R., Olender, T., Malitsky, S., Golani, O., Turjeman, S., Koren, O., Meijler, M. M., & Kolodkin-Gal, I. (2023). Metabolic inputs in the probiotic bacterium *Lacticaseibacillus rhamnosus* contribute to cell-wall remodeling and increased fitness. *Npj Biofilms and Microbiomes 2023 9:1*, *9*(1), 71-. https://doi.org/10.1038/s41522-023-00431-2

Sun, X. W., Huang, H. J., Wang, X. M., Wei, R. Q., Niu, H. Y., Chen, H. Y., Luo, M., Abdugheni, R., Wang, Y. L., Liu, F. L., Jiang, H., Liu, C., & Liu, S. J. (2024). Christensenella strain resources, genomic/metabolomic profiling, and association with host at species level. *Gut Microbes*, *16*(1). https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2347725

Suokko, A., Savijoki, K., Malinen, E., Palva, A., & Varmanen, P. (2005). Characterization of a Mobile clpL Gene from Lactobacillus rhamnosus. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(4), 2061. https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2061-2069.2005

Taylor, R., Keane, D., Borrego, P., & Arcaro, K. (2023). Effect of Maternal Diet on Maternal Milk and Breastfed Infant Gut Microbiomes: A Scoping Review. *Nutrients 2023, Vol. 15, Page 1420*, *15*(6), 1420. https://doi.org/10.3390/nu15061420

Taylor, W., Bohm, K., Dyet, K., Weaver, L., & Pattis, I. (2025). Comparative analysis of qPCR and metagenomics for detecting antimicrobial resistance in wastewater: a case study. *BMC Research Notes 2024 18:1*, *18*(1), 5-. https://doi.org/10.1186/s13104-024-07027-9

Thorburn, A. N., McKenzie, C. I., Shen, S., Stanley, D., Macia, L., Mason, L. J., Roberts, L. K., Wong, C. H. Y., Shim, R., Robert, R., Chevalier, N., Tan, J. K., Marinõ, E., Moore, R. J., Wong, L., McConville, M. J., Tull, D. L., Wood, L. G., Murphy, V. E., … MacKay, C. R. (2015). Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nature Communications 2015 6:1*, *6*(1), 7320-. https://doi.org/10.1038/ncomms8320

Torres-Torres, J., Espino-y-Sosa, S., Martinez-Portilla, R., Borboa-Olivares, H., Estrada-Gutierrez, G., Acevedo-Gallegos, S., Ruiz-Ramirez, E., Velasco-Espin, M., Cerda-Flores, P., Ramirez-Gonzalez, A., & Rojas-Zepeda, L. (2024). A Narrative Review on the Pathophysiology of Preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(14), 7569. https://doi.org/10.3390/ijms25147569

Van Leeuwen, P. T., Brul, S., Zhang, J., & Wortel, M. T. (2023). Synthetic microbial communities (SynComs) of the human gut: design, assembly, and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, *47*(2). https://doi.org/10.1093/femsre/fuad012

Vera-Ponce, V. J., Loayza-Castro, J. A., Ballena-Caicedo, J., Valladolid-Sandoval, L. A. M., Zuzunaga-Montoya, F. E., & Gutierrez De Carrillo, C. I. (2025). Global prevalence of preeclampsia, eclampsia, and HELLP syndrome: a systematic review and meta-analysis. In *Frontiers in Reproductive Health* (Vol. 7). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/frph.2025.1706009

Xie, Z., Chen, Z., Chai, Y., Yao, W., & Ma, G. (2025). Unveiling the placental bacterial microbiota: implications for maternal and infant health. *Frontiers in Physiology*, *16*, 1544216. https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1544216

9 Anexos.

Anexo 1. Material fungible, medios de cultivo, reactivos y equipos utilizados.

Tabla A1.1. Medios de cultivo, suplementos y reactivos utilizados.

Material	Marca	Referencia.
BrillianceTM *E. coli*/Coliform selective medium	OXOID	CM1046
DifcoTM Lactobacilli MRS Broth	Becton Dickinson	288130
Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)	Condalab	1400
European Bacteriological Agar	Condalab	A02726
Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma Aldrich	SLCN8514
Glicerol	PanReac Applichem	131339.1211
Etanol absoluto.	Scharlau	ET00021000
L-Cisteina monohidrato clorhidrato	ThermoScientific	J14035
Vit K1	Sigma Aldrich	V3501
Hemina	Thermo Scientific	A11165.03
Glucosa	Sigma Aldrich	G7021.1KG
2'-Fucosilactosa (2'-FL HMO)	Glycare	20156002
Tetracilina clorhidrato	Sigma Aldrich	T7660
Escalera de ADN Plus de 100 pb GeneRuler	ThermoScientific	SM0321
Tinte de gel ADN (SYBR Safe)	Invitrogen	S33102
Kits de ensayos de ADNds Qubit™	ThermoScientific.	Q32854A
Mezcla maestra DreamTaq (2X)	ThermoScientific.	11896833
Mezcla maestra qPCR SYBR™ Green	ThermoScientific.	
Pepsina	Sigma Aldrich	P7012
Lipasa gástrica	Sigma Aldrich	L3126
Pancreatina	Sigma Aldrich	P1750
Sales biliares	Sigma Aldrich	B3883
MagBio	Magtivio	MDKT00010075
Agarosa	Uvat bio	R-0800-01
GAM	HyServe	1005422-001
Mucina	Sigma Aldrich	M2378
Celobiosa	Sigma Aldrich	22150
Maltosa	Duchefa Biochemie	M0811
Almidón	Labbox	STAR-00A-500

Tabla A1.2. Reactivos utilizados en la digestión in vitro de AOVE.

Material	Marca	Referencia.
HCl	Panreac	131020
Cloruro de calcio ($CaCl_2$)	Sigma Aldrich	449709
Cloruro de potasio (KCl)	Sigma Aldrich	P9541
Dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO4)	Duchefa	P0574
Hidrogeno carbonato de sodio ($NaHCO_3$)	Labbox	SOHC-00A
Cloruro de magnesio hexahydrate ($MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$)	Sigma Aldrich	M2393
Carbonato de amonio ($(NH4)_2CO_3$)	Sigma Aldrich	207861
Hidróxido de Sodio (NaOH)	Panreac	181691.1211
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma Aldrich	S9888
PMSF	Sigma Aldrich	P7626

Tabla A1.3. Material y equipos utilizados.

Material/Equipo	Marca	Referencia.
Filtros 0,22 μm	Branchia	SFPE 122-100
Puntas 1000 filtro	DeckWorks	CLS4140
Puntas 200 filtro	DeckWorks	CLS4121
Puntas 10 filtro	DeckWorks	CLS4110
Cubetas	Sigma Aldrich	C5416
Eppendorfs 1,5	Sigma Aldrich	HS4325
Pipeta 1000	Sigma Aldrich	EP3124000121-1EA
Pipeta 200	Sigma Aldrich	EP3124000083-1EA
Pipeta 100	Sigma Aldrich	EP3124000075-1EA
Pipeta 10	Sigma Aldrich	EP3124000024-1EA
Asas de siembra	Sigma Aldrich	I7523-1000EA
Perlas de vidrio	Labbox	BEAD-002-1K0
Placas multipocillo	DeltasLab	900011
Placas multipocillo fondo profundo	Axygen	P-2ML-SQ-C
Placas petri	Sigma Aldrich	P5731-500EA

Sobres anaerobiosis 2,5	ThermoScientific	AN0025A
Jeringas 5 ml	FisherScientific	14955452
Termociclador qPCR	Roche	LightCycler® 480 II (descatalogado)
Termociclador PCR	Bio-Rad	T100
Qubit	Invitrogen	Q32854A
Centrifuga	Sigma Aldrich	AXY60105021
Vortex	Sigma Aldrich	CLS6777
Estufa	ThermoScientific	66475
Agitador magnético con calefacción	Labbox	STIH-020-001
Cabina bioseguridad II	Telstar	
Cabina de anaerobiosis	Don Whitley Scientific	Whitley A25
Jarras de anaerobiosis	Becton Dickinson	BD GsPak EZ
Cabina PCR	Biosan	UVC/T-AR
Espectrofotómetro	Labbox	SPTR-V01-001

Anexo 2. Esquemas de protocolos ejecutados.

Figura A2.1. Esquema representativo del procedimiento de digestión in vitro del AOVE

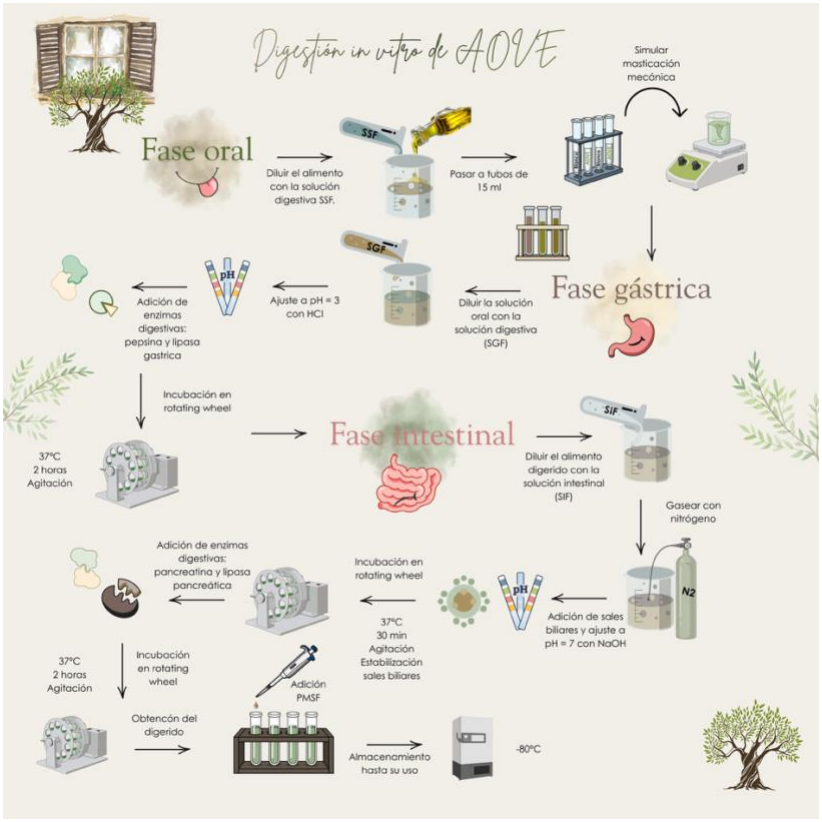
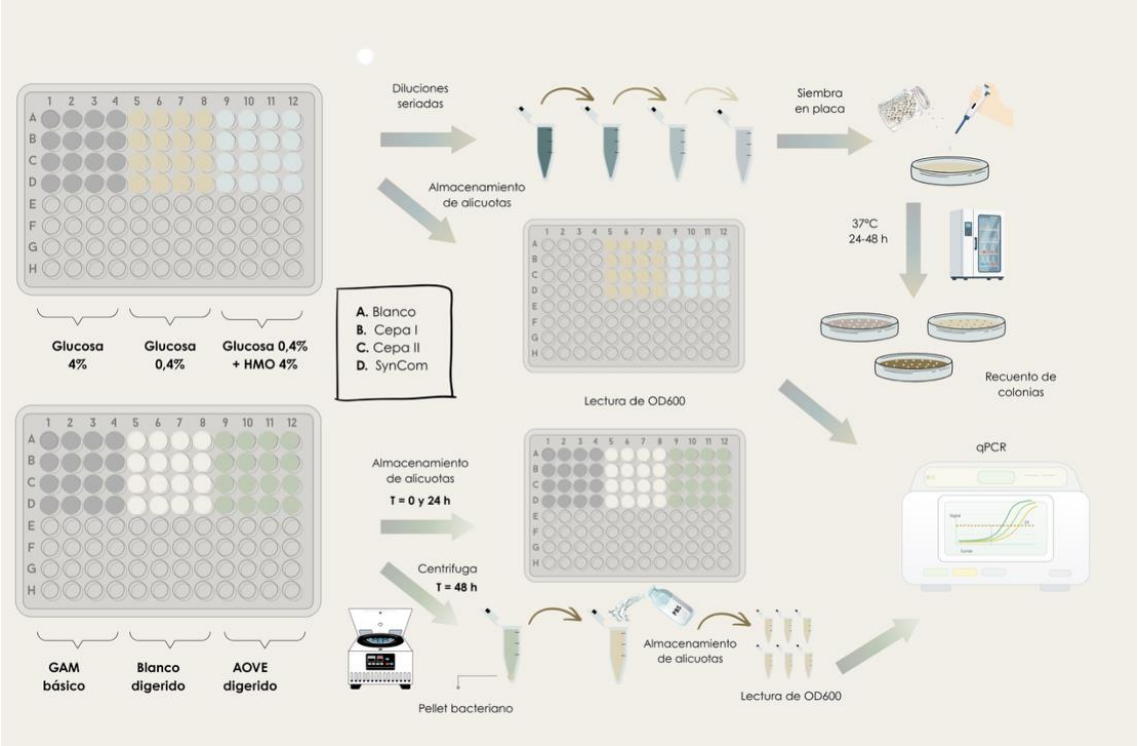


Figura A2.2. Esquema representativo del procedimiento general de los ensayos SyHO y SyAO.



Anexo 3. *Primers.*

Tabla A3.1. *Primers* empleados con sus respectivas secuencias.

Microorganismo diana	Gen diana	Nombre	Secuencia (5'→ 3')	Anneling (ºC)	Referencia
Escherichia coli	Fragmento del16S rRNA	Enterobac_F	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	63	(Bartosch et al., 2004)
		Enterobac_R	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC		
Bifidobacterium bifidum	Fragmento del16S rRNA	Bifi_F	TGACCGACCTGCCCCATGCT	61	(Rinne et al., 2005)
		Bifi_R	CCCATCCCACGCCGATAGAAT		
Bifidobacterium breve	Fragmento del16S rRNA	Breve__F	AATGCCGGATGCTCCATCACAC	62	(Rinne et al., 2005)
		Breve_R	GCCTTGCTCCCTAACAAAAGAGG		
Bifidobacterium genus.	Fragmento del16S rRNA	Bifi_genus_F	GGGTGGTAATGCCGGATG	62	(Bartosch et al., 2004)
		Bifi_genus_R	TAAGCCATGGACTTTCACACC		
Lacticaseibacillus rhamnosus	Fragmento del16S rRNA	Lacto_F	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	58	(Suokko et al., 2005)
		Lacto_R	CACCGCTACACATGGAG		
Akkermansia muciniphila	Fragmento del16S rRNA	Akker_F	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	59	(Collado et al., 2007)
			CAGCACGTGAAGGTGGGGAC		

		Akker_R			
Chrystensenella minuta	Fragmento del16S rRNA	C.minuta_F C.minuta_R	GCTCTTTGTGAATCCCTCGG TCAGTTCGGCTACCCATCGT	55	(Sun et al., 2024)

Anexo 4. Estandarización y parámetros de amplificación molecular.

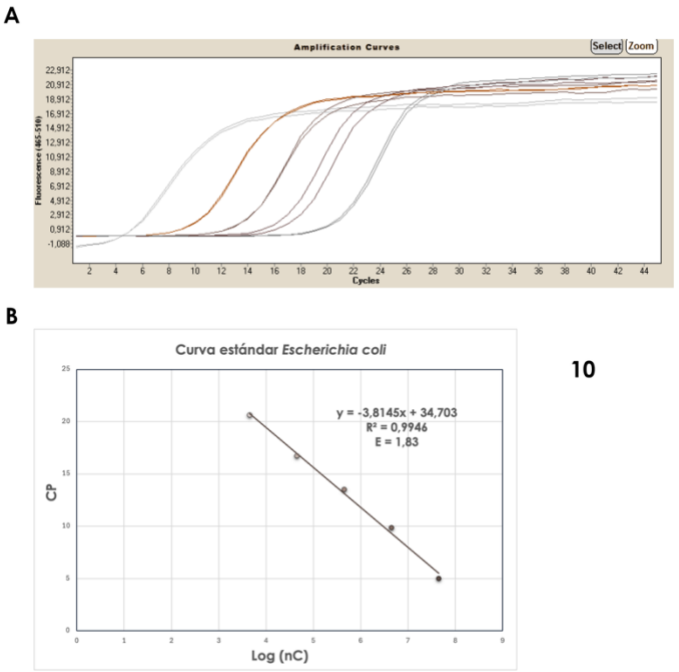


Figura A4.1. Validación de la amplificación genómica para *Escherichia coli*. (A) Curvas de amplificación generadas a partir de diluciones seriadas decimales monitorizadas mediante fluorescencia, señalando la eficiencia (E = 1,83). (B) Curva patrón linealizada, detallando el coeficiente de determinación (R^2 = 0,9946) y la ecuación de la recta representativa de la reacción.

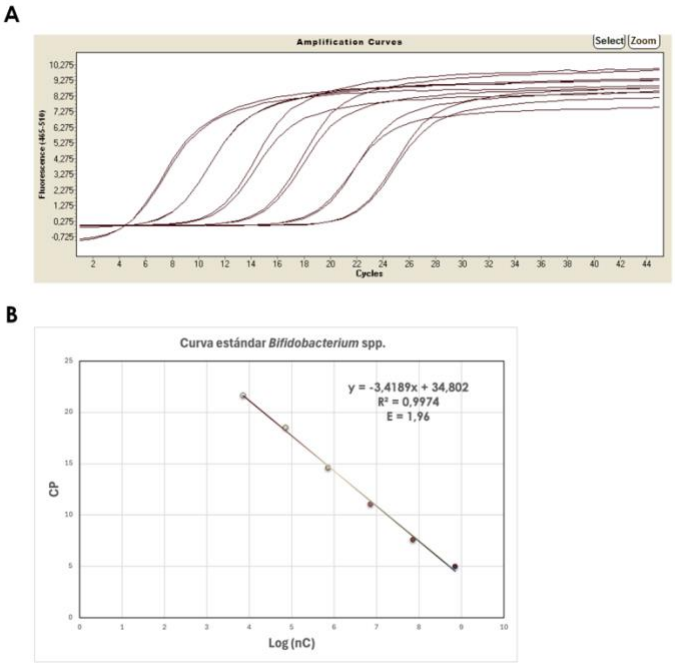


Figura A4.2. Validación de la amplificación genómica para *Bifidobacterium* spp. (A) Curvas de amplificación generadas a partir de diluciones seriadas decimales monitorizadas mediante fluorescencia, señalando la eficiencia (E = 1,96). (B) Curva patrón linealizada, detallando el coeficiente de determinación (R^2 = 0,9974) y la ecuación de la recta representativa de la reacción.

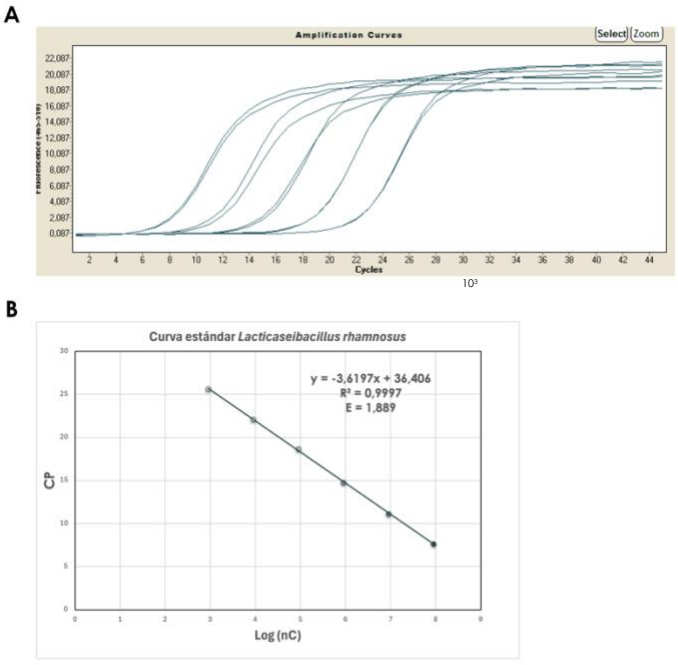


Figura A4.3. Validación de la amplificación genómica para *Lacticaseibacillus rhamnosus* (A) Curvas de amplificación generadas a partir de diluciones seriadas decimales monitorizadas mediante fluorescencia, señalando la eficiencia (E = 1,889). (B) Curva patrón linealizada, detallando el coeficiente de determinación (R^2 = 0,9997) y la ecuación de la recta representativa de la reacción.

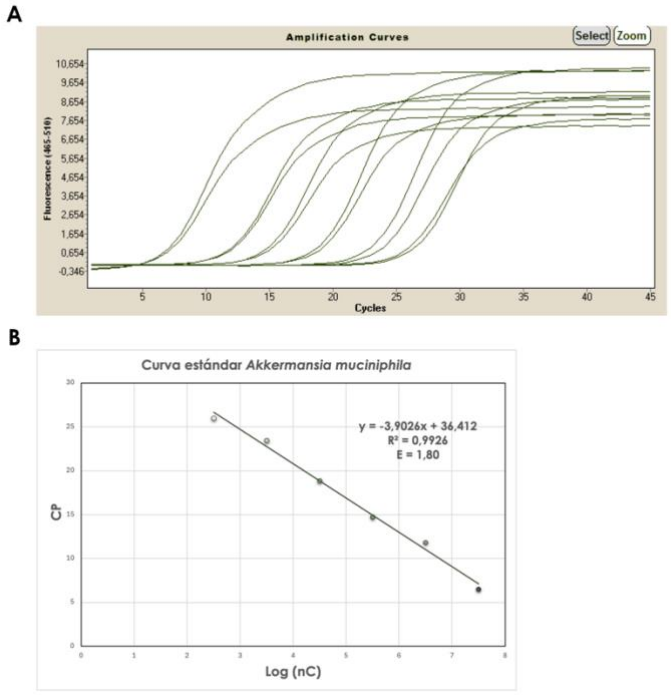


Figura A4.4. Validación de la amplificación genómica para *Akkermansia muciniphila.*(A) Curvas de amplificación generadas a partir de diluciones seriadas decimales monitorizadas mediante fluorescencia, señalando la eficiencia (E = 1,80). (B) Curva patrón linealizada, detallando el coeficiente de determinación (R^2 = 0,9926) y la ecuación de la recta representativa de la reacción.

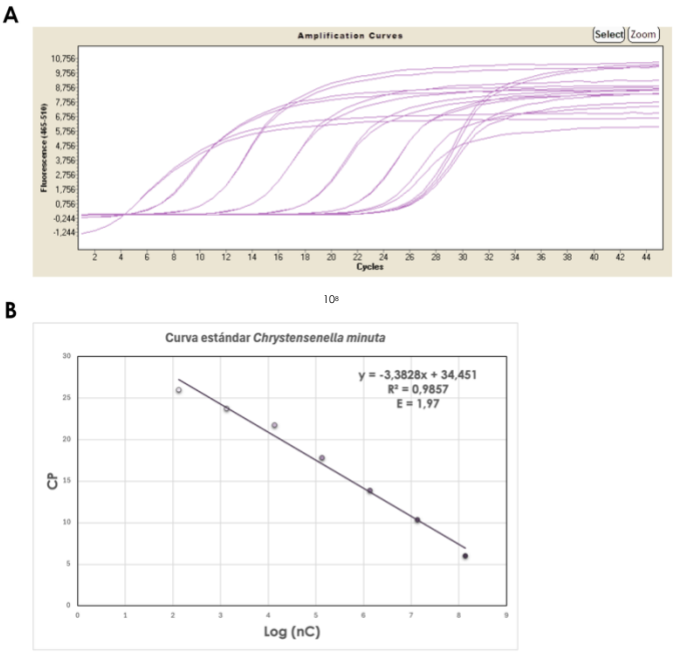
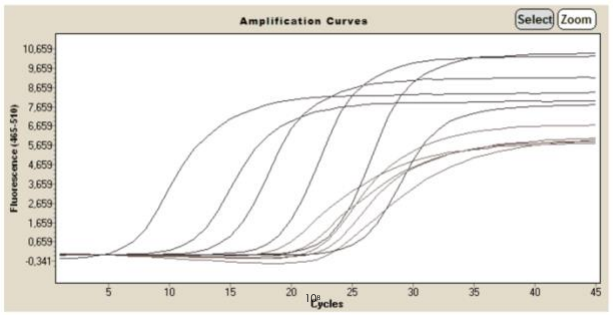


Figura A4.5. Validación de la amplificación genómica para *Christensenella minuta.* (A) Curvas de amplificación generadas a partir de diluciones seriadas decimales monitorizadas mediante fluorescencia, señalando la eficiencia (E = 1,97). (B) Curva patrón linealizada, detallando el coeficiente de determinación (R^2 = 0,9857) y la ecuación de la recta representativa de la reacción.

A



B

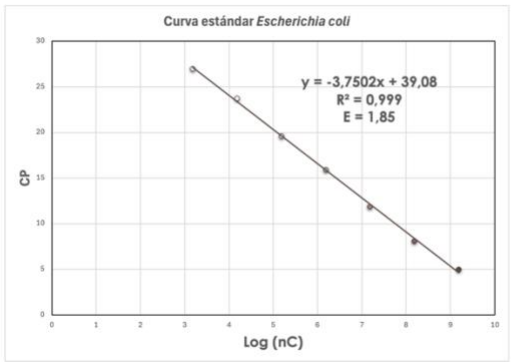
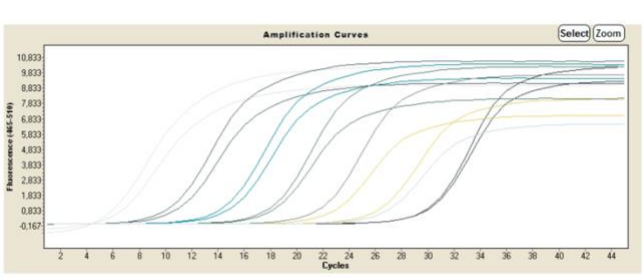


Figura A4.6. Validación de la amplificación genómica para *Escherichia coli (SynCom IV)*. (A) Curvas de amplificación generadas a partir de diluciones seriadas decimales monitorizadas mediante fluorescencia, señalando la eficiencia (E = 1,85). (B) Curva patrón linealizada, detallando el coeficiente de determinación (R^2 = 0,999) y la ecuación de la recta representativa de la reacción.

A



B

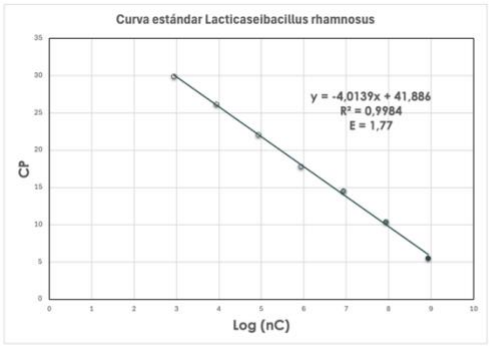
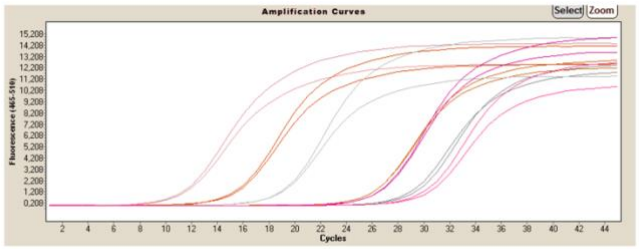


Figura A4.7. Validación de la amplificación genómica para *Lacticaseibacillus rhamnosus (SynCom IV)*. (A) Curvas de amplificación generadas a partir de diluciones seriadas decimales monitorizadas mediante fluorescencia, señalando la eficiencia (E = 1,77). (B) Curva patrón linealizada, detallando el coeficiente de determinación (R^2 = 0,9984) y la ecuación de la recta representativa de la reacción.

A



B

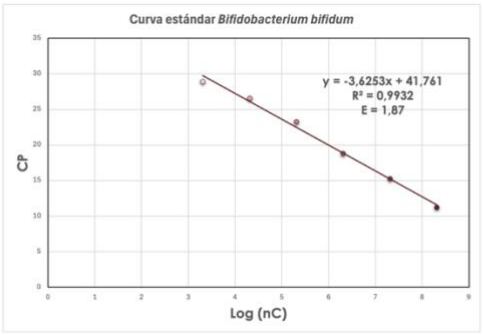
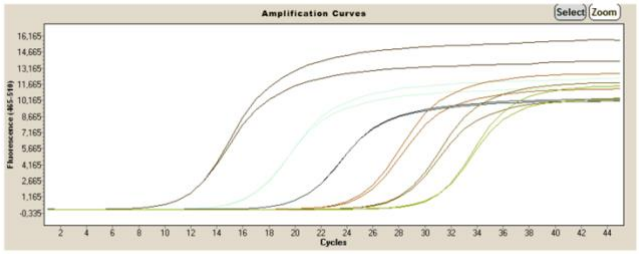


Figura A4.8. Validación de la amplificación genómica para *Bifidobacterium bifidum (SynCom IV)*. (A) Curvas de amplificación generadas a partir de diluciones seriadas decimales monitorizadas mediante fluorescencia, señalando la eficiencia (E = 1,87). (B) Curva patrón linealizada, detallando el coeficiente de determinación (R^2 = 0,9932) y la ecuación de la recta representativa de la reacción.

A



B

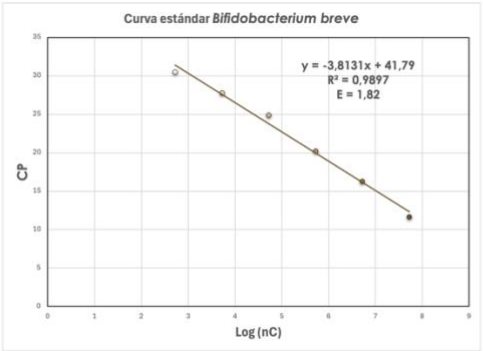


Figura A4.9. Validación de la amplificación genómica para *Bifidobacterium breve (SynCom IV)*. (A) Curvas de amplificación generadas a partir de diluciones seriadas decimales monitorizadas mediante fluorescencia, señalando la eficiencia (E = 1,82). (B) Curva patrón linealizada, detallando el coeficiente de determinación (R^2 = 0,9897) y la ecuación de la recta representativa de la reacción.

Anexo 5. Datos brutos de recuento bacteriano.

Tabla A5.1. Datos brutos de recuentos de viabilidad celular (UFC/mL) de cultivos individuales (*E. coli, L. rhamnosus*) y su SynCom III (Mix BHI, Mix MRS) a las 0 y 24 horas de incubación. Se detallan las diluciones analizadas, el número de colonias contadas por triplicado biológico, y la viabilidad final calculada para las condiciones control y suplementadas con HMOs (HMO+)

Tiempo	Bacterias	Condición	Replica	Dilución analizada	UFC contadas	Viabilidad (UFC/mL)
0 h	*E. coli*	HMO +	I	10^-3	353	7,06E+06
			II	10^-3	240	4,80E+06
			III	10^-3	315	6,30E+06
		Control	I	10^-3	105	2,10E+06
			II	10^-3	112	2,24E+06
			III	10^-3	86	1,72E+06
	L. rhamnosus	HMO +	I	10^-4	44	8,80E+06
			II	10^-4	36	7,20E+06
			III	10^-3	319	6,38E+06
		Control	I	10^-3	245	4,90E+06
			II	10^-4	28	5,60E+06
			III	10^-3	332	6,64E+06
	Mix BHI	HMO +	I	10^-3	192	3,84E+06
			II	10^-3	160	3,20E+06
			III	10^-3	130	2,60E+06
		Control	I	10^-3	100	2,00E+06
			II	10^-3	69	1,38E+06
			III	10^-3	108	2,16E+06
	Mix MRS	HMO +	I	10^-3	235	4,70E+06
			II	10^-3	127	2,54E+06
			III	10^-3	157	3,14E+06
		Control	I	10^-3	180	3,60E+06
			II	10^-3	107	2,14E+06
			III	10^-3	234	4,68E+06
24 h	*E. coli*	HMO +	I	10^-5	137	2,74E+08
			II	10^-5	196	3,92E+08
			III	10^-5	122	2,44E+08
		Control	I	10^-5	73	1,46E+08
			II	10^-5	43	8,60E+07
			III	10^-5	118	2,36E+08
	L. rhamnosus	HMO +	I	10^-5	243	4,86E+08
			II	10^-5	104	2,08E+08
			III	10^-6	38	7,60E+08
		Control	I	10^-5	158	3,16E+08
			II	10^-5	349	6,98E+08
			III	10^-6	35	7,00E+08
	Mix BHI	HMO +	I	10^-5	9	1,80E+07
			II	10^-5	16	3,20E+07
			III	10^-5	12	2,40E+07
		Control	I	10^-5	28	5,60E+07
			II	10^-5	39	7,80E+07
			III	10^-5	30	6,00E+07
	Mix MRS	HMO +	I	10^-5	106	2,12E+08
			II	10^-5	116	2,32E+08
			III	10^-5	101	2,02E+08
		Control	I	10^-5	312	6,24E+08
			II	10^-5	277	5,54E+08
			III	10^-5	169	3,38E+08

Nota: Los datos representan las diluciones definitivas tras el cribado de resultados. Se conservaron las placas con valores inferiores a 30 o superiores a 300 colonias en aquellos casos donde no se disponía de diluciones alternativas, con el fin de mantener la representatividad de las réplicas biológicas.

Tabla A5.2. Datos brutos de recuentos de viabilidad celular (UFC/mL) de cultivos individuales (*E. coli*,*B. bifidum*) y su SynCom I (Mix BHI, Mix MRS) a las 0 y 24 horas de incubación. Se detallan las diluciones analizadas, el número de colonias contadas por triplicado biológico, y la viabilidad final calculada para las condiciones control y suplementadas con HMOs (HMO+)

Tiempo	Bacterias	Condición	Replica	Dilución analizada	UFC contadas	Viabilidad (UFC/mL)
0 h	*E. coli*	HMO +	I	10^-3	189	3,78E+06
			II	10^-3	281	5,62E+06
			III	10^-3	19	3,80E+05
		Control	I	10^-3	99	1,98E+06
			II	10^-3	126	2,52E+06
			III	10^-3	17	3,40E+05
	B. bifidum	HMO +	I	10^-3	74	1,48E+06
			II	10^-3	208	4,16E+06
			III	10^-3	225	4,50E+06
		Control	I	10^-3	59	1,18E+06
			II	10^-3	78	1,56E+06
			III	10^-3	34	6,80E+05
	Mix BHI	HMO +	I	10^-3	83	1,66E+06
			II	10^-3	98	1,96E+06
			III	10^-3	66	1,32E+06
		Control	I	10^-3	135	2,70E+06
			II	10^-3	105	2,10E+06
			III	10^-3	85	1,70E+06
	Mix MRS	HMO +	I	10^-3	58	1,16E+06
			II	10^-3	95	1,90E+06
			III	10^-3	194	3,88E+06
		Control	I	10^-3	95	1,90E+06
			II	10^-3	87	1,74E+06
			III	10^-3	86	1,72E+06
24 h	*E. coli*	HMO +	I	10^-5	93	1,86E+08
			II	10^-5	143	2,86E+08
			III	10^-5	77	1,54E+08
		Control	I	10^-5	50	1,00E+08
			II	10^-5	67	1,34E+08
			III	10^-5	41	8,20E+07
	B. bifidum	HMO +	I	10^-4	5	1,00E+06
			II	10^-4	19	3,80E+06
			III	10^-4	5	1,00E+06
		Control	I	10^-4	176	3,52E+07
			II	10^-4	228	4,56E+07
			III	10^-4	201	4,02E+07
	Mix BHI	HMO +	I	10^-5	30	6,00E+07
			II	10^-5	47	9,40E+07
			III	10^-5	38	7,60E+07
		Control	I	10^-5	71	1,42E+08
			II	10^-5	13	2,60E+07
			III	10^-5	69	1,38E+08
	Mix MRS	HMO +	I	10^-5	31	6,20E+07
			II	10^-5	61	1,22E+08
			III	10^-5	14	2,80E+07
		Control	I	10^-5	42	8,40E+07
			II	10^-5	45	9,00E+07
			III	10^-5	32	6,40E+07

Nota: Los datos representan las diluciones definitivas tras el cribado de resultados. Se conservaron las placas con valores inferiores a 30 o superiores a 300 colonias en aquellos casos donde no se disponía de diluciones alternativas, con el fin de mantener la representatividad de las réplicas biológicas.

Tabla A5.3. Datos brutos de recuentos de viabilidad celular (UFC/mL) de cultivos individuales (*E. coli, B. breve*) y su SynCom III (Mix BHI, Mix MRS) a las 0 y 24 horas de incubación. Se detallan las diluciones analizadas, el número de colonias contadas por triplicado biológico, y la viabilidad final calculada para las condiciones control y suplementadas con HMOs (HMO+)

Tiempo	Bacterias	Condición	Replica	Dilución analizada	UFC contadas	Viabilidad (UFC/mL)
0 h	*E. coli*	HMO +	I	10^-3	112	2,24E+06
			II	10^-3	129	2,58E+06
			III	10^-3	119	2,38E+06
		Control	I	10^-3	161	3,22E+06
			II	10^-3	123	2,46E+06
			III	10^-3	210	4,20E+06
	B. breve	HMO +	I	10^-3	199	3,98E+06
			II	10^-3	170	3,40E+06
			III	10^-3	211	4,22E+06
		Control	I	10^-3	154	3,08E+06
			II	10^-3	181	3,62E+06
			III	10^-3	209	4,18E+06
	Mix BRILLIANCE -CYS	HMO +	I	(-)	(-)	(-)
			II	10^-3	27	5,40E+04
			III	10^-3	48	9,60E+04
		Control	I	10^-3	86	1,72E+05
			II	10^-3	58	1,16E+05
			III	10^-3	70	1,40E+05
	Mix MRS-CYS-TRET	HMO +	I	(-)	(-)	(-)
			II	10^-3	53	1,06E+05
			III	10^-3	150	3,00E+05
		Control	I	10^-3	101	2,02E+05
			II	10^-3	132	2,64E+05
			III	10^-3	134	2,68E+05
24 h	*E. coli*	HMO +	I	10^-4	205	4,10E+07
			II	10^-4	139	2,78E+07
			III	10^-4	285	5,70E+07
		Control	I	10^-5	91	1,82E+08
			II	10^-5	84	1,68E+08
			III	10^-5	61	1,22E+08
	B. breve	HMO +	I	10^-4	6	1,20E+06
			II	10^-4	9	1,80E+06
			III	10^-4	29	5,80E+06
		Control	I	10^-4	17	3,40E+06
			II	10^-4	23	4,60E+06
			III	10^-4	17	3,40E+06
	Mix BRILLIANCE	HMO +	I	10^-5	35	7,00E+07
			II	10^-4	246	4,92E+07
			III	10^-4	338	6,76E+07
		Control	I	10^-5	88	1,76E+08
			II	10^-5	57	1,14E+08
			III	10^-5	81	1,62E+08
	Mix MRS	HMO +	I	10^-5	63	1,26E+08
			II	10^-5	48	9,60E+07
			III	10^-5	99	1,98E+08
		Control	I	10^-5	69	1,38E+08
			II	10^-5	97	1,94E+08
			III	10^-5	65	1,30E+08

Nota: Los datos representan las diluciones definitivas tras el cribado de resultados. Se conservaron las placas con valores inferiores a 30 o superiores a 300 colonias en aquellos casos donde no se disponía de diluciones alternativas, con el fin de mantener la representatividad de las réplicas

Anexo 6. Verificación morfológica y control de pureza de las cepas

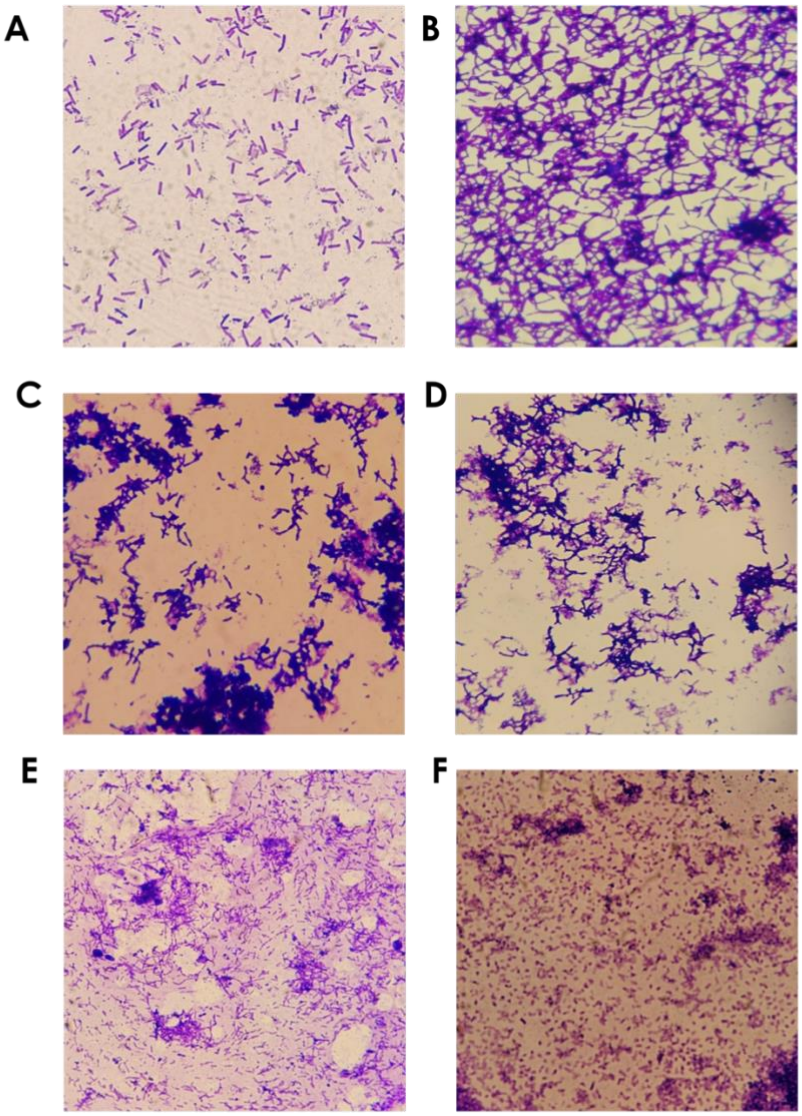


Figura A6.1 Control microscópico de las cepas individuales.. Imágenes representativas tras tinción simple con cristal violeta mostrando la morfología celular de los cultivos reactivados, de forma previa a los ensayos de interacción. **(A)** *Escherichia coli*; **(B)** *Lacticaseibacillus rhamnosus*; **(C)** *Bifidobacterium breve*; (**D)** *Bifidobacterium bifidum*; **(E)** *Akkermansia muciniphila*; **(F)** *Christensenella minuta*.