UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA
Facultad de Ciencias de la Salud
Grado en Biotecnología
Trabajo Fin de Grado
Curso 2025-2026

Caracterización funcional de *Bifidobacterium* spp. aisladas del entorno materno-infantil

Autor

Hidalgo García, Borja

Tutor interno

Dr. García García, Josep

Tutor externo

Dr. Bernabeu Lorenzo, Manuel

Valencia, 2026

Caracterización funcional de *Bifidobacterium* spp. aisladas del entorno materno-infantil

Trabajo Final de Grado, presentado por:

Hidalgo García, Borja

Tutorizado por:

Dr. García García, Josep

Tutorizado por:

Dr. Bernabeu Lorenzo, Manuel

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

VALENCIA

CURSO 2025-2026

Agradecimientos

Antes que nada, quiero dar las gracias a mis padres, las dos personas que me han apoyado de manera incondicional a lo largo de todos estos años y me han dado la oportunidad de aprender y crecer. Sin ellos, nada de esto habría sido posible, y este logro es tan suyo como mío.

Por otra parte, quiero agradecer a mis hermanos y amigos, quienes nunca han faltado cuando los he necesitado y han sido mi “lugar de desconexión” en los momentos de mayor estrés y agobio. Saber que siempre estabais ahí lo ha hecho todo mucho más llevadero.

Durante estos cuatro años he tenido la fortuna de compartir el camino con compañeros que se han convertido en verdaderos amigos. Hemos reído, hemos disfrutado y hemos crecido juntos a lo largo de la carrera, sin olvidar algún que otro momento de crisis compartida.

En la carrera no solo he encontrado compañeros excepcionales, sino también profesores que han transformado mi forma de entender el mundo y han alimentado aún más mi pasión por la ciencia. Pocas cosas hay tan inspiradoras como aprender de alguien que ejerce su profesión con verdadera vocación y la comparte con entusiasmo en cada clase.

Por último, quisiera darle las gracias al Dr. Manuel Bernabéu, mi tutor de prácticas y la persona con quien más he disfrutado aprendiendo este año. Gracias por todas las horas que me has dedicado, por dejarme cometer errores y sacar mis propias conclusiones, y, sobre todo, por darme la confianza y la libertad de pensar y experimentar por mí mismo.

Índice de contenidos

1. Introducción *1*

1.1 Microbiota **1**

1.1.1 Microbioma materno-infantil 1

1.1.2 Papel de *Bifidobacterium* spp. en la microbiota temprana 3

1.1.3 Interacción de *Bifidobacterium* spp. frente a microorganismos con potencial patógeno 4

1.2 Probióticos y postbióticos **5**

1.3 Resistencia a antibióticos y diseminación de ARGs **7**

2. Hipótesis *9*

3. Objetivos *9*

4. Materiales y métodos *10*

4.1 Medios de cultivo **10**

4.2 Cepas y Condiciones de Cultivo **10**

4.3 Evaluación de la adhesión a mucina **11**

4.4 Caracterización del uso de fuentes de carbono mediante tira API® **11**

4.5 Evaluación del consumo de HMOs **12**

4.6 Evaluación de la resistencia a tetraciclina **12**

4.7 Determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) **12**

4.8 Evaluación del efecto antimicrobiano del sobrenadante frente a patógenos potenciales **13**

4.9 Ensayos de conjugación de plásmidos **14**

4.10 Análisis estadístico y bioinformático de los datos **14**

5. Resultados *16*

5.1 Adhesión a mucina **16**

5.2 Perfil metabólico de *Bifidobacterium* **16**

5.3 Resistencia a tetraciclina **18**

5.4 Determinación de la producción de SCFAs **18**

5.5 Integración funcional para la selección de cepas candidatas **19**

5.6 Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes **20**

5.7 Efecto del sobrenadante en la conjugación bacteriana **23**

6. Discusión *24*

7. Conclusiones *30*

8. Bibliografía *31*

9. Anexos *38*

Índice de figuras

Figura 1. Interacción madre-lactante en el establecimiento de la microbiota infantil. 3

Figura 2. Relación entre HMOs, *Bifidobacterium* spp. y microbiota intestinal 4

Figura 3. Funciones de *Bifidobacterium* spp. en el intestino infantil.....5

Figura 4. Propagación de genes de resistencia a antibióticos en el intestino infantil.....8

Figura 5. Capacidad de adhesión a mucina de 14 cepas de *Bifidobacterium*.....16

Figura 6. Perfil metabólico de utilización de fuentes de carbono y HMOs por cepas de *Bifidobacterium*.....17

Figura 7. Crecimiento de cepas de *Bifidobacterium* en presencia de tetraciclina.....18

Figura 8. Cuantificación de SCFAs mediante GC-MS en sobrenadantes de cultivos de *Bifidobacterium*.....19

Figura 9. Análisis de componentes principales de las catorce cepas de *Bifidobacterium*.....20

Figura 10. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes obtenidos en medio MRS frente a bacterias con potencial patógeno.....21

Figura 11. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes obtenidos en medio GAM frente a bacterias con potencial patógeno.....21

Figura 12. Actividad antimicrobiana de los metabolitos y el pH de los sobrenadantes obtenidos en medio MRS frente a *E. coli*.....22

Figura 13. Efecto de los sobrenadantes de *Bifidobacterium* sobre la conjugación bacteriana y la viabilidad de las bacterias donadoras.....23

Índice de anexos

Anexo 1. Evaluación del crecimiento de cepas de *Bifidobacterium* en presencia de HMOs.....38

Anexo 2. Cinéticas de crecimiento de bacterias con potencial patógeno en presencia de sobrenadantes de *Bifidobacterium*.....39

Anexo 3. Medición de pH.....40

Anexo 4. Correlación entre ácido acético e inhibición de crecimiento.....40

Anexo 5. Dot plot del rendimiento de las cepas de *Bifidobacterium* en los ensayos evaluados.....41

Listado de símbolo y siglas

2′FL: 2′-fucosilactosa
3′SL: 3′-sialilactosa
6′SL: 6′-sialilactosa
ANOVA: análisis de la varianza
ARGs: genes de resistencia a antibióticos, del inglés *Antibiotic Resistance Genes*
ATCC: *American Type Culture Collection*
AUC: área bajo la curva, del inglés *Area Under the Curve*
BHI: medio de infusión de corazón y cerebro, del inglés *Brain Heart Infusion*
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
Cys: cisteína
DO: densidad óptica
DO_{600nm}: densidad óptica medida a 600 nm
EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, del inglés *European Food Safety Authority*
GAM: medio anaeróbico Gifu, del inglés *Gifu Anaerobic Medium*
GC-MS: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, del inglés *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*
Glu: glucosa
HGT: transferencia horizontal de genes, del inglés *Horizontal Gene Transfer*
HMO / HMOs: oligosacárido(s) de la leche humana, del inglés *Human Milk Oligosaccharide(s)*
IATA-CSIC: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos – Consejo Superior de Investigaciones Científicas
ISAPP: Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos, del inglés *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*
LB: caldo de lisogenia, del inglés *Lysogeny Broth*
LNT: lacto-N-tetraosa
MAMI: cohorte *MAternal MIcrobes*
MIC: concentración mínima inhibitoria, del inglés *Minimum Inhibitory Concentration*
MRS: medio de Man, Rogosa y Sharpe
NaOH: hidróxido de sodio
NIST: Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, del inglés *National Institute of Standards and Technology*
ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible
PBS: tampón salino fosfato, del inglés *Phosphate-Buffered Saline*
PC1: primer componente principal
PC2: segundo componente principal
PCA: análisis de componentes principales, del inglés *Principal Component Analysis*
pH: potencial de hidrógeno
pKAZ3: plásmido utilizado como vector portador de resistencia a tetraciclina
SCFA / SCFAs: ácido(s) graso(s) de cadena corta, del inglés *Short-Chain Fatty Acid(s)*
SI: estándar interno
spp.: varias especies dentro de un mismo género
subsp.: subespecie
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

Resumen

El establecimiento de la microbiota intestinal durante los primeros meses de vida constituye un proceso esencial para la salud a largo plazo, ya que interviene en la maduración inmunitaria, el metabolismo de nutrientes, la protección frente a microorganismos con potencial patógeno y el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Dentro del microbioma intestinal temprano, *Bifidobacterium* spp. ocupa una posición relevante debido a su elevada presencia en lactantes sanos, su capacidad para utilizar oligosacáridos de la leche humana (HMOs, del inglés Human Milk Oligosaccharides) y su posible contribución a la reducción de la carga de genes de resistencia a antibióticos. En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización funcional de cepas de *Bifidobacterium* spp. aisladas del entorno materno-infantil, con el fin de evaluar su potencial probiótico y postbiótico. Para ello, se analizaron 14 cepas pertenecientes a cinco especies: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. pseudocatenulatum* y *B. breve*, procedentes de muestras fecales y de leche materna de la cohorte MAMI.

Se evaluó su capacidad de adhesión a mucina en diferentes condiciones fisiológicas, su perfil de utilización de fuentes de carbono mediante tiras API® 50 CHL y su crecimiento en medios suplementados con HMOs específicos, como 2'-fucosilactosa (2'FL), lacto-N-tetraosa (LNT) y 6'-sialilactosa (6'SL). Además, se determinó la concentración mínima inhibitoria frente a tetraciclina, se cuantificó la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, de inglés Short-Chain Fatty Acid) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y se estudió la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua*. Finalmente, se analizó el efecto de estos sobrenadantes sobre la conjugación plasmídica como modelo de transferencia horizontal (HGT) de genes de resistencia a antibióticos (ARGs, del inglés Antibiotic Resistance Genes). Los resultados mostraron una marcada variabilidad funcional entre cepas, incluso dentro de una misma especie. Las cepas de *B. bifidum* destacaron por su adhesión a mucina en condiciones estáticas, mientras que algunas cepas de *B. breve* mostraron mayor adhesión cuando se mantuvieron metabólicamente activas. El análisis metabólico reveló un uso generalizado de sustratos como glucosa, galactosa, fructosa y LNT, mientras que el consumo de 2'FL fue limitado a determinadas cepas de *B. infantis* y la 6'SL no fue utilizada por las cepas estudiadas. La resistencia a tetraciclina también fue heterogénea, presentando resistencia al antibiótico en un rango desde 0,25 hasta 32 µg/mL. En cuanto a la producción de metabolitos, el ácido acético fue el principal SCFA detectado. Los sobrenadantes, especialmente los obtenidos en medio MRS, redujeron el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas, un efecto asociado principalmente a la acidificación del medio, aunque no exclusivamente. Asimismo, estos sobrenadantes disminuyeron la frecuencia de conjugación bacteriana de forma dependiente de la concentración y del medio de cultivo.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la relevancia de *Bifidobacterium* spp. como moduladores funcionales del microbioma infantil y destacan la importancia de evaluar propiedades específicas a nivel de cepa para su aplicación en estrategias probióticas y postbióticas.

Palabras clave

Bifidobacterium spp., microbiota materno-infantil, HMOs, SCFAs, postbióticos, actividad antimicrobiana, transferencia horizontal de genes.

Abstract

The establishment of the intestinal microbiota during the first months of life constitutes an essential process for long-term health, as it is involved in immune maturation, nutrient metabolism, protection against potentially pathogenic microorganisms, and the maintenance of intestinal homeostasis. Within the early intestinal microbiome, *Bifidobacterium* spp. occupies a prominent position due to its high abundance in healthy infants, its ability to utilise human milk oligosaccharides (HMOs), and its potential contribution to reducing the burden of antibiotic resistance genes. In this context, the present work aimed to functionally characterise strains of *Bifidobacterium* spp. isolated from the maternal–infant environment, in order to evaluate their probiotic and postbiotic potential. To this end, 14 strains belonging to five species were analysed: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. pseudocatenulatum*, and *B. breve*, obtained from faecal samples and breast milk from the MAMI cohort.

Their mucin adhesion capacity was assessed under different physiological conditions, their carbon source utilisation profile was determined using API® 50 CHL strips, and their growth in media supplemented with specific HMOs, including 2'-fucosyllactose (2'FL), lacto-N-tetraose (LNT), and 6'-sialyllactose (6'SL) was evaluated. In addition, the minimum inhibitory concentration against tetracycline was determined, short-chain fatty acid (SCFA) production was quantified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and the antimicrobial activity of cell-free supernatants was assessed against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria innocua*. Finally, the effect of these supernatants on plasmid conjugation was analysed as a model of horizontal transfer of antibiotic resistance genes (ARGs). The results revealed marked functional variability among strains, even within the same species. *B. bifidum* strains were notable for their mucin adhesion under static conditions, while some *B. breve* strains showed greater adhesion when maintained metabolically active. Metabolic analysis revealed widespread utilisation of substrates such as glucose, galactose, fructose, and LNT, whereas 2'FL consumption was restricted to certain *B. infantis* strains and 6'SL was not utilised. Tetracycline resistance was likewise heterogeneous. Regarding metabolite production, acetic acid was the predominant SCFA detected. The supernatants, particularly those obtained in MRS medium, reduced the growth of potentially pathogenic bacteria, an effect attributed primarily, though not exclusively, to medium acidification. Furthermore, these supernatants decreased the frequency of bacterial conjugation in a concentration- and culture medium-dependent manner.

Taken together, these findings reinforce the relevance of *Bifidobacterium* spp. as functional modulators of the infant microbiome and highlight the importance of evaluating strain-specific properties for their application in probiotic and postbiotic strategies.

Keywords

Bifidobacterium spp., maternal-infant microbiota, HMOs, SCFAs, postbiotics, antimicrobial activity, horizontal gene transfer.

1. Introducción

1.1 Microbiota

La microbiota intestinal humana se define como el conjunto de microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal manteniendo con el huésped una relación dinámica, compleja y fisiológica (Pantazi et al., 2023; Vandenplas et al., 2020). La microbiota no es una comunidad de microorganismos estable y pasiva, sino que participa de forma activa en los procesos fisiológicos y metabólicos del hospedador, incluyendo el metabolismo de sustratos no digeribles provenientes de la dieta, la producción de compuestos bioactivos, la maduración del sistema inmunitario y el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal (Samarra et al., 2024; Vandenplas et al., 2020). Teniendo en cuenta estas funciones, el estudio de la microbiota ha ido evolucionando desde una visión descriptiva y clasificatoria hacia un enfoque ecológico y funcional, donde la composición taxonómica, la capacidad metabólica y las interacciones entre microorganismos y con el hospedador se consideran elementos clave para interpretar su impacto sobre la salud a corto y largo plazo (Ferretti et al., 2018; Pantazi et al., 2023).

Los primeros años de vida se consideran una etapa crucial y de gran importancia para el desarrollo y estabilización de la microbiota intestinal (Samarra et al., 2024). Durante este periodo de tiempo, el intestino experimenta un proceso de colonización microbiana de forma progresiva que se ve influenciado de forma directa por factores perinatales y ambientales (Reyman et al., 2022). Entre los factores que más influyen en esta primera etapa de colonización se incluyen el tipo de parto, la edad gestacional, la exposición a antibióticos, la alimentación neonatal, la lactancia materna, la introducción de la alimentación complementaria y las características geográficas, culturales y gastronómicas del entorno (Pantazi et al., 2023; Selma-Royo et al., 2024). En conjunto, estos factores condicionan no solo qué microorganismos se establecen en el intestino infantil, sino también qué funciones metabólicas e inmunológicas llegan a consolidarse, siendo una etapa crítica para la salud a largo plazo (Reyman et al., 2022; Samarra et al., 2024). La microbiota debe entenderse como una comunidad dinámica, cuya estructura cambia conforme el lactante transita desde una dieta basada en leche materna hacia una alimentación más diversa (Pantazi et al., 2023). La disponibilidad de nutrientes, la competencia por nicho, la cooperación metabólica y la interacción con el huésped condicionan que grupos bacterianos prosperen (Mills et al., 2023; Selma-Royo et al., 2024). En este contexto, la leche materna desempeña un papel fundamental, aportando tanto microorganismos como HMOs que actúan como sustratos selectivos para determinados colonizadores tempranos (Samarra et al., 2025).

Teniendo en cuenta la variabilidad de microorganismos de la microbiota, existe un amplio consenso en que la abundancia de *Bifidobacterium* spp. constituye uno de los rasgos más característicos de la microbiota intestinal del lactante, particularmente durante los primeros meses (Jarman et al., 2025; Pantazi et al., 2023). Esta prevalencia no es casual, ya que las bifidobacterias poseen la maquinaria enzimática necesaria para degradar los HMOs presentes en la leche materna, confiriéndoles una ventaja competitiva en el entorno intestinal del lactante (Samarra et al., 2025). Por ello, comprender cómo se establece el microbioma materno-infantil y qué factores favorecen la colonización de *Bifidobacterium* resulta esencial para interpretar la colonización temprana y su relevancia funcional en etapas posteriores (Jarman et al., 2025; Selma-Royo et al., 2024).

1.1.1 Microbioma materno-infantil

La microbiota del lactante se encuentra condicionada por la interacción entre transmisión materna, factores perinatales, tipo de alimentación y dinámica ecológica del propio intestino infantil. Dentro de este proceso, la transmisión vertical de bifidobacterias, refiriéndose a la transmisión de bacterias de la madre hacia el lactante, ha emergido como una de las características más relevantes para la configuración temprana del microbioma (Flores Ventura et al., 2025; Milani et al., 2015; Vandenplas et al., 2020). Se estima que existe una transferencia del 30% de cepas de *Bifidobacterium* spp. entre madre-hijo (Flores Ventura et al., 2025; Milani et al., 2015). Entre ellas, especies como *B. bifidum* y *B. longum* son las que muestran mayor abundancia observando además una mayor transmisión en lactantes nacidos por vía vaginal respecto a los nacidos por cesárea (Flores Ventura et al., 2025; Milani et al., 2015).

El establecimiento del microbioma materno-infantil no se limita únicamente al momento del parto, sino que existe una interacción dinámica entre la microbiota fecal infantil y la microbiota de la leche materna durante los primeros meses, donde la relación entre ambos nichos es más compleja y bidireccional de lo que se asumía tradicionalmente (Feehily et al., 2023; Wu et al., 2025). La lactancia materna constituye una de los principales factores que modulan este microbioma, teniendo los HMOs un papel fundamental. Los HMOs son oligosacáridos complejos que constituyen el tercer componente sólido más abundante de la leche materna con más de 200 estructuras identificadas, las cuales se encuentran clasificados en tres grupos según su composición: fucosilados neutros, neutros no fucosilados y sialilados, siendo los más relevantes la 2'-fucosilactosa (2'-FL), la lacto-N-tetraosa (LNT) y las sialilactosas (3'-SL y 6'-SL) (Slater et al., 2025). Al ser resistentes a la digestión del lactante, alcanzan el colon intactos y actúan como sustratos prebióticos selectivos que favorecen la colonización y predominio de *Bifidobacterium* en la microbiota infantil (Lordan et al., 2024; Mills et al., 2023; Yang et al., 2024).

En relación con la lactancia, Laursen *et al*. (2021) demostraron que *Bifidobacterium* spp. producen SCFAs en el intestino infantil, sugiriendo que estos metabolitos podrían influir sobre diferentes funciones como reforzar la integridad de la barrera intestinal, actuar como fuente de energía para los colonocitos, regular las respuestas inmunes modulando así la diferenciación de linfocitos T y ejerciendo efectos antiinflamatorios (Fusco et al., 2023). Además, Dai *et al.* (2023) observaron que el enriquecimiento de *B. longum* subsp*. infantis* asociado a la lactancia se relaciona con microbiotas que presentan una menor carga de ARGs. Este concepto apoya la idea de que la leche materna favorece no solo una composición característica, sino también una mayor estabilidad del microbioma intestinal frente a perturbaciones tempranas (Dai et al., 2023; Laursen et al., 2021).Mediante la interpretación de estos datos se sostiene que el microbioma materno-infantil depende de la interacción entre transmisión vertical, lactancia, metabolismo de HMOs y perturbaciones tempranas, donde *Bifidobacterium* spp. puede llegar a ocupar una posición estructural y funcional central (Flores Ventura et al., 2025; Fusco et al., 2023; Jarman et al., 2025; Reyman et al., 2022; Samarra et al., 2024).

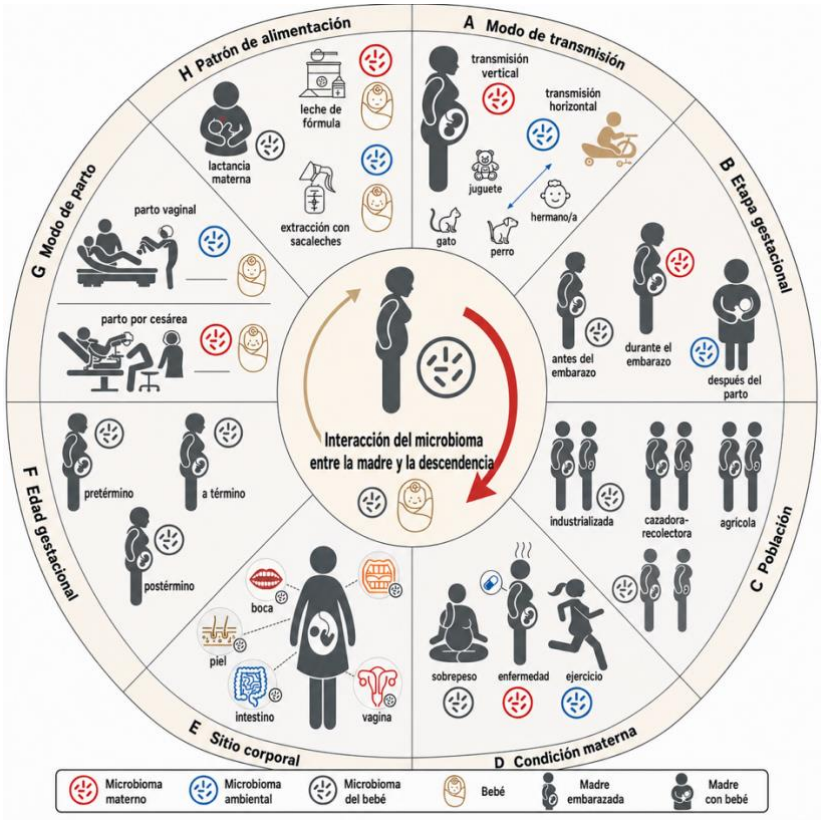


Figura 1. Interacción madre-lactante en el establecimiento de la microbiota infantil. Esquema de los principales factores maternos, perinatales y ambientales que influyen en la transmisión microbiana y en la colonización temprana del intestino del lactante. Adaptada de Xiao & Zhao (2023).

1.1.2 Papel de *Bifidobacterium* spp. en la microbiota temprana

El género *Bifidobacterium* se describió por primera vez a partir de heces de lactantes alimentados con leche materna por Tissier en 1899. Este género pertenece al filo *Actinobacteria*, familia *Bifidobacteriaceae*, y agrupa bacterias Gram-positivas, anaerobias estrictas, inmóviles, no esporuladas y con morfología característica en forma de Y (Alessandri et al., 2021). La longitud del genoma en este género varía de forma considerable entre especies y cepas con tamaños que van desde 1,73 hasta 3,25 Mb, con un contenido en guanina y citosina que varía entre el 55 y el 67% (Milani et al., 2016). Actualmente existen 50 especies identificadas de este género que continúan creciendo a partir de la caracterización de microbiotas de distintos hospedadores (Alessandri et al., 2021). Los plásmidos no son un rasgo característico en estas cepas, se estima que solo el 20% de las cepas aisladas contienen elementos plasmídicos, con un tamaño relativamente pequeño (1,8-10,2 kb) (Milani et al., 2014). En cuanto a resistencias antibióticas, *Bifidobacterium* presenta resistencia intrínseca a aminoglucósidos y quinolonas, mientras que son generalmente sensibles a β-lactámicos, glucopéptidos y cloranfenicol. Por otra parte, presentan resistencia adquirida principalmente frente a tetraciclinas mediada por genes como *tet*(W), *tet*(O) o *tet*(M) y macrólidos (*ermB*) (Milani et al., 2014; Terlizzi et al., 2025).

Bifidobacterium es considerado uno de los grupos bacterianos clave en la microbiota intestinal del lactante, debido a su abundancia y adaptación funcional al microbioma(Jarman et al., 2025; Pantazi et al., 2023). La abundancia de este género en las primeras etapas se debe a la capacidad de determinadas especies y cepas de metabolizar HMOs, las interacciones cross-feeding entre especies, así como la cooperación de *B. infantis* y *B. breve* en la degradación de mucinas y glicanos (Arzamasov et al., 2025; Egan et al., 2014; Segui-Perez et al., 2025). Las

alteraciones en la abundancia de *Bifidobacterium* spp. está asociada a posibles consecuencias a largo plazo, ya que se ha observado que una disbiosis en los primeros meses de vida se asocia a un mayor riesgo de desarrollar enfermedades alérgicas, asma, eccema, obesidad y trastornos del neurodesarrollo en etapas posteriores (Dai et al., 2023; Tremblay et al., 2023). Por último, *Bifidobacterium* spp. se ha observado que contribuyen a la maduración del sistema inmunitario a través de la modulación de la respuesta de linfocitos T (Vogel et al., 2023), de modo que su presencia durante los primeros 1000 días de vida representa un factor determinante para el correcto establecimiento y desarrollo del sistema inmune (Shao et al., 2024).

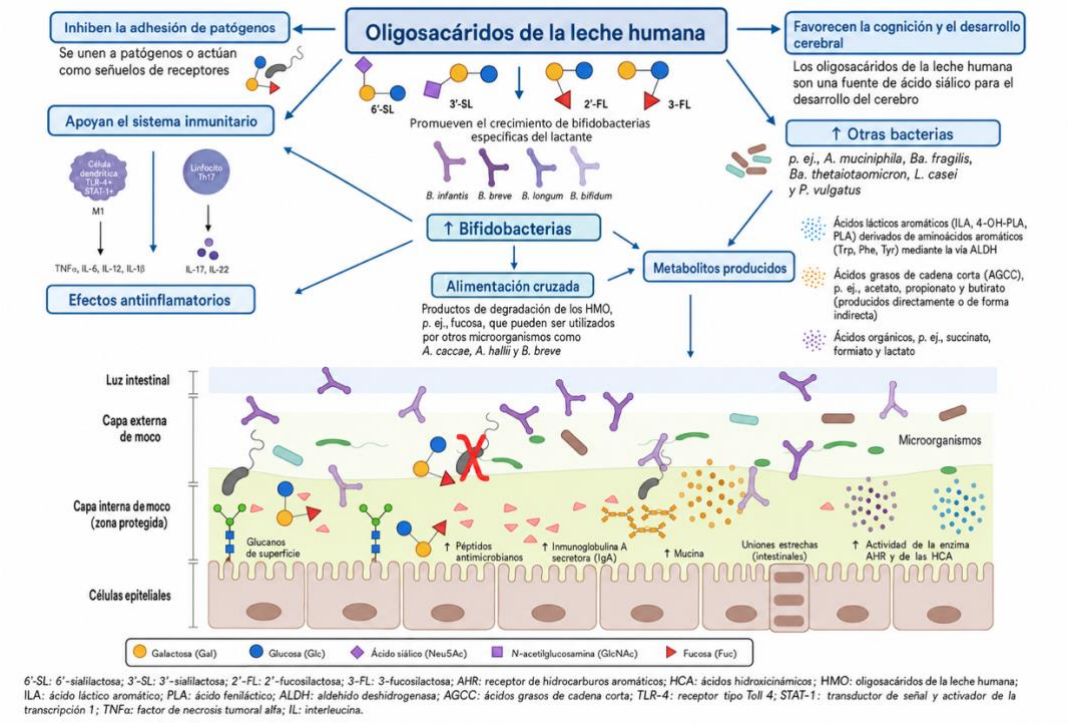


Figura 2. Relación entre HMOs, *Bifidobacterium* spp. y microbiota intestinal. Los HMOs favorecen el crecimiento de *Bifidobacterium* spp., cuya actividad metabólica contribuye a la producción de SCFAs, la estabilidad de la microbiota y la inhibición de patógenos. Adaptada de Lordan *et al.* (2024).

1.1.3 Interacción de *Bifidobacterium* spp. frente a microorganismos con potencial patógeno

El rol que presenta *Bifidobacterium* spp. frente a microorganismos con potencial patógeno debe interpretarse como la capacidad de la microbiota establecida para limitar la colonización o expansión de determinados grupos bacterianos (Duar et al., 2020; Shao et al., 2024). Especies como *B. infantis* reducen el pH intestinal, reduciendo la abundancia de bacterias con potencial patógeno y bacterias degradadoras de la capa de mucosa, considerándose un mecanismo de protección mediado por acidificación del entorno intestinal (Lordan et al., 2024; Mills et al., 2023). De forma complementaria, Shao *et al.* (2024) mostraron que las microbiotas dominadas por *Bifidobacterium* spp., en especial por *B. longum* y *B. breve*, presentan un microbioma más estable y con resistencia duradera frente a la integración de patógenos, observando además que *B. breve* confiere resistencia a la colonización. En el contexto materno-infantil, bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Staphylococcus aureus* pueden formar parte de la microbiota temprana, pero también pueden llegar a ser especies patógenas cuando se expanden en una microbiota inmadura, debido a un nacimiento prematuro, cesárea, hospitalización o exposición a antibióticos (Li et al., 2025; Xiao & Zhao, 2023). Durante los primeros días de vida, el intestino del lactante favorece la colonización por bacterias anaerobias facultativas, entre ellas destacan

Enterobacteriaceae como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*, pero cuando la microbiota comienza a ser colonizada por anaerobios estrictos, como *Bifidobacterium* spp., se considera un indicador de maduración del microbioma intestinal (Samarra, Alcañiz, et al., 2025). En este caso, la abundancia de *Bifidobacterium* puede limitar la expansión de estos grupos mediante la reducción del pH, la competencia de nutrientes y la colonización del microbioma intestinal (O'Brien et al., 2022; Shao et al., 2024).

Klebsiella spp., especialmente *K. pneumoniae*, es de gran interés en el contexto materno-infantil debido a su relación con microbiotas alteradas, especialmente en lactantes prematuros o sometidos a intervenciones clínicas tempranas (Kiu et al., 2025). Por otra parte, *S. aureus* se suele asociar a microbiomas cutáneos, nasales y mamarios, facilitando su transmisión durante el contacto piel con piel, la lactancia o la estancia hospitalaria, aunque en recién nacidos vulnerables puede llegar a actuar como oportunista (Kiu et al., 2025). A diferencia de estos microorganismos, *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. se consideran patógenos exógenos asociados a contaminación alimentaria, con especial relevancia durante el embarazo, la lactancia y los primeros meses de vida debido a la vulnerabilidad inmunológica de la madre y del recién nacido (Khalil et al., 2023; Woelfel et al., 2024). La microbiota intestinal contribuye a la resistencia de estos patógenos mediante competencia por nutrientes, producción de metabolitos antimicrobianos y mantenimiento de la barrera intestinal, por lo que una microbiota inmadura o alterada puede presentar menor capacidad de exclusión frente a infecciones alimentarias (Deng & Wang, 2024; Woelfel et al., 2024).

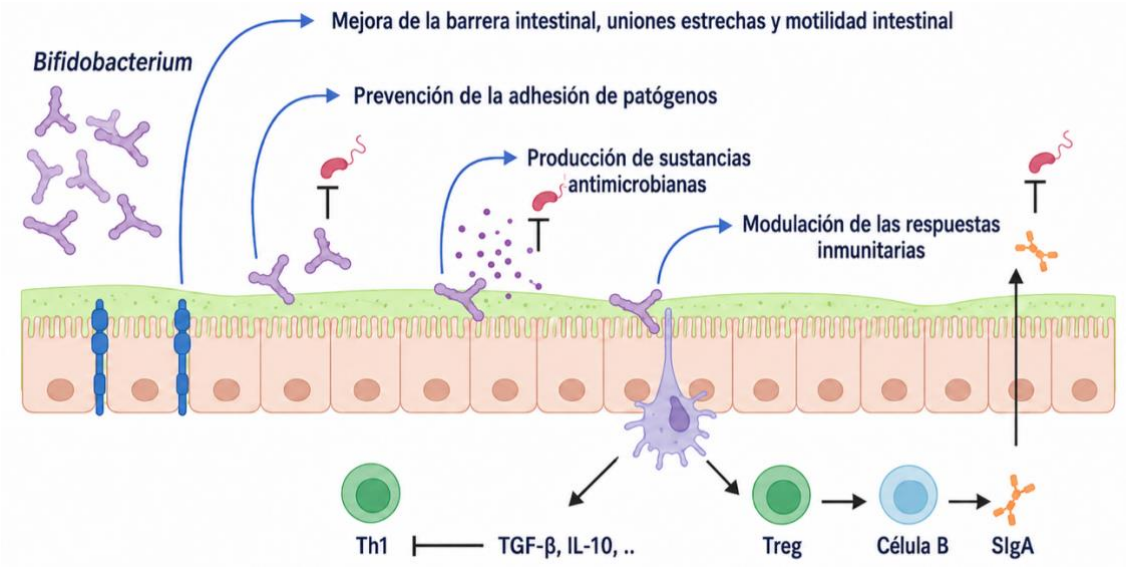


Figura 3. Funciones de *Bifidobacterium* spp. en el intestino infantil. Representación de los mecanismos mediante los cuales *Bifidobacterium* spp. contribuye a la barrera intestinal, la modulación inmunitaria y la protección frente a microorganismos con potencial patógeno. Adaptada de Sadeghpour Heravi & Hu (2023).

1.2 Probióticos y postbióticos

El interés por modificar o adaptar la microbiota intestinal de forma dirigida ha impulsado el estudio de probióticos y postbióticos como estrategias con potencial preventivo y terapéutico (Mills et al., 2023; Pantazi et al., 2023; Vandenplas et al., 2020). Según el consenso de la "International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)", los probióticos son "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped", mientras que los postbióticos se definen como "preparaciones de microorganismos inanimados y/o sus componentes que confieren un beneficio para la salud del huésped" (Salminen et al., 2021). Una de las ventajas que presentan los

postbióticos frente a los probióticos es su estabilidad debido a que, al estar compuestos por microorganismos inactivados, sus componentes o sus metabolitos, no tienen que mantener la viabilidad celular y presentan un menor riesgo de seguridad en poblaciones vulnerables (Salminen et al., 2021). Durante la infancia, el uso de probióticos y postbióticos presenta una gran relevancia ya que la microbiota intestinal se encuentra en una fase de desarrollo y es especialmente sensible a los factores que modulan su composición, actividad metabólica e interacción con el huésped (Salminen et al., 2021).

En el contexto materno-infantil, uno de los ejemplos más estudiados es *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* EVC001, esta cepa se seleccionó en base a su capacidad para utilizar de forma eficiente HMOs. Esta cepa ha sido evaluada en lactantes alimentados con leche materna mediante estudios clínicos en los que se administró diariamente durante los primeros días de vida y posteriormente se analizaron muestras fecales mediante técnicas de secuenciación, cuantificación bacteriana y análisis de metabolitos, donde se observó una colonización estable por *B. infantis* hasta el primer año de vida (O'Brien et al., 2022). Además, esta cepa se ha asociado con una mayor abundancia de *Bifidobacteriaceae*, mayor utilización de HMOs, producción de lactato y acetato, reducción del pH fecal y menor presencia relativa de microorganismos potencialmente patógenos, lo que indica que su efecto depende de una adaptación específica al entorno intestinal del lactante (O'Brien et al., 2022).También se han evaluado probióticos en neonatos prematuros, una población especialmente vulnerable por la inmadurez intestinal y la frecuente exposición a antibióticos. En este contexto, formulaciones multicepa que incluyen *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* han mostrado capacidad para modificar la composición y función del microbioma intestinal. Por ejemplo, Beck *et al.* (2022) observaron que la administración de un probiótico en prematuros fue uno de los principales factores en el desarrollo del microbioma, destacando que este efecto era dependiente de las cepas incluidas en el probiótico. Estos resultados apoyan que el potencial probiótico debe evaluarse de forma individualizada y no atribuirse de manera general a todo un género bacteriano (Beck et al., 2022). Por otra parte, se han estudiado probióticos que combinan cepas como *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 y *Lactobacillus acidophilus* La-5 en neonatos prematuros. Estos probióticos se han evaluado en ensayos clínicos mediante seguimiento de colonización bacteriana, composición del microbioma y presencia de microorganismos multirresistentes. Aunque no siempre se observa una reducción significativa de la colonización por bacterias multirresistentes, sí se ha descrito una modulación del microbioma hacia comunidades más enriquecidas en bacterias beneficiosas, especialmente *Bifidobacterium* y *Lactobacillus (Van Rossum et al., 2024).*

Un postbiótico diseñado para el microbioma infantil extraído a partir de la fermentación de *Lacticaseibacillus paracasei* CBA L74, se asoció con un aumento de inmunoglobulina A secretora y cambios en la microbiota intestinal, dando lugar tras su administración a una composición del microbioma intestinal similar a la observada en lactantes alimentados con leche materna (Roggero et al., 2020). Estos resultados sugieren que los productos derivados de la fermentación bacteriana pueden contribuir a la maduración inmunitaria y microbiana durante los primeros meses de vida, incluso sin administrar necesariamente bacterias viables (Roggero et al., 2020). Otro ejemplo de postbióticos centrados en lactantes son los fermentados obtenidos a partir de *Bifidobacterium breve* C50 y *Streptococcus thermophilus* 065, donde tras un ensayo clínico en el que evaluaron parámetros de seguridad, crecimiento, tolerancia digestiva y análisis de microbiota fecal, observaron que fueron seguras, bien toleradas y capaces de modular la microbiota hacia un perfil más próximo al de lactantes alimentados con leche materna (Béghin et al., 2021) Además, existen estudios que indican que los postbióticos, en general parecen seguros y bien tolerados, aunque todavía no existen evidencias suficientes para afirmar que el uso de estos compuestos presenten un beneficio real para la salud infantil (Szajewska et al., 2022).

En este trabajo, las cepas de *Bifidobacterium* spp. aisladas del entorno materno-infantil se estudian desde una doble perspectiva, por un lado, como posibles candidatas probióticas mediante la evaluación de propiedades como la adhesión a mucina, el metabolismo de HMOs y la producción de SCFAs y, por otro lado, el posible potencial postbiótico de los sobrenadantes producidos por las cepas mediante el análisis de sus sobrenadantes libres de células frente a bacterias con potencial patógeno y en ensayos de conjugación plasmídica.

1.3 Resistencia a antibióticos y diseminación de ARGs

En los últimos años la resistencia a antibióticos ha constituido uno de los principales desafíos para la salud pública a nivel mundial, considerando a la microbiota intestinal un reservorio dinámico de ARGs (Ott & Mellata, 2022; Reyman et al., 2022). En 2021, aproximadamente 1,14 millones de muertes fueron directamente atribuidas a infecciones por bacterias multirresistentes, con estimaciones que elevan la cifra a 39 millones entre 2025 y 2050. Entre los mecanismos de transferencia horizontal (HGT), la conjugación plasmídica destaca como una de las rutas más relevantes de diseminación de resistencias (Alvarez-Molina et al., 2023; Neil et al., 2021; Ott & Mellata, 2022). Además, la eficiencia de la conjugación varía en función del entorno del microbioma, del contacto donador-receptor, del rango de hospedadores y del contexto físico y metabólico del nicho intestinal (Ma et al., 2024). Respecto a este último factor, durante los primeros meses de vida es un factor muy influyente debido a que la microbiota se encuentra en un estado de inestabilidad siendo especialmente sensible a presiones selectivas externas (Reyman et al., 2022). Se ha observado que la administración neonatal de antibióticos de amplio espectro altera el desarrollo del microbioma y favorece la selección de resistencia antimicrobiana en el resistoma intestinal (Casaburi et al., 2019; Reyman et al., 2022). Por otra parte, respecto a la composición de la microbiota y el resistoma, Samarra *et al*. (2025) observaron que una mayor abundancia de *Bifidobacterium* spp. se asocia con una menor carga de ARGs, y que los niños con lactancia materna exclusiva durante el primer mes poseen resistomas menores a los 6 meses (Samarra et al., 2025; Taft et al., 2018).

Haciendo referencia al plano mecanístico, la transferencia plasmídica de genes de resistencia constituye un proceso dinámico condicionado por diversos factores tanto externos como internos (Ma et al., 2024; Neil et al., 2021). Se ha demostrado que algunos compuestos como los ácidos grasos 2-alquinoicos sintéticos pueden actuar como inhibidores de la conjugación bacteriana (Getino et al., 2015; Kwapong et al., 2019). Además, se ha observado que la exposición a antibióticos favorece la diseminación plasmídica debido al aumento de la sobreexpresión de la maquinaria implicada en la conjugación en presencia de estos compuestos (Liu et al., 2019). Por otra parte, existen interacciones metabólicas durante el crecimiento bacteriano, especialmente en biofilms, donde las bacterias son capaces de modular la eficiencia de transferencia de ARGs (Ma et al., 2024). Estos hallazgos refuerzan la idea de que la conjugación no es un proceso estático, sino altamente dependiente del estado fisiológico bacteriano y de la población bacteriana del nicho intestinal.

Dentro de este marco, los estudios con *Bifidobacterium* spp. resultan especialmente relevantes. Se ha demostrado en modelos gnobióticos que determinadas cepas de *Bifidobacterium* spp. pueden reducir de forma significativa la transferencia de ARGs β-lactámicos entre enterobacterias, con descensos de hasta varios órdenes de magnitud en el número de transconjugantes (Moubareck et al., 2007). Además, evidencias más recientes indican que sobrenadantes de bacterias probióticas, postbióticos, pueden inhibir la transferencia plasmídica *in vitro*, lo que sugiere que compuestos extracelulares bacterianos podrían interferir directamente en los mecanismos de conjugación (Apiwatsiri et al., 2021). En conjunto, la evidencia actual apoya que *Bifidobacterium* spp. no solo se asocia con un resistoma infantil más favorable, sino que también podría modular activamente el microambiente intestinal e interferir en la propagación

de ARGs, lo que justifica el estudio de cepas aisladas del entorno materno-infantil, así como de sus metabolitos y sobrenadantes, en ensayos de transferencia plasmídica (Li et al., 2025; Samarra et al., 2025).

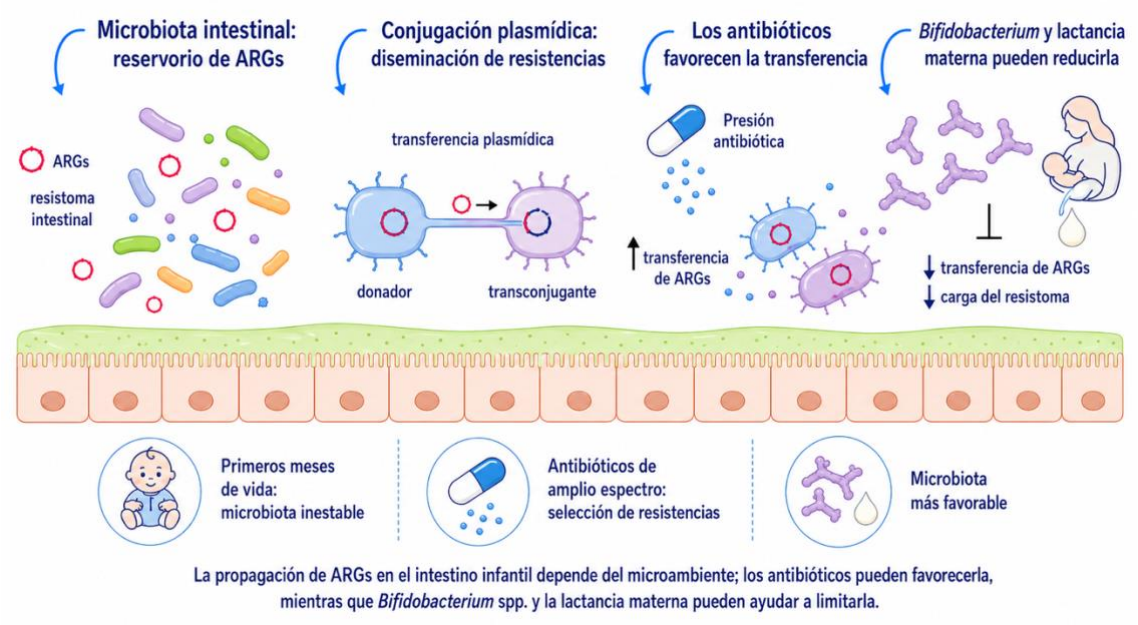


Figura 4. Propagación de genes de resistencia a antibióticos en el intestino infantil. La presión antibiótica favorece la transferencia plasmídica de ARGs, mientras que *Bifidobacterium* spp. y la lactancia materna podrían contribuir a reducirla. Realizado en Biorender.

El presente trabajo se enmarca dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030, especialmente en relación con el ODS 3: Salud y bienestar, el ODS 2: Hambre cero, y el ODS 9: Industria, innovación e infraestructura. El estudio de cepas de *Bifidobacterium* spp. aisladas del entorno materno-infantil se vincula directamente con la mejora de la salud durante las primeras etapas de vida, así como con la búsqueda de estrategias frente a microorganismos con potencial patógeno y la diseminación de ARGs. Por otra parte, el estudio de HMOs y la relación que presentan con el desarrollo del microbiota conecta este trabajo con la nutrición infantil y con el papel de la lactancia materna en el establecimiento de una microbiota beneficiosa. Finalmente, la caracterización funcional de estas cepas y de sus sobrenadantes contribuyen al desarrollo de conocimiento biotecnológico aplicable a estrategias probióticas y postbióticas.

2. Hipótesis

Bifidobacterium spp. forma parte del grupo de bacterias beneficiosas presentes en la microbiota tanto de adultos como niños, teniendo una gran relevancia durante los primeros meses de vida. Sin embargo, la abundancia de cada especie no es homogénea ni todas las especies presentan las mismas capacidades metabólicas. Además, las microbiotas dominadas por *Bifidobacterium* spp. en las primeras etapas de la vida presentan una menor carga de ARGs pero no se conoce el mecanismo implicado y, por lo tanto, sí hay especies o cepas que presenten características óptimas en estos procesos.

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo **es la caracterización funcional de cepas de *Bifidobacterium* spp con potencial probiótico aisladas del entorno materno-infantil**. Para poder alcanzar nuestro objetivo principal, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la capacidad de adhesión a mucina asociada a la colonización del microbioma intestinal.
- Evaluar el metabolismo de fuentes de carbono incluyendo los HMOs.
- Cuantificar la producción de SCFAs tras el crecimiento en diferentes medios de cultivo.
- Identificar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de tetraciclina de las cepas estudiadas.
- Evaluar la inhibición del crecimiento de bacterias con potencial patógeno por medio de postbióticos (sobrenadante) de *Bifidobacterium*.
- Determinar el efecto de postbióticos de *Bifidobacterium* sobre la transmisión de genes de resistencia mediante conjugación plasmídica.

4. Materiales y métodos

4.1 Medios de cultivo

Las cepas de *Bifidobacterium* se cultivaron con medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) diseñado para bacterias ácido-lácticas compuesto por peptona de proteasa nº3 10 g/L, extracto de carne 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, dextrosa 20 g/L, polisorbato 80 g/L, citrato de amonio 2 g/L, acetato de sodio 5g/L, sulfato de magnesio 0,1 g/L, sulfato de manganeso 0,01 g/L y fosfato dipotásico 2 g/L, disuelto en agua destilada (Thermo Fisher Scientific, CM059B). Este medio se suplementa después de autoclavar con L-Cisteína hidroclorhídrica monohidratada (cisteína) al 0,05% (p/v) (Thermo Fisher Scientific, A10389.22) necesaria para el crecimiento de *Bifidobacterium*. En el caso de medio sólido se añadió agar europeo bacteriológico (Condalab, 1800) a una concentración de 15 g/L.

Por otra parte, las cepas de *Bifidobacterium* también se cultivaron con medio de cultivo Medio Anaeróbico Gifu GAM (HiMedia, M1801) suplementado con mucina porcina tipo II (Sigma-Aldrich, M2378) a una concentración de 15 mg/mL. Después de autoclavar, se suplementa con cisteína 0,05%, hemina 0,05% (Sigma-Aldrich, H9039) y vitamina K 1:100 (Thermo Fisher Scientific, L10575.03) previamente filtrados utilizando filtros de 0,22 µm (Merck, SLGP033RS).

En el ensayo de consumo de HMOs, se utilizó MRS sin dextrosa (Condalab, 1295), el cual presenta los mismos componentes que el medio MRS descrito previamente pero sin fuente de carbono, permitiendo añadir fuentes de carbono diferentes que se quieren estudiar. Se añadió a 0,2% (v/v) de D-(+)-Glucosa (Glu) (Sigma-Aldrich, G8270) a todos los medios del ensayo como fuente de carbono mínima, y un 2% (v/v) de las fuentes de carbono seleccionadas en las que se incluyen: Glu, LNT (Sigma-Aldrich, L6770), 2'FL (Sigma-Aldrich, SMB00933) y 6'SL (Sigma-Aldrich, A8556). Los HMOs y la cisteína fueron añadidos al medio después de esterilizarlos utilizando un filtro de 0,22 µm.

El medio de cultivo de infusión de corazón y cerebro (BHI) (Condalab, 1400) se utilizó para el crecimiento de *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*, el cual está compuesto por dextrosa 2 g/L, gelatina de peptona 10 g/L, fosfato disódico 2,5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, infusión de corazón 10 g/L e infusión de cerebro 7,5 g/L.

El medio de cultivo de caldo de lisogenia (LB) (NZYtech, MB145) se utilizó para el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, compuesto por triptona 10 g/L, cloruro sódico 10 g/L y extracto de levadura 5 g/L. En los ensayos de conjugación este medio se suplementó con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranósido (X-Gal) (Thermo Fisher Scientific, AM9944) 40 mg/ml (v/v) y los antibióticos cloranfenicol (Guinama, 97980/94195) 25 mg/ml (v/v) y tetraciclina (Sigma-Aldrich, T7660) 15 mg/ml (v/v) cuando fue necesario.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 121ºC durante 15 min a una presión de 1 atmósfera.

4.2 Cepas y Condiciones de Cultivo

Las 14 cepas de *Bifidobacterium* que se utilizaron en el estudio provienen de la colección del grupo MAINBiotics de la Dra. M. Collado en el IATA-CSIC aisladas de muestras fecales y leche materna de madres y sus bebés incluidos en la cohorte MAMI (MAternal MIcrobes). Se seleccionaron cepas de 5 especies diferentes: *B. bifidum* (IATA039, IATA365, IATA102), *B. longum* (IATA006, IATA063, IATA054), *B. infantis* (IATA009, IATA132, IATA331), *B. pseudocatenulatum* (IATA044, IATA057) y *B. breve* (IATA013, IATA059, IATA027).

Los aislados de *Bifidobacterium* se encuentran conservados en glicerol (Sigma-Aldrich, G5516) al 20% a -80ºC. De forma general, las cepas se sembraron en placas de MRS agar suplementado con un 0,05% de cisteína y se incubaron a 37ºC en una jarra de anaerobiosis (Thermo Fisher Scientific, AG0025A) con bolsa AnaeroGen de 2,5 L (Thermo Fisher Scientific, AN0025A) durante 24h. Tras este paso, se seleccionaron 1-2 colonias y se inocularon a 1,8 ml de MRS líquido suplementado con 0,05% cisteína (cys). Finalmente, se incubaron a 37ºC en anaerobiosis durante 24h en estático.

Las cepas de *Listeria innocua CECT 910*, *Staphylococcus aureus* CECT 86*, Escherichia coli* MG1655 ATCC 700926 y *Salmonella typhimurium* CECT722 provienen de la colección española de cultivos tipo (CECT). Las cepas se sembraron en placas LB BHI agar y se incubaron a 37ºC durante 16-24h. Seguidamente, se inocularon 1-2 colonias en 5 mL de medio líquido en un tubo falcon de 50 mL (Corning, 352070) y se incubó a 37ºC en aerobiosis durante 24h en agitación.

4.3 Evaluación de la adhesión a mucina

La capacidad de adhesión a mucina de las cepas de *Bifidobacterium* se realizó siguiendo el protocolo de Muñoz-Provencio *et al*., (2009) con algunas modificaciones. En concreto, las placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, 168055) fueron tratadas añadiendo 100 mL/pocillo de una dilución 1:10 de mucina porcina tipo II en una solución 50 mM de carbonato/bicarbonato (Sigma-Aldrich, C3041) pH9,6. Las placas tratadas se incubaron a 4ºC durante 16-24h. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces con 300 mL/pocillo de tampón salino fosfato (PBS) (Thermo Fisher Scientific, 10010023), y se añadió 200 mL/pocillo de la solución de bloqueo PBS 1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379), incubando 1h a temperatura ambiente. Tras este paso, se descartó la solución de bloqueo y se añadió 100mL/pocillo del cultivo bacteriano ajustado a densidad óptica (DO) en 600 nm de 1. Luego, se incubaron las placas a 4ºC durante 16-24h.

Tras la incubación, se descartó la solución bacteriana y se lavaron las placas 3 veces con 200 mL/pocillo de PBS 0,05% Tween 20, dejando secar la placa a 55ºC. Después del secado, se añadieron 100 mL/pocillo de una solución de cristal violeta al 0,33% (Sigma-Aldrich, V5265) y se incubó durante 45 min. El cristal violeta que no se ha adherido a las bacterias es eliminado lavando las placas 6 veces con 300 mL/pocillo de PBS. Finalmente, se utilizó 100 mL/pocillo de ácido acético al 10% (EPICA, S.L, ACAC-GIA-1K0), se incubó durante 5-10 min para disolver todo el colorante y se midió en el espectrofotómetro la DO a una longitud de onda de 595 nm.

De forma paralela, la evaluación de adhesión a mucina también se llevó a cabo en bacterias metabólicamente activas. En este caso, una vez añadido el cultivo bacteriano ajustado en las placas se incubaron en anaerobiosis a 37 ºC durante 2h. El ensayo se realizó con 4 réplicas de cada cepa con mucina y 4 réplicas sin mucina como control, añadiendo un control de PBS que se utiliza como blanco a la hora de la medición.

Cuando se ha tenido que ajustar la densidad óptica de los cultivos, de forma general los cultivos de *Bifidobacterium* se lavaron 2 veces con PBS para eliminar restos de medio de cultivo, se centrifugaron a 6000 x g durante 2 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1mL de PBS. La absorbancia se midió en el espectrofotómetro (SPECTROstar Nano) a una longitud de onda de 600 nm y el cultivo se ajustó a DO 1 utilizando PBS.

4.4 Caracterización del uso de fuentes de carbono mediante tira API®

El consumo y fermentación de las diferentes fuentes de carbono por las cepas de *Bifidobacterium* se evaluó mediante un método semi-cuantitativo haciendo uso de las tiras API® 50 CHL (BioMérieux, 50300) con 50 fuentes de carbono distintas, siguiendo las indicaciones del fabricante. En resumen, los cultivos de *Bifidobacterium* se crecieron durante toda la noche en las condiciones indicadas y se lavaron 2 veces con PBS para eliminar restos de medio de cultivo. Luego, se ajustaron 10 mL del medio incluido en el kit API® 50 CHL (BioMérieux, 50410) a una DO_{600nm} de 0,45. En la tira donde se encuentran las 50 fuentes de carbono se añadieron 200 µL/pocillo del medio de API® 50 CHL suplementado con las bacterias y se incubó en una jarra de anaerobiosis a 37ºC durante 48h.

La interpretación de los resultados después del tiempo de incubación se detectó mediante colorimetría, en el cual el color amarillo del medio es positivo e indica que se ha fermentado la fuente de carbono, mientras que si el medio mantiene el color azul el resultado es negativo

4.5 Evaluación del consumo de HMOs

El consumo de HMOs de las cepas de *Bifidobacterium* se evaluó mediante el medio de cultivo MRS sin dextrosa que se suplementó con 0,2% de glu, 2% de HMO de interés (2'FL, LNT, 6'SL) y 0,05% de cys en una placa de 96 pocillo con un volumen final de 200 µL/pocillo. Como control positivo se utilizó tanto medio MRS completo como medio MRS sin dextrosa suplementado con 0,2% de glu.

Los cultivos de *Bifidobacterium* se ajustaron a una DO inicial de 0,1 y se incubaron 24h a 37ºC en anaerobiosis. Tras este tiempo se midió la $DO_{600nm\ y}$ la capacidad de utilización de cada HMO se analizó a partir de la comparación estadística entre la absorbancia obtenida en cada tratamiento y la del control basal (MRS sin dextrosa + 0,2% glu) por triplicado, Anexo 1.

4.6 Evaluación de la resistencia a tetraciclina

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de tetraciclina para cada cepa de *Bifidobacterium* se realizó en placas de 96 pocillos. Se suplementó medio MRS 0,05% cys con concentraciones crecientes de tetraciclina (0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml y 64 µg/ml). Los pocillos se inocularon con las cepas *Bifidobacterium*, ajustando previamente el cultivo a DO 0,1, y se incubaron las placas 48h en anaerobiosis. Además, se añadió un control positivo con medio sin antibiótico y un control negativo de medio sin inocular. Tras la incubación, se leyeron las placas en el espectrofotómetro y se evaluó la concentración de antibiótico donde dejó de crecer en comparación con el control. El ensayo se realizó por triplicado por cada cepa estudiada.

4.7 Determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)

La determinación de los SCFAs se llevó a cabo en base al protocolo descrito por Eberhart *et al*., (2021) a partir de los sobrenadantes de las cepas de *Bifidobacterium* en medio MRS 0,05% cys y medio GAM.

En primer lugar, se preparó el estándar interno (SI) incluido en todas las muestras con ácido 3-metilvalérico a una concentración de 5 mM. La solución stock de 10 mM se diluyó con agua ultrafiltrada y ácido clorhídrico (Merck, 7647-01-0) al 32%. Por otra parte, se preparó una recta patrón a partir de una solución madre compuesta por 8 SCFAs (ácido acético (Sigma-Aldrich, A6283), ácido propiónico (Sigma-Aldrich, 402907), ácido butírico (Sigma-Aldrich,

B103500), ácido isobutírico (Sigma-Aldrich, I1754), ácido isovalérico (Sigma-Aldrich, 129542), ácido valérico (Sigma-Aldrich, 240370), ácido caproico (Sigma-Aldrich, 21529) y ácido fórmico (Sigma-Aldrich, 211529)) a una concentración de 100 mM, de la cual se obtuvieron diluciones seriadas (0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 2 mM , 4 mM, 10 mM, 20 mM).

Tras preparar las soluciones, se llevó a cabo la extracción de los SCFAs siguiendo el siguiente protocolo: se mezcló 800 µL de solución SI, 1 mL de dietiléter anhidro (Sigma-Aldrich, 346136) y 200 µL del sobrenadante. Después, se añadió una pequeña cucharada de sulfato sódico anhidro (Sigma-Aldrich, 238597), equivalente a 5-10 mg, con el objetivo de desecar la muestra, y se agitó en vórtex (IKA, 3340000) durante 10 segundos. Luego, se centrifugó, en una centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5424R) a 16000 g durante 2 minutos a 4 ºC y se transfirieron al menos 200 µL de la fase orgánica a los viales de cromatografía de 2 mL (Agilent, 5182-0714).

El blanco se preparó siguiendo el mismo protocolo de extracción utilizado para la recta patrón empleando medio MRS o GAM en vez del sobrenadante de las bacterias. Todo el protocolo se llevó a cabo en hielo para evitar la pérdida de compuestos volátiles en el proceso de extracción.

El análisis de las muestras se realizó mediante GC-MS en un sistema Agilent GC 7890B-5977 equipado con un muestreador múltiple (Gerstel MPS) y una columna Agilent DB-FATWAX de 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. El programa de temperatura del horno se estableció del siguiente modo: 100 °C durante 3 min, seguido de un aumento a 100 °C a una velocidad de 5 °C por minuto; posteriormente, la temperatura se elevó hasta 150 °C durante 1 min; después, se incrementó hasta 200 °C a una velocidad de 20 °C por minuto; y, por último, se mantuvo a 200 °C durante 5 min. El helio se utilizó como gas portador con un flujo de 1 mL por minuto. Finalmente, se identificaron los espectros de los SCFAs con la biblioteca de espectros NIST y se cuantificó la producción de SCFAs mediante el programa MassHunter Quantitative Analysis (Agilent).

4.8 Evaluación del efecto antimicrobiano del sobrenadante frente a patógenos potenciales

En primer lugar, se crecieron cultivos de las cepas de *Bifidobacterium* en medio MRS y GAM a 37 ºC en anaerobiosis durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron los cultivos, se separó el sobrenadante y se filtró por filtros de 0,22 µm. Seguidamente, se determinó el pH mediante un pHmetro de los sobrenadantes y de los medios LB y BHI suplementados con 10% de sobrenadante.

Por otra parte, se crecieron cultivos de *Listeria innocua y Staphylococcus aureus* en medio BHI, y *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* en medio LB, todos a 37 ºC en aerobiosis con agitación durante 24h. Tras el crecimiento, se lavaron los cultivos con PBS para eliminar restos de los medios de cultivo. El ensayo del efecto antimicrobiano en las 4 bacterias se realizó mediante cinéticas de crecimiento en placas de 96 pocillos ajustando la DO_{600nm} inicial a 0,05, usando medio LB y BHI suplementado con un 10% de los sobrenadantes de las 14 cepas de *Bifidobacterium* crecidas en medio MRS y GAM, realizando cada cinética por triplicado. Además, se añadió un control positivo inoculando medio sin suplementar (LB o BHI), un control negativo sin inocular y un control de pH añadiendo al medio ácido acético hasta alcanzar el mismo pH que presentaba el medio suplementado con el sobrenadante, este valor fue entorno a un pH de 4,8. La DO se midió en un espectrofotómetro realizando medidas cada 30 minutos durante 24 horas, incubando las placas a 37 ºC y agitando antes de cada medida. El protocolo también se llevó a

cabo con sobrenadantes neutralizados, pH 7, utilizando NaOH (Sigma-Aldrich, S2770). Todas las cinéticas se realizaron por triplicado.

4.9 Ensayos de conjugación de plásmidos

El ensayo se conjugación se llevó a cabo modificando el protocolo descrito por Hüttener et al., (2019). Se usó la cepa donadora *E. coli* MG1655 transformada con el plásmido pKAZ3 (Accession number KR827392) que presenta un gen de resistencia a tetraciclina. Como cepa receptora se usó *E. coli* MG1655 *lacZ*, en la cual el gen *lacZ* se ha sustituido por un gen de resistencia a cloranfenicol.

Las conjugaciones se realizaron en presencia de sobrenadantes de las cepas de *Bifidobacterium* seleccionadas. En todos los ensayos, los cultivos de la cepa donadora y receptora se lavaron 2 veces con PBS, descartando el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en LB sin antibiótico ajustando la concentración bacteriana a DO_{600nm} 1. La conjugación se llevó a cabo mezclando 200 µL de la cepa donadora y 200 µL de la receptora y diferentes concentraciones de sobrenadante dependiendo del ensayo y se incubó 2h a 37ºC en estático. Después de la incubación, se realizó un banco de diluciones utilizando PBS como disolvente. Se sembraron por duplicado las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} en placas suplementadas con los 2 antibióticos y X-Gal para crecer los transconjugantes, las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} se sembraron en placas con tetraciclina y X-Gal para conocer el número de donadoras que hay en el cultivo, incubando las placas 24h a 37ºC. Al día siguiente se realizaron los recuentos de cada una de las placas y la tasa de conjugación se calculó dividiendo el número de transconjugantes frente al número de donadores.

4.10 Análisis estadístico y bioinformático de los datos

La estadística de los ensayos de adhesión a mucina, inhibición del crecimiento de bacterias con potencial patógeno e inhibición de la conjugación plasmídica se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples mediante el software GraphPad Prism 10 (*GraphPad Prism*, 2023), detectando las diferencias significativas entre el control y los resultados en cada una de las 14 cepas considerándose significativos los valores con un p-valor<0,05. En el caso de la cuantificación de SCFAs, se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples en GraphPad Prism 10 para saber si las diferencias de concentración de SCFAs respecto al control eran significativas.

El perfil metabólico y funcional de las cepas se analizó conjuntamente mediante un análisis de componentes principales (PCA) con el programa R(*R Core Team*, 2024) , donde se compararon las 14 cepas frente a 56 variables distintas donde se incluyeron las 53 fuentes de carbono, incluidos los HMOs, los dos ensayos a mucina (4ºC y 37ºC) y la concentración mínima inhibitoria de tetraciclina. El PCA se ejecutó con la función “prcomp()” del paquete base *stats* de R (*R Core Team*, 2024), con centrado y escalado previo de las variables (z-score), de este modo todas las variables contribuyen al análisis con el mismo peso. El biplot se generó con la función “fviz_pca_biplot()” extraído del paquete *factoextra* (Kassambara y Mundt, 2020). Además, se representaron solo las 20 variables con mayor contribución a los dos primeros componentes principales para facilitar la interpretación. Los dos primeros componentes explicaron, respectivamente, el 30,9 % y el 18,7 % de la varianza total (49,6 % acumulado).

Las 14 cepas de *Bifidobacterium* se representaron mediante un dot plot integrado para agrupar los resultados de todos los ensayos realizados en este trabajo. Los porcentajes de

inhibición del crecimiento en sobrenadante de GAM se derivaron de las áreas bajo la curva (AUC) de las cinéticas de crecimiento mediante la expresión % inhibición = ((AUC_control − AUC_muestra)/AUC_control) × 100, conservando los valores negativos cuando la cepa crecía por encima del control. Cada variable se normalizó por el método mín–máx al intervalo [0, 1], invirtiéndose la escala del pH (menor pH = mayor capacidad acidificante). En los bloques de inhibición del crecimiento y de SCFA se aplicó una normalización mín–máx global, empleando un mínimo y un máximo comunes a todas las variables del bloque, de modo que el tamaño del punto fuera comparable entre patógenos, medios y entre los distintos ácidos; el resto de variables se normalizaron de forma individual. La figura se generó en R (R Core Team, 2024) con los paquetes *tidyverse* (Wickham et al., 2019), que incluye *dplyr* (Wickham et al., 2023) y *tidyr* (Wickham et al., 2024) para el procesamiento de los datos y *ggplot2* (Wickham, 2016) para la representación mediante “geom_point” y “facet_grid”. Por otra parte, se utilizó el paquete *patchwork* (Pedersen, 2024) para la composición de paneles y *cowplot* (Wilke, 2024) para las anotaciones de título y la leyenda superior.

En la elaboración de este trabajo se han utilizado herramientas de inteligencia artificial como apoyo para tareas de redacción, corrección lingüística y organización de información. El contenido final, revisión crítica y elaboración del trabajo corresponden íntegramente al autor de este trabajo, Borja Hidalgo García.

5. Resultados

5.1 Adhesión a mucina

La adhesión a mucina constituye una característica de gran relevancia en bacterias intestinales, ya que influye en su capacidad de interactuar con las células epiteliales y colonizar de forma estable el ambiente intestinal. La adhesión a mucina estudiada en 14 cepas de *Bifidobacterium,* fue analizada con el objetivo de evaluar este potencial de forma independiente entre cepas, evaluando esta capacidad bajo dos condiciones experimentales que permitían observar diferentes estados fisiológicos (Figura 5).

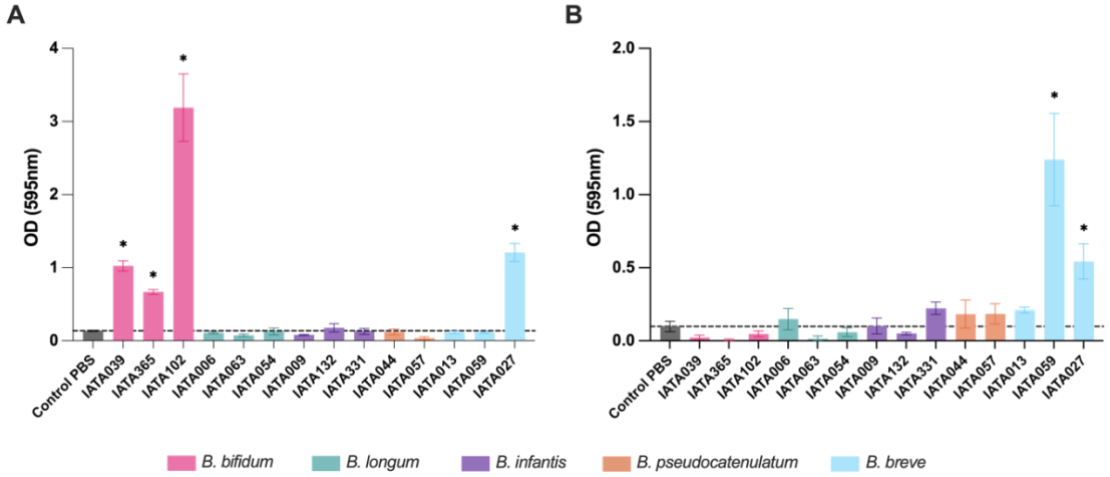


Figura 5. Capacidad de adhesión a mucina de 14 cepas de *Bifidobacterium*. (A) Ensayo de adhesión tras incubación a 4ºC durante 24 h. (B) Ensayo de adhesión con bacterias metabólicamente activas tras incubación durante 2 h a 37 °C. La adhesión se expresó como absorbancia a 595 nm tras tinción con cristal violeta. La línea discontinua indica el valor del control. Los colores identifican las distintas especies de *Bifidobacterium*. Las barras representan la media y las líneas de error la variabilidad entre réplicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control correspondiente (*p<0,05).

En el ensayo de 24 h a 4ºC, las tres cepas de *B. bifidum* presentaron los valores más elevados de adhesión, esto indica una alta capacidad de interacción con la mucina. Entre ellas, *B. bifidum* IATA102 fue la cepa que mostró valores de adhesión más altos. Además, *B. breve* IATA027 presentó también una adhesión significativamente superior al control, aunque en menor proporción en comparación con las cepas de *B. bifidum*. El resto de las cepas mostraron valores de adhesión similares al control (Figura 5A).

Cuando la adhesión se evaluó en condiciones que permitían mantener a las bacterias metabólicamente activas durante 2 h a 37ºC en un ambiente anaeróbico, el patrón observado cambió de forma evidente. En estas condiciones, las cepas de *B. bifidum* dejaron de mostrar el grado de adhesión que se observó en el ensayo de 24 h, mientras que varias cepas de *B. breve* incrementaron su capacidad de unión, destacando entre ellas *B. breve* IATA059 (Figura 5B).

Los resultados muestran la existente variabilidad en la capacidad de adhesión a mucina entre las cepas de *Bifidobacterium*, así como una dependencia en función de las condiciones experimentales. Las diferencias observadas entre ambos ensayos sugieren que la adhesión puede estar influida por el estado fisiológico bacteriano, aunque los mecanismos asociados requieren ser investigados.

5.2 Perfil metabólico de *Bifidobacterium*

Utilizar diferentes fuentes de carbono representa un rasgo clave en la adaptación de *Bifidobacterium* en el microbioma intestinal, destacando su importancia en las primeras etapas de vida del intestino del lactante. Mediante tiras API® 50 CHL y ensayos específicos de consumo de HMOs, se analizó el perfil metabólico que existía entre las diferentes cepas.

El análisis del perfil metabólico de fuentes de carbono y HMOs reveló una elevada heterogeneidad en la utilización de fuentes de carbono entre las cepas de *Bfidobacterium* (Figura 6). A pesar de esta variabilidad, se identificó un grupo común de fuentes de carbono que eran muy utilizadas, entre los que destacan D-galactosa, D-glucosa y D-fructosa, así como D-manosa en la mayoría de los aislados. Además, varias fuentes de carbono que presentan una mayor complejidad, como N-acetilglucosamina, amigdalina, esculina, D-celobiosa, D-lactosa y D-maltosa, fueron utilizadas por un número elevado de cepas, aunque con diferencias puntuales entre los aislados (Figura 6). Por otra parte, hubo fuentes de carbono que presentaron un uso más limitado o discontinuo, esto evidencia la heterogeneidad y especificidad que existe entre las cepas de *Bifidobacterium*. Este comportamiento fue especialmente relevante en relación con los HMOs, donde se observó un uso diferencial de estos carbohidratos propios del entorno materno-infantil. El LNT fue utilizado por todas las cepas analizadas, esto evidencia una capacidad que se distribuye de forma eficiente entre todas las cepas del estudio. En cambio, el 2'FL solo fue metabolizado por *B. infantis* IATA009 e IATA132, mientras que 6'SL no fue utilizado por ninguna de las cepas. Esta variabilidad, tanto en la amplitud como en la especificidad de los sustratos utilizados, sugiere distintos grados de adaptación a los recursos disponibles en el entorno intestinal, particularmente en relación con los HMOs (Figura 6, Anexo 1).

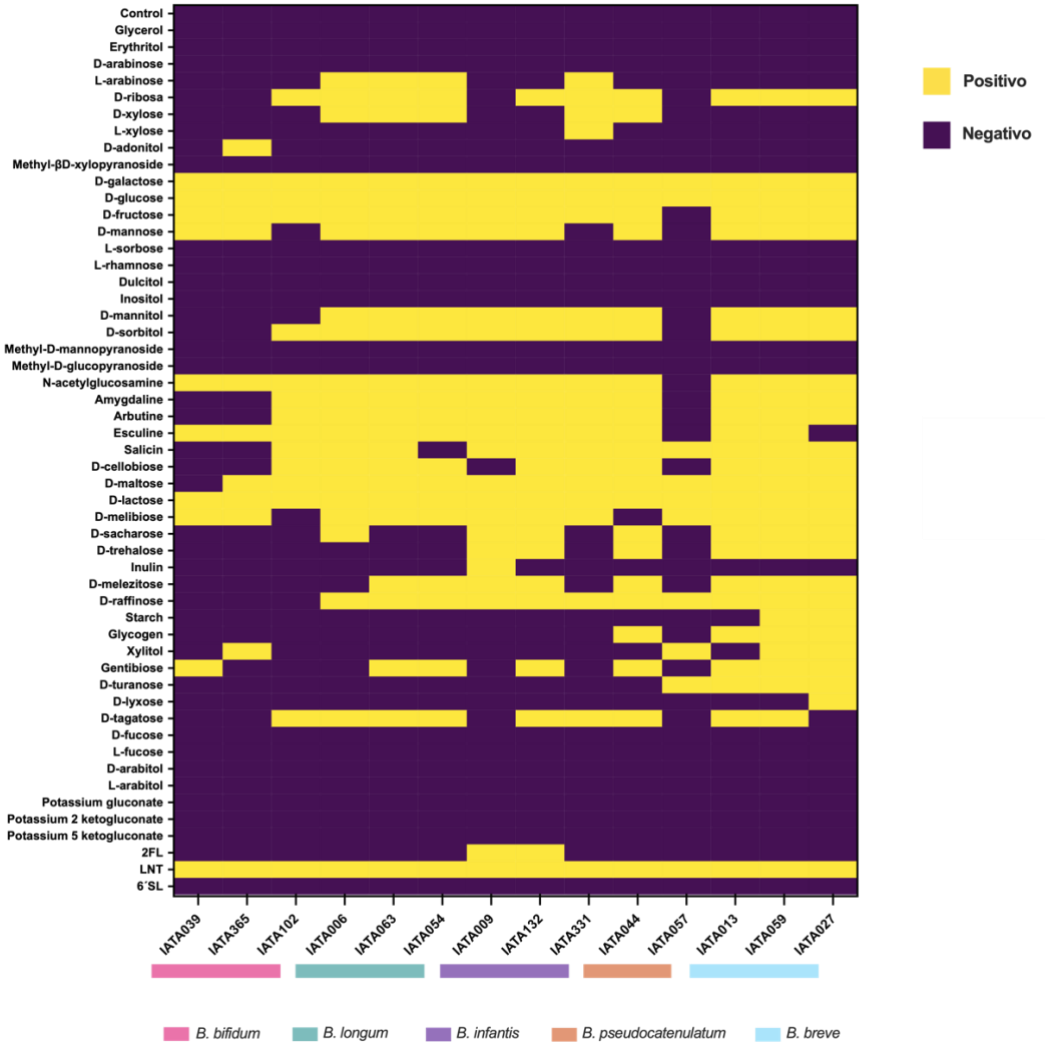


Figura 6. Perfil metabólico de utilización de fuentes de carbono y HMOs por cepas de *Bifidobacterium*. Las filas corresponden a los distintos sustratos evaluados y las columnas a las cepas analizadas. El color amarillo indica consumo positivo, mientras que el color morado indica consumo negativo. Se incluyeron los HMOs 2'-fucosilactosa (2'FL), lacto-*N*-tetraosa (LNT) y 6'-sialilactosa (6'SL).

5.3 Resistencia a tetraciclina

Bifidobacterium spp. se asocia con un microbioma infantil más estable y con menor carga de genes de resistencia, pero la sensibilidad a antibióticos no es homogénea dentro del género. En este caso, la tetraciclina representa un antibiótico de interés debido a la resistencia que presentan algunas cepas, independientemente de la especie.

La evaluación del crecimiento en presencia de tetraciclina mostró un amplio gradiente de sensibilidad entre las cepas estudiadas. Las cepas de *B. bifidum* y la mayoría de las de *B. longum* presentaron crecimiento únicamente a concentraciones bajas del antibiótico, lo que sugiere una gran sensibilidad. Resultados similares se observaron en *B. infantis* IATA009, *B. pseudocatenulatum* IATA057 y *B. breve* IATA013. Por otra parte, *B. infantis* IATA132 e IATA331, al igual que *B. breve* IATA059, mostraron crecimiento a concentraciones intermedias-altas, mientras que *B. pseudocatenulatum* IATA044 y *B. breve* IATA027 fueron las cepas con mayor tolerancia, manteniendo su crecimiento hasta una concentración de tetraciclina de 32 µg/mL (Figura 7).

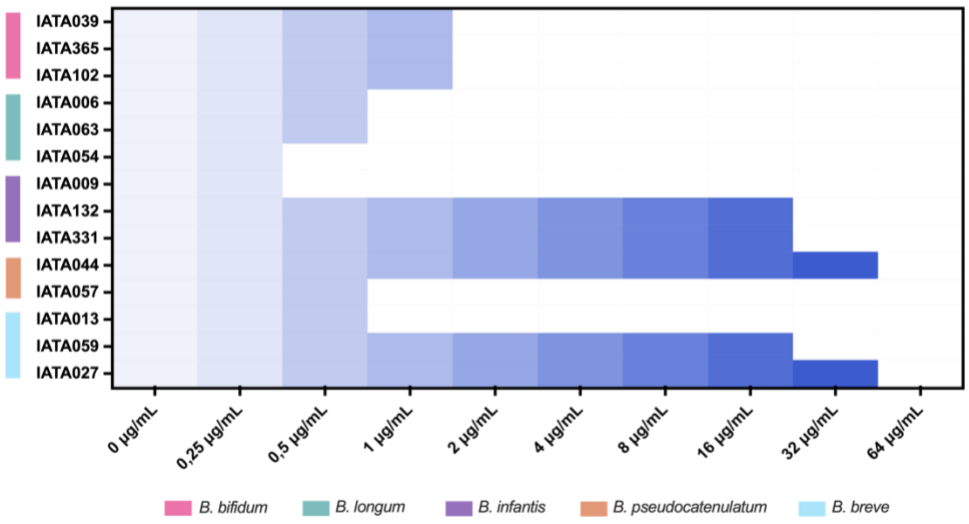


Figura 7. Crecimiento de cepas de *Bifidobacterium* en presencia de tetraciclina. La intensidad del color refleja el crecimiento residual detectado en cada condición y permite estimar la MIC de cada aislado. Las filas corresponden a las cepas y las columnas a las concentraciones de tetraciclina ensayadas.

5.4 Determinación de la producción de SCFAs

Los SCFAs son metabolitos clave producidos por *Bifidobacterium* durante la fermentación de carbohidratos en el intestino. Su presencia en el microbioma intestinal contribuye a reducir el pH y la composición microbiana, por lo que su cuantificación permite evaluar diferencias relevantes entre cepas.

La cuantificación de SCFAs mostró que el ácido acético fue el principal metabolito producido por las cepas de *Bifidobacterium* en los medios seleccionados (Figura 8). En medio MRS, la producción de acetato fue claramente superior a la del resto de compuestos analizados y presentando una notable variabilidad entre cepas, destacando *B. infantis* IATA132, *B. infantis* IATA331 y *B. bifidum* IATA365 como los mayores productores de ácido acético (Figura 8A). En

medio GAM, el mismo patrón general se mantuvo en las cepas seleccionadas, aunque con concentraciones menores en comparación con el medio MRS (Figura 8B). En cambio, los ácidos propanoico y butanoico se detectaron en cantidades mucho menores y con un patrón más irregular entre cepas, lo que confirmó que el perfil fermentativo en las condiciones estudiadas está dominado por acetato (Figuras 8C y 8D).

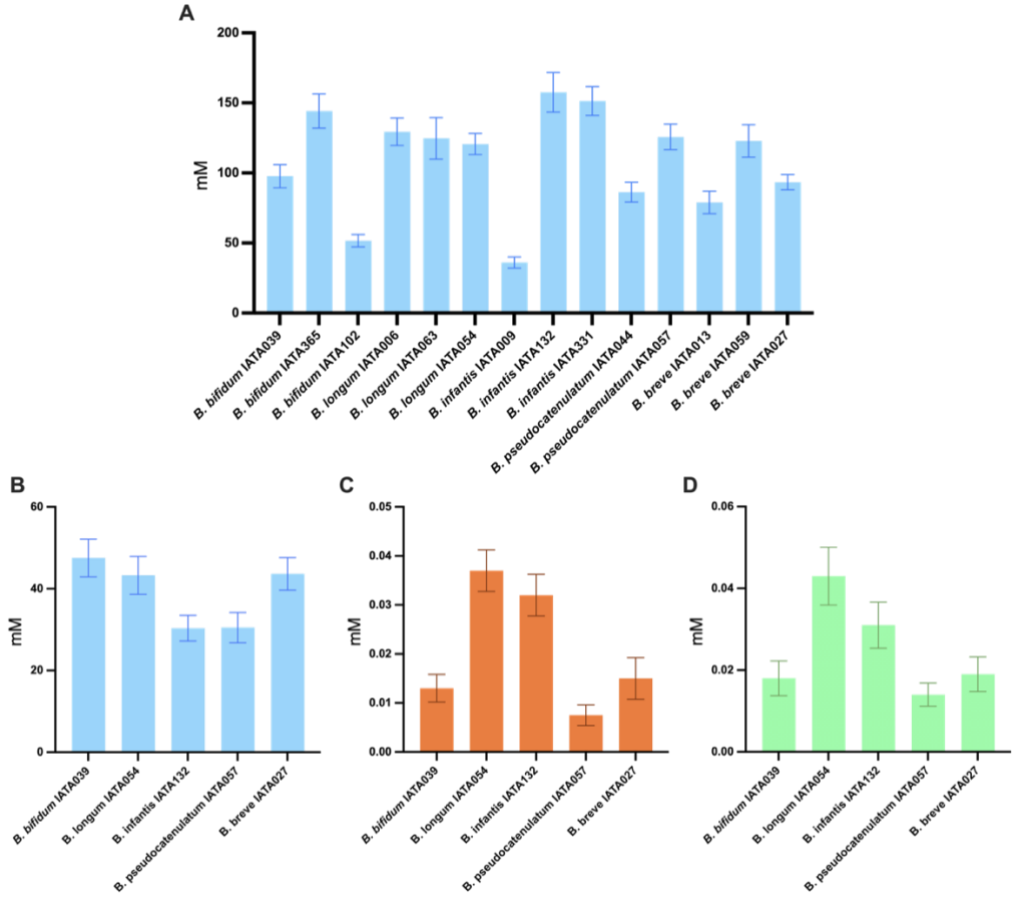


Figura 8. Cuantificación de SCFAs mediante GC-MS en sobrenadantes de cultivos de *Bifidobacterium*. (A) Producción de ácido acético en medio MRS. (B) Producción de ácido acético en medio GAM en las cinco cepas seleccionadas. (C) Producción de ácido propanoico en medio GAM. (D) Producción de ácido butanoico en medio GAM.

5.5 Integración funcional para la selección de cepas candidatas

Se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) para integrar los resultados obtenidos de adhesión a mucina, uso de fuentes de carbono y resistencia a tetraciclina, explicando el 49,6 % de la varianza total (Figura 9, PC1 = 30,9 %; PC2 = 18,7 %). La mayoría de las cepas se agruparon según las características de la especie, donde *B. bifidum* en el cuadrante izquierdo, asociada a un perfil fermentativo más restringido; *B. longum* y *B. infantis* en la zona central superior, próximas a los vectores de pentosas y disacáridos (D-xilosa, D-tagatosa, D-celobiosa); y *B. breve* desplazada al cuadrante inferior derecho, asociada al consumo de poliosas (almidón, glucógeno, D-turanosa). *B. pseudocatenulatum* fue la única especie con una clara dispersión interna entre sus dos aislados, ocupando posiciones contrastadas en el plano (Figura 9). Teniendo en cuenta esta distribución, se seleccionaron 5 cepas con el objetivo de cubrir el mayor número de características y funciones entre las cepas. La selección priorizó la inclusión de una cepa de cada especie con el fin de poder evaluar la posible diferencia entre especies y por otro lado evaluar la variabilidad dentro de la misma especie, eligiendo aquellas cepas con características aisladas. Esta estrategia permitió constituir un subconjunto reducido pero

representativo, en el que cada cepa aporta un perfil funcional distintivo y, en consecuencia, un potencial mecanismo de acción potencialmente diferenciado frente a la evaluación de los ensayos futuros. Las cepas seleccionadas fueron las siguientes: *B. bifidum* IATA039*, B. longum* IATA054*, B. infantis* IATA132*, B. pseudocatenulatum* IATA057 *y B. breve* IATA027.

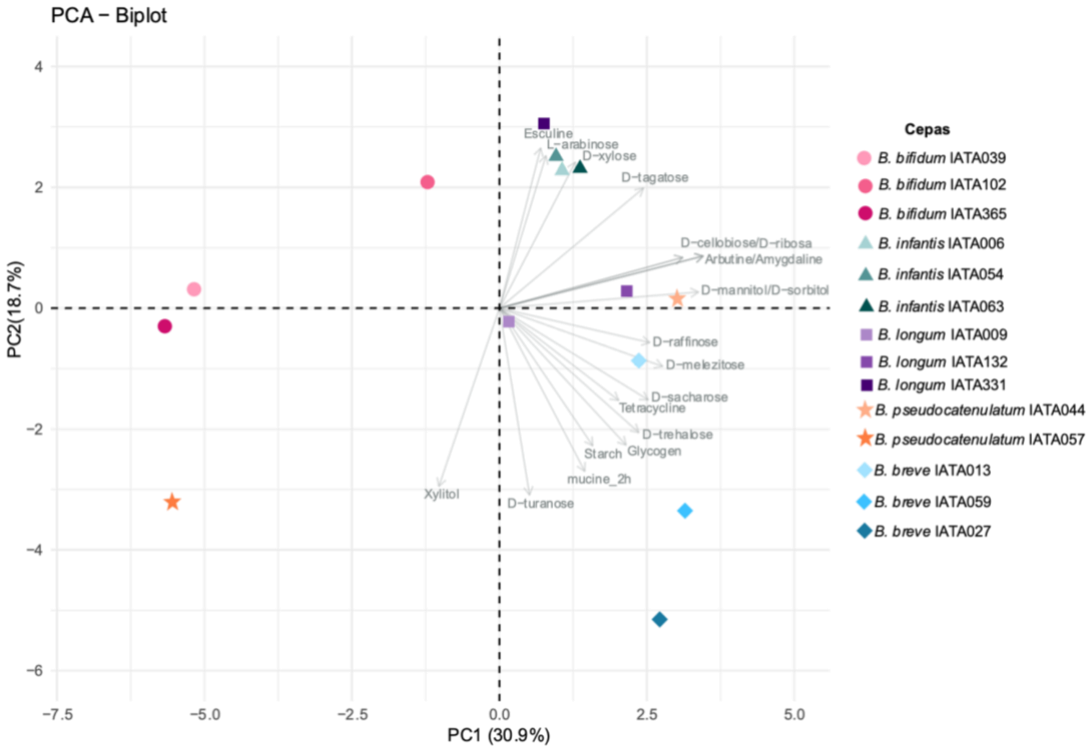


Figura 9. Análisis de componentes principales (PCA) de las catorce cepas de *Bifidobacterium* a partir de 53 variables (fuentes de carbono, adhesión a mucina y resistencia a tetraciclina). Se representan las 20 variables con mayor contribución a PC1 (30,9 %) y PC2 (18,7 %). Las cepas se colorean por especie y las elipses delimitan cada grupo.

5.6 Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes

Bifidobacterium spp. puede producir metabolitos extracelulares capaces de modificar el crecimiento de otras bacterias, por lo que se evaluó la actividad antimicrobiana de sus sobrenadantes frente a bacterias con potencial patógeno (Anexo 2). Además, se evaluaron condiciones que podrían aumentar como disminuir este efecto, como el medio de cultivo, el nivel de acidificación o incluso la bacteria diana.

Los sobrenadantes libres de células que se obtuvieron tras el cultivo en medio MRS redujeron significativamente el crecimiento de las bacterias seleccionadas, aunque la magnitud del efecto antimicrobiano varió tanto entre las bacterias con potencial patógeno como entre las cepas de *Bifidobacterium* (Figura 10). Frente a *Escherichia coli*, todos los sobrenadantes provocaron una disminución significativa del AUC respecto en control, siendo *B. bifidum* IATA102 la que presentó menor efecto inhibitorio (Figura 10A). En *Salmonella typhimurium*, también se observó una inhibición significativa en la mayoría de los sobrenadantes, aunque con una respuesta más variable entre cepas donde *B. bifidum* IATA102 fue la cepa con menos efecto (Figura 10B). En *Staphylococcus aureus* la reducción del crecimiento fue más homogénea entre las cepas, mientras que en *Listeria innocua* el efecto continuó siendo significativo pero más moderado, con valores de AUC más próximos al control, siendo de todas las bacterias seleccionadas la que mostró una menor inhibición del crecimiento en presencia de los sobrenadante (Figuras 10C y 10D)

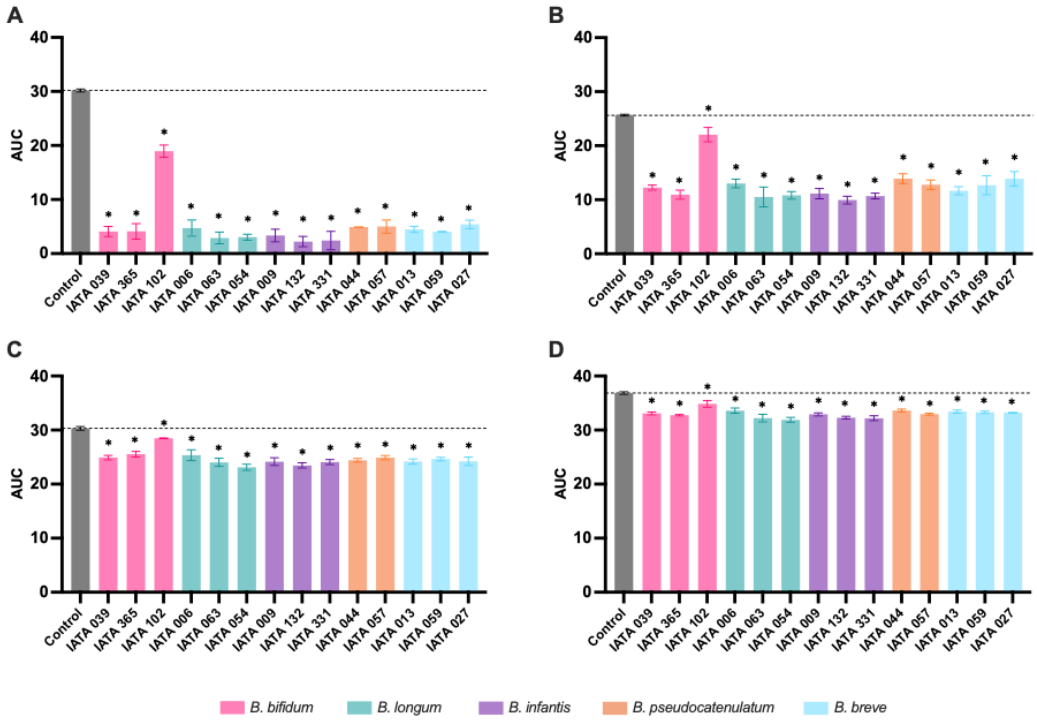


Figura 10. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes obtenidos en medio MRS frente a bacterias con potencial patógeno. Se realizaron cinéticas de crecimiento de las bacterias seleccionadas, expresado como área bajo la curva (AUC). (A) *Escherichia coli*. (B) *Salmonella* typhimurium. (C) *Staphylococcus aureus* (D) *Listeria innocua*. La línea discontinua indica el valor del control sin sobrenadante. Los colores identifican las distintas especies de *Bifidobacterium*. Las barras representan la media y las líneas de error la variabilidad entre réplicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*p<0,05).

Cuando se evaluaron los sobrenadantes extraídos a partir del cultivo en medio GAM de las cepas de *Bifidobacterium*, se observó una actividad antimicrobiana mucho más limitada (Figura 11). Los valores de AUC de *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. aureus*, se mantuvieron cercanos al control, incluso en algunos casos superándolo (Figuras 11A, 11B y 11C.) Sin embargo, frente a *L. innocua* se observó una disminución significativa del AUC en todas las cepas evaluadas (Figura 11D).

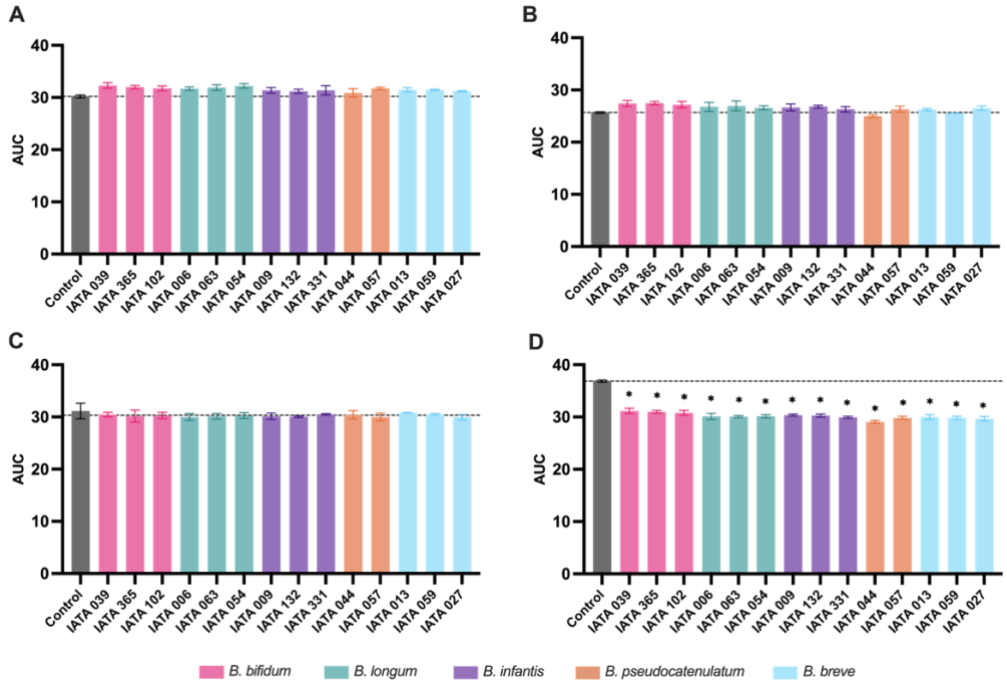


Figura 11. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes obtenidos en medio GAM frente a bacterias con potencial patógeno. Se realizaron cinéticas de crecimiento de las bacterias seleccionadas, expresado como área bajo la curva (AUC). (A) *Escherichia coli*. (B) *Salmonella typhimurium*. (C) *Staphylococcus aureus*. (D) *Listeria innocua*. La línea discontinua indica el valor del control sin sobrenadante. Los colores identifican las distintas especies de *Bifidobacterium*. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*p<0,05).

La contribución de pH (Anexo 3) y otros metabolitos presentes en el sobrenadante se evaluó mediante un control acidificado a un pH de 4,8 y neutralizando los sobrenadantes, para ello *E. coli* fue seleccionada como la bacteria de estudió debido a que había sido la bacteria donde más efecto habían tenido los sobrenadantes. En este ensayo solo se usaron las 5 cepas de *Bifidobacterium* seleccionadas previamente con el PCA (Figura 9). El control a pH ácido redujo el crecimiento bacteriano mostrando una inhibición significativamente mayor frente a los sobrenadantes de *Bifidobacterium* (Figuras 12A y 12B). Cuando *E. coli* se sometió al cultivo con los sobrenadantes neutralizados, se observó que estos dejaron de presentar el efecto inhibitorio que se había observado en los anteriores ensayos. *B. longum* IATA054 fue la única cepa que mostró una reducción significativa del crecimiento, pero de una forma mucho más moderada. En el resto de sobrenadantes *E. coli* presentó un crecimiento similar respecto al control (Figuras 12C y 12D).

Estos resultados indican que los sobrenadantes de *Bifidobacterium* presentan actividad antimicrobiana dependiente de la cepa, del medio de cultivo y de la bacteria diana. El efecto parece estar principalmente asociado a la acidificación del medio, aunque la inhibición residual tras la neutralización sugiere que otros metabolitos extracelulares podrían contribuir de forma secundaria.

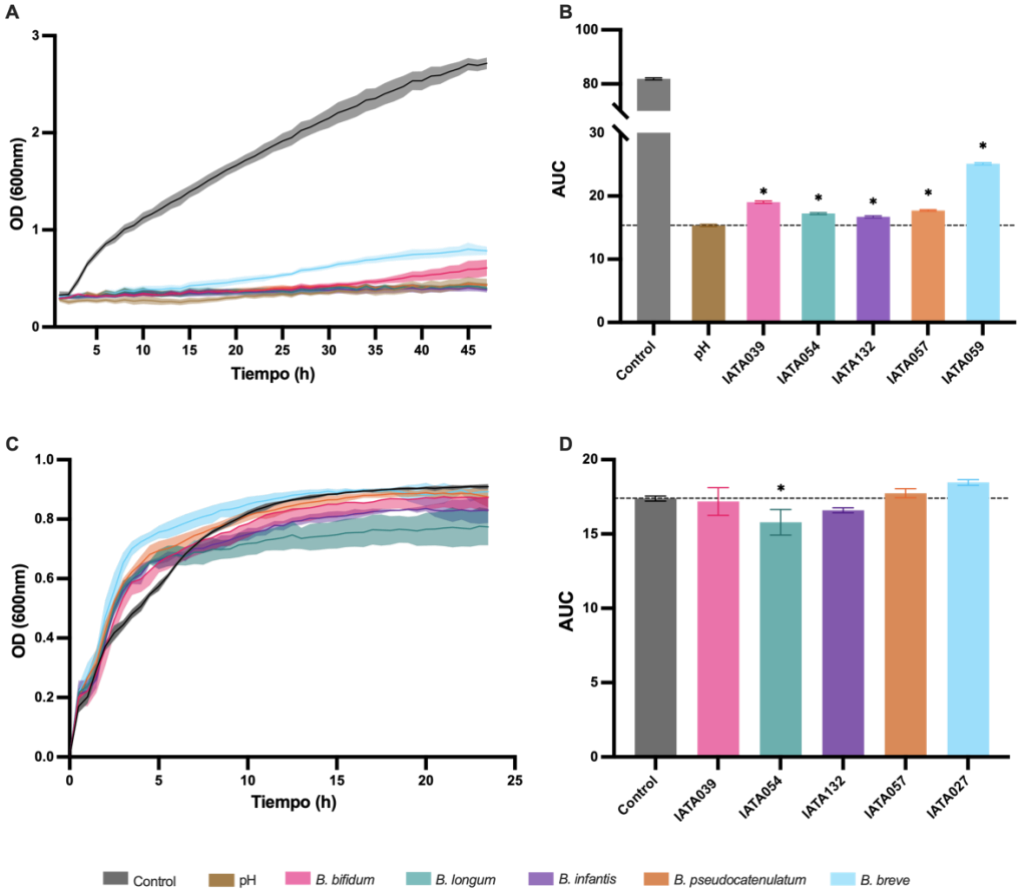


Figura 12. Actividad antimicrobiana de los metabolitos y el pH de los sobrenadantes obtenidos en medio MRS frente *E. coli*. (A) Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* con control de pH 4,8. (B) AUC de la cinética de

crecimiento de *Escherichia coli* con control de pH 4,8. (C) Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* con los sobrenadantes neutralizados. (D) AUC de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* con los sobrenadantes neutralizados. La línea discontinua indica el valor del control sin sobrenadante. Los colores identifican las distintas especies de *Bifidobacterium*. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*p<0,05).

5.7 Efecto del sobrenadante en la conjugación bacteriana

Se evaluó la frecuencia de conjugación en presencia de sobrenadantes de cepas de *Bifidobacterium* obtenidos en diferentes condiciones de cultivo, con el objetivo de evaluar si los metabolitos extracelulares sintetizados por estas cepas pueden influir en la transferencia horizontal de genes de resistencia. Dado que la conjugación se encuentra entre uno de los mecanismos principales en la diseminación de genes de resistencia, la capacidad de ciertas bacterias intestinales para reducir este proceso podría presentar un mecanismo adicional de control en el resistoma intestinal.

La frecuencia de conjugación se expresó como $\log_{10}$ fold change respecto al control, estableciendo este como línea basal (valor 0), de modo que los valores negativos indican una reducción de la conjugación. La línea discontinua situada en -4 representa el límite inferior de detección del ensayo, es decir, los valores situados en este punto corresponden a condiciones en las que no se detectaron transconjugantes bajo las condiciones evaluadas, sin que ello implique necesariamente una inhibición absoluta de la conjugación (Figura 13).

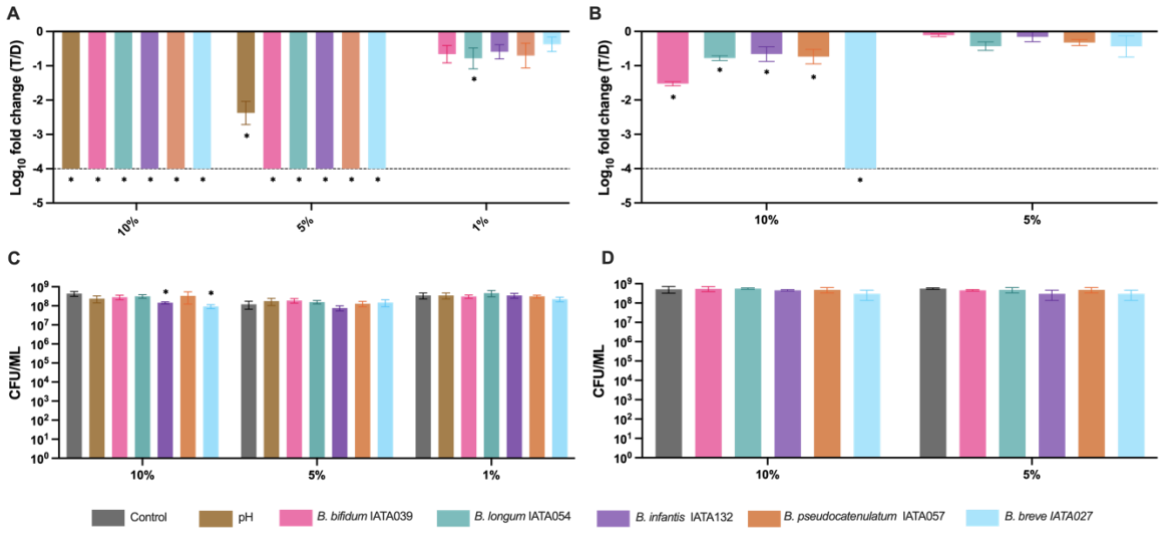


Figura 13. Efecto de los sobrenadantes de *Bifidobacterium* sobre la conjugación bacteriana y la viabilidad de las bacterias donadoras. (A) Log_{10} fold change de la frecuencia de conjugación en presencia de sobrenadantes de MRS al 10%, 5% y 1%. (B) Log_{10} fold change de la frecuencia de conjugación en presencia de sobrenadantes de GAM al 10% y 5%. (C) Recuento de bacterias donadoras en los ensayos con sobrenadantes de MRS. (D) Recuento de bacterias donadoras en los ensayos con sobrenadantes de GAM. El control se representa como línea basal en 0; los valores negativos indican reducción de la conjugación. La línea discontinua en -4 indica el límite inferior de detección del ensayo, correspondiente a condiciones en las que no se detectaron transconjugantes. Las barras muestran la media ± desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*$p < 0,05$).

Los sobrenadantes obtenidos en medio MRS presentaron una reducción muy marcada de la frecuencia de conjugación a una concentración del 10% en todas las cepas analizadas, alcanzando en todos los casos el límite inferior de detección en el ensayo. Este efecto fue constante tanto en el sobrenadante de las cepas como en el control acidificado a un pH de 4,8. Al disminuir la concentración al 5%, la inhibición de la conjugación se mantuvo en todos los sobrenadantes, pero el control acidificado a un pH de 5,6 mostró cambios reduciendo su

inhibición respecto a las cepas, manteniendo aun así una inhibición significativa frente al control. En cambio, a una concentración del 1%, el efecto fue considerablemente menor, siendo *B. longum IATA054* la única cepa cuyo sobrenadante mostró una inhibición significativa. Además, el control acidificado a un pH de 6,8 presentó los mismos valores que el control situándose en la línea basal 0 (Figura 13A). El recuento de donadoras en estos ensayos de conjugación se mantuvo estable y similar a los valores que presentaba el control, donde únicamente en el ensayo de MRS al 10% los sobrenadantes de *B. longum* IATA054 y *B. breve* IATA027 presentaron una reducción significativa en el número de bacterias donadoras (Figura 13C).

Los sobrenadantes obtenidos en medio GAM mostraron una reducción de la frecuencia de conjugación, aunque de menor magnitud y con mayor variabilidad entre cepas que en MRS. A una concentración del 10%, la mayoría de los sobrenadantes produjo reducciones moderadas, siendo *B. breve* IATA027 la única que alcanzó el límite inferior de detección. Al 5%, el efecto inhibitorio disminuyó de forma general, con valores próximos a 0 en la mayoría de las condiciones (Figura 13B). El recuento de bacterias en GAM mostraba un perfil muy similar al de MRS donde todas las cepas presentaban valores muy similares respecto al control. Esto indica que la disminución de la conjugación observada en este medio no tiene origen en la pérdida de la viabilidad de las bacterias (Figura 13D).

En conjunto, estos resultados muestran que los sobrenadantes de *Bifidobacterium* reducen la frecuencia de conjugación de forma dependiente de la concentración y del medio de cultivo. En MRS, el efecto fue más intenso y alcanzó frecuentemente el límite de detección del ensayo a concentraciones del 10% y 5%, mientras que en GAM la reducción fue más moderada y dependiente de la cepa. Además, el análisis de las bacterias donadoras indica que la reducción de la conjugación no puede atribuirse exclusivamente a una disminución de la viabilidad celular.

6. Discusión

El objetivo principal de este trabajo se centraba en la caracterización funcional de catorce cepas de *Bifidobacterium* aisladas del entorno materno-infantil, agrupando un total de 5 especies. Los resultados obtenidos muestran la heterogeneidad que existe entre cepas en todas las características evaluadas. Esto confirma que las propiedades funcionales de *Bifidobacterium* no pueden valorarse de forma uniforme entre especies ni entre cepas de una misma especie.

La adhesión a mucina es un factor clave en las primeras etapas de la estabilización del microbioma intestinal y en la eficiencia de colonización y expansión por este nicho (Engevik et al., 2019). Los resultados obtenidos muestran diferencias entre las cepas, incluso se observa un cambio al cambiar también las condiciones. En el ensayo de 24h a 4ºC (Figura 5A), las tres cepas de *B. bifidum* (IATA039, IATA365 y IATA102) presentaron los valores de adhesión más altos, destacando *B. bifidum* IATA102. Además, *B. breve* IATA027 fue la única cepa de otra especie que también mostró valores de adhesión significativos. Esta capacidad de adhesión que caracterizó a las cepas de *B. bifidum* se respalda con estudios donde demostraron que *B. bifidum* se adhiere de forma especialmente intensa al mucus intestinal humano de origen neonatal o infantil, dependiendo el grado de adhesión en base a la edad el huésped (Harata et al., 2021). Se ha descrito que esta afinidad a la mucina está relacionada con la expresión del gen *perB,* que codifica una glicosil hidrolasa de la familia GH136 implicada en la degradación y adhesión a mucina, donde la inhibición de este gen reduce la capacidad de esta especie para crecer en mucina y persistir en el ambiente intestinal (Rizzo et al., 2024). Los resultados de adhesión en el ensayo a 4ºC, donde la bacteria no se encuentra metabólicamente activa, puede explicar que la unión a mucina está relacionada con componentes constitutivos presentes en la membrana celular, esto es compatible por la relación descrita de *B. bifidum* como especialista en ambientes mucosos (Collado et al., 2005).

En cambio, en el ensayo de 2h a 37ºC (Figura 5B), las cepas de *B. bifidum* dejaron de presentar la alta unión a mucina que habían mostrado en el ensayo a 4ºC, en cambio, las cepas de *B. breve* incrementaron su adhesión, destacando *B. breve* IATA059. Este cambio puede sugerir que la adhesión no siempre es una característica dada por componentes expresados de forma constitutiva, sino que puede estar influida por el estado fisiológico de la bacteria. Una hipótesis para explicar este cambio entre condiciones, es que ciertas cepas de *B. breve* metabólicamente activas y en presencia de mucina expresan adhesinas específicas para la adhesión a mucina que no se expresan de manera constitutiva. Esto se sustenta con la idea de que las interacciones de *Bifidobacterium* con la mucosa está regulada por redes de expresión génicas que pueden variar dependiendo de las condiciones (Argentini et al., 2024). Los resultados demuestran que la adhesión a mucina de las cepas de *Bifidobacterium* puede estar inducida por diferentes factores, independientemente de la especie, como el estado fisiológico, la temperatura, la presencia de mucina en el medio o el tiempo de contacto entre la bacteria y la mucina.

Por otro lado, la capacidad de utilizar distintas fuentes de carbono es otro rasgo fundamental en *Bifidobacterium* spp., y la heterogeneidad entre cepas refleja la diversidad metabólica que existe en el microbioma intestinal del lactante (Arzamasov et al., 2025; Lordan et al., 2024). Los resultados obtenidos mediante API® 50 CHL y los ensayos con HMOs respaldan esta afirmación (Figura 6).Se identificó un grupo de fuentes de carbono utilizadas de forma generalizada por la mayoría de las cepas: D-glucosa, D-galactosa, D-fructosa y D-manosa, así como sustratos de mayor complejidad como N-acetilglucosamina, amigdalina, esculina, D-celobiosa, D-lactosa y D-maltosa. Este núcleo metabólico común refleja la adaptación de *Bifidobacterium* a un entorno intestinal rico en azúcares derivados de la dieta y de la degradación de oligosacáridos complejos (Mills et al., 2023). Por otro lado, otras fuentes de carbono mostraron un uso más limitado y variable entre cepas, esto podría explicar la gran adaptación y especialización de este género al microbioma infantil (Figura 6).

El resultado más relevante en relación con el entorno materno-infantil es el patrón de utilización de los tres HMOs evaluados (Figura 6). El LNT, fue metabolizado por todas las cepas, esto indica que el uso de este oligosacárido ampliamente expandido dentro de las especies de *Bifidobacterium.* Este uso generalizado del LNT se respalda por un estudio llevado a cabo por Samarra *et al.* (2025), donde en un estudio con cepas aisladas de la cohorte MAMI, misma de donde proceden las cepas utilizadas en este este ensayo, observaron que la capacidad de degradar HMOs no fucosilados, como el LNT, está muy conservada dentro de este género (Samarra, Renwick, et al., 2025). La metabolización del LNT en el intestino ocurre tanto de forma intracelular como extracelular proporcionando a otras especies productos accesibles favoreciendo el *cross-feeding* (Egan et al., 2014). En cambio, el 2'FL únicamente fue metabolizado por *B. infantis* IATA009 e IATA132, mientras que la otra cepa de esta especie, *B. infantis* IATA331, no metabolizó este HMO. Esta especificidad de *B. infantis* para el uso de HMOs fucosilados como el 2'FL es un rasgo que se ha descrito en varios estudios, en los cuales se describe que esta subespecie presenta un operón genómico que codifica glucosidasas, transportadores de oligosacáridos y rutas catabólicas intracelulares específicas para la degradación de este tipo de carbohidrato (He et al., 2025; Mills et al., 2023). La ausencia de capacidad para poder metabolizar el 2'FL en la cepa IATA331, aun perteneciendo a la misma especie, explica la gran heterogeneidad intraespecífica, como observó He *et al*. (2025) en un estudio sobre *B. infantis* donde el uso de 2'FL variaba considerablemente y lo correlacionaron con la diversidad y el tipo de genes codificantes de glicosil hidrolasas. Estos resultados respaldan la idea de que la capacidad de metabolizar HMOs fucosilados no está garantizada por la especie, sino que requiere verificación a nivel de cepa. Por otra parte, el 6'SL no fue metabolizado por ninguna de las cepas estudiadas. Este resultado no refleja necesariamente una incapacidad general de *Bifidobacterium* para metabolizar este HMO, ya que el metabolismo de HMOs

sialilados como el 6'SL depende frecuentemente de interacciones *cross-feeding* en las que especies que liberan sialidasas extracelulares, como *B. bifidum*, degradan parte del HMO y liberan sustratos accesibles por otras cepas (Díaz & Garrido, 2024; Pröschle-Donoso et al., 2025) . Por tanto, la ausencia de 6'SL en monocultivo es, por tanto, un resultado esperable teniendo en cuenta estudios anteriores sobre el metabolismo de este tipo de HMO (Figura 6).

Los resultados obtenidos en los ensayos de resistencia a tetraciclina mostraron una gran variabilidad entre las cepas, donde no se observó un patrón cepa-dependiente como en otros ensayos (Figura 7). La presencia de tolerancia a tetraciclina en las cepas aisladas del entorno materno-infantil es de gran relevancia, ya que la tetraciclina es uno de los antibióticos frente a los cuales *Bifidobacterium* puede presentar resistencia adquirida. El gen *tet(w),* que codifica una proteína de protección ribosomal, es el causante de las resistencias a tetraciclina más común en *Bifidobacterium* (Masco, 2006; Nøhr-Meldgaard et al., 2021). Se ha descrito que en especies de *Bifidobacterium* como *B. bifidum* o *B. animalis* subsp*. lactis* se encuentra integrado flanqueado por elementos IS5-like que sugieren que el gen fue integrado por medio de transferencia horizontal, aunque el análisis filogenético daba a entender que el gen seguía un patrón propio de evolución vertical (Nøhr-Meldgaard et al., 2021). En estudios recientes, Terlizzi *et al.* (2025) analizaron 657 valores de MIC frente a tetraciclina en *B. animalis* subsp*. lactis* y *B. longum,* donde describen que entre el 25 y 50% de las cepas superaban los puntos de corte establecidos por la European Food Safety Authority (EFSA). Los resultados de este estudio tienen implicaciones directas para la evaluación de la seguridad de estas cepas como candidatas probióticas, donde los aislados de origen materno-infantil no garantizan la ausencia de genes de resistencia transferibles dentro del microbioma intestinal, tal y como describe Samarra *et al*. (2025) a partir del análisis genómico de cepas de la cohorte MAMI.

La cuantificación de SCFAs mediante GC-MS mostró que el ácido acético fue el metabolito dominante producido por las cepas de *Bifidobacterium*, tanto en medio MRS como GAM, detectando en este último una presencia baja de ácido propanoico y butanoico (Figura 8). Este patrón fermentativo es característico de este género debido a que presentan de manera exclusiva la vía de la fructosa-6-fosfato fosfocetolasa, la cual favorece la producción de ácido acético como metabolito principal (Özcan & Sela, 2018), tal y como se ha descrito en estudios *in vitro* y *ex vivo* (De Bruyn et al., 2024; Sanchez et al., 2026).

La diferencia que existe en la producción de acetato en medio GAM y MRS se podría explicar por la presencia de carbohidratos para la fermentación más accesibles en MRS (Figuras 8A y 8B). Esta dependencia del medio a la hora de la producción de acetato se respalda en las investigaciones de Sanchez *et al.* (2026), quienes trabajando con cepas de *B. longum* y *B. breve* aisladas de lactantes, observaron que el acetato es el único SCFA que se detectó de forma significativa. En nuestro caso, existía una diferencia en la producción de ácido acético entre cepas, siendo *B. infantis* IATA132 e IATA331 y *B. bifidum* IATA365 las que presentaron valores más altos, sustentando la variabilidad que existe entre cepas en la eficiencia fermentativa o en la regulación de las rutas metabólicas asociadas a este proceso. En el microbioma intestinal del lactante, el ácido acético producido por *Bifidobacterium* procedente de la fermentación de los HMOs tiene consecuencias funcionales directas, ya que reducen el pH intestinal, limitan el crecimiento de bacterias con potencial patógeno puede servir como sustrato en procesos de *cross-feeding* para bacterias productoras de butirato (De Bruyn et al., 2024; Duar et al., 2020). Estas características del ácido acético son de gran relevancia a la hora de interpretar los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de crecimiento y conjugación.

Los ácidos propanoico y butanoico se detectaron en cantidades mucho menores y con un patrón más irregular entre cepas, apoyando la afirmación que la producción de SCFAs en *Bifidobacterium* está dominada por ácido acético (Figuras 8C y 8D). Su detección únicamente en medio GAM, se podría atribuir a rutas metabólicas complementarias o debido al uso de ciertos

componentes del medio que favorecen la producción de estos metabolitos. Este resultado evidencia que las rutas de fermentación de *Bifidobacterium* son flexibles pudiéndose adaptar a distintos sustratos disponibles en el medio y mantener la producción de SCFAs.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, los sobrenadantes libres de células frente a *E. coli*, *S.* typhimurium, *S. aureus* y *L. innocua* revelaron un efecto inhibitorio dependiente de la cepa de *Bifidobacterium*, del medio de cultivo y de la bacteria diana. Los sobrenadantes en medio MRS ejercieron una inhibición significativa del crecimiento de todos los patógenos evaluados, mientras que en medio GAM la única bacteria con potencial patógeno donde los sobrenadantes mostraron efecto antimicrobiano fue en *L. innocua*, a pesar de que el nivel de acidificación no era tan significativo como en los sobrenadantes con MRS. Este efecto se podría relacionar con componentes exclusivos del medio GAM que al metabolizarse podrían modular el crecimiento de *L. innocua* (Figuras 10 y 11). La diferencia entre el efecto de los sobrenadantes obtenidos en GAM y en MRS podría estar directamente relacionada con la producción de ácido acético, debido a que una mayor presencia de estos metabolitos en el medio produce una mayor acidificación, y ser esta acidificación la principal causante de la inhibición del crecimiento de las bacterias con potencial patógeno (Anexo 4). Esta hipótesis se confirmó de forma experimental mediante un ensayo con un control de pH, en el que el control acidificado a pH 4,8 mostró una inhibición significativa del crecimiento de *E. coli*, incluso con mayor efecto que los sobrenadantes de *Bifidobacterium*, esto explica que la acidificación es el principal factor del efecto antimicrobiano observado (Figuras 12A y 12B). Estudios similares con sobrenadantes de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* han descrito resultados similares, en los que el efecto del sobrenadante se correlacionaba de forma directa al del pH ácido(Roozbahani et al., 2024).

El efecto antimicrobiano frente a *E. coli* desapareció cuando se neutralizaron los sobrenadantes, siendo *B. longum* IATA054 la única cepa que mantuvo una inhibición significativa aunque fuera de menor magnitud con los resultados obtenidos con el sobrenadante sin neutralizar (Figuras 12C y 12D). Este resultado, da pie a afirmar que pueden existir metabolitos extracelulares en el sobrenadante de esta cepa con actividad inhibitoria independientemente del pH. En un estudio llevado a cabo por Wang *et al*. (2024) describieron que el sobrenadante libre de células de *B. longum* FB1-1 presenta actividad inhibitoria frente a *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenems, este efecto se atribuyó tanto a la acidificación como a otros componentes del sobrenadante. Por otra parte, Ji et al., (2025) identificaron en una cepa de *Bifidobacteirum* spp. proteínas antibacterianas de naturaleza no ácida que mantenían su actividad en un rango de pH de 2 a 4, incluso, permanecía estable frente al calor y la luz ultravioleta. Estos estudios confirman el efecto en *B. longum* IATA054 tras neutralización, apuntando a que esta cepa podría secretar metabolitos proteicos o de otra naturaleza con actividad antimicrobiana secundaria.

En conjunto, los resultados indican que la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *Bifidobacterium* está relacionada a la acidificación del medio producida por la síntesis de ácido acético, con una contribución secundaria y cepa-específica de otros metabolitos extracelulares, identificada de forma clara únicamente en *B. longum* IATA054. Esto sitúa al ácido acético como el principal componente antimicrobiano en los sobrenadantes, y a *B. longum* IATA054 como la cepa con mayor complejidad en su repertorio antimicrobiano.

El ensayo de conjugación se utilizó para evaluar si los metabolitos extracelulares producidos por las cepas de *Bifidobacterium* pueden inhibir o interferir en la transferencia horizontal de genes de ARGs a través de la conjugación plasmídica. Los resultados obtenidos mostraron que los sobrenadantes de todas las cepas evaluadas reducen la frecuencia de conjugación de forma dependiente de la concentración del sobrenadante y del medio de cultivo,

sin que este efecto se explique de únicamente por una reducción de la viabilidad de las bacterias donadoras (Figura 13).

En medio MRS al 10% todos los sobrenadantes y el control de pH, que se encontraba a pH 4,8, alcanzaron el límite inferior de detección del ensayo. Debido a que el efecto de los sobrenadantes fue el mismo al del pH, se puede afirmar que el efecto sobre la conjugación es principalmente causado por el pH ácido. Al reducir la concentración de sobrenadante al 5% la inhibición se mantuvo en todos los sobrenadantes, pero al contrario que en el ensayo anterior, el control de pH, con un valor de 5,6 en este caso, presentó una inhibición menor, esto podría explicar la presencia de otros metabolitos que afectarían al proceso de conjugación. A una concentración del 1%, el efecto inhibitorio prácticamente desapareció, siendo *B. longum* IATA054 la única cepa que mantuvo una inhibición significativa, en este caso el control de pH que se encontraba a 6,8 presentaba la misma frecuencia de conjugación que el control por lo que se situaba en la línea basal. Las diferencias entre los controles a concentraciones de 5 y 1% respecto a los sobrenadantes indica que además del papel de la acidificación del medio por la producción de ácido acético, existen metabolitos con capacidad anti-conjugativa que se manifiestan cuando la contribución del pH se diluye (Figura 13A).

Las bacterias donadoras se mantuvieron estables en todos los ensayos con valores similares al control, siendo la única excepción *B. longum* IATA054 *y B. breve* IATA027 donde en el ensayo de MRS 10% mostraron una reducción significativa en el número de donadoras (Figura 13C). Este resultado es relevante para el ensayo de conjugación, ya que confirma que la reducción de la conjugación no es causada por una pérdida de la viabilidad bacteriana, sino que refleja una interferencia directa en el proceso de transferencia de plásmidos. La inhibición de la conjugación manteniendo la viabilidad celular se respalda por el mecanismo propuesto por Ott & Mellata (2022), quienes demostraron que los SCFAs inhiben completamente la transferencia conjugativa de plásmidos de resistencia a concentraciones de 1 M y 0,1 M, y la reducen significativamente a 0,01 M, tanto en sistema líquido como en tejido intestinal, sin provocar necesariamente muerte celular. La propuesta de estos autores se basa en la inhibición de la fuerza protón-motriz y al compromiso energético que necesita la maquinaria conjugativa. Por otro lado, Tan *et al.* (2025) describieron que los SCFAs interfieren sobre el eje CpxAR–OMP, reduciendo la actividad de los promotores de los genes conjugativos *trfAp* y *trbBp* y alterando la integridad de la membrana externa a través de la supresión de porinas como OmpF, necesarias para el contacto intercelular previo a la transferencia plasmídica.

En medio GAM la inhibición de la conjugación fue más moderada y variable entre cepas. En el ensayo al 10% de sobrenadante, *B. breve* IATA027 alcanzó el límite de detección, en 5% el efecto disminuyó y ningún sobrenadante mostró una inhibición significativa (Figuras 13B y 13D). Este resultado puede estar asociado a la menor producción de ácido acético en GAM, que se traduce en una menor acidificación del medio. El efecto del sobrenadante de *B. breve* IATA027 en GAM al 10% podría presentar metabolitos anti-conjugativos activos en condiciones donde los recursos fermentables son más limitados, lo cual merece ser investigado en estudios posteriores.

Los resultados presentan una evidencia funcional sobre el papel de *Bifidobacterium* en la interferencia de uno de los principales mecanismos de transferencia de ARGs en el intestino. Esta capacidad no se había relacionado hasta ahora con sobrenadantes de cepas de origen materno-infantil de forma sistemática, esto conecta la asociación entre una microbiota dominada por *Bifidobacterium* y una menor carga de ARGs en el resistoma infantil (Samarra, Alcañiz, et al., 2025; Taft et al., 2018). Estos resultados también están respaldados por los resultados descritos por Moubareck *et al*. (2007) que demostraron en intestino de ratón gnotobiótico que *B. longum*, *B. bifidum* y *B. pseudocatenulatum* reducen significativamente la frecuencia de transferencia de genes de resistencia β-lactámicos entre enterobacterias, además, Wang *et al.,* (2024) describieron que el sobrenadante libre de células de *B. longum* FB1-1 inhibe la transferencia de

plásmidos de resistencia entre cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems. Por último, Li *et al*. (2025) demostraron en modelo murino que la suplementación con *B. infantis* 15697 inhibe la colonización intestinal por *E. coli* resistente y la transferencia horizontal de ARGs, actuando a través de la modulación del metabolismo de ácidos biliares y la composición de la comunidad microbiana.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la funcionalidad de *Bifidobacterium* spp. depende de la cepa y no se pueden generalizar funciones o características a partir de la especie, ya que cada aislado presentó un rendimiento diferente en función de la condición (Anexo 5). Entre los resultados más relevantes se encuentra la elevada adhesión a mucina de las cepas de *B. bifidum*, especialmente *B. bifidum* IATA102, y el incremento de adhesión de *B. breve* IATA059 cuando las bacterias se mantuvieron metabólicamente activas. A nivel metabólico, todas las cepas fueron capaces de utilizar LNT, mientras que la utilización de 2'FL se restringió a *B. infantis* IATA009 e IATA132, lo que evidencia una adaptación específica a determinados HMOs. El estudio de SCFAs, determinó que el ácido acético es el metabolito más producido destacando *B. infantis* IATA132, *B. infantis* IATA331 y *B. bifidum* IATA365 como las cepas con mayor producción. Respecto al potencial postbiótico, los sobrenadantes obtenidos en medio MRS mostraron la mayor capacidad antimicrobiana y de reducción de la conjugación bacteriana, siendo especialmente relevante *B. longum* IATA054, ya que mantuvo actividad antimicrobiana tras la neutralización del sobrenadante y fue la única cepa que conservó una inhibición significativa de la conjugación a concentraciones bajas. Por tanto, aunque no existe una única cepa que reúna el mejor rendimiento en todos los ensayos, *B. longum* IATA054 destaca como una candidata de interés postbiótico, mientras que *B. bifidum* IATA102, *B. breve* IATA059, *B. infantis* IATA132/IATA331 y *B. bifidum* IATA365 sobresalen en funciones concretas relacionadas con adhesión, metabolismo de HMOs o producción de acetato. Estos resultados refuerzan la necesidad de seleccionar cepas probióticas o postbióticas mediante una caracterización funcional individualizada, integrando tanto su eficacia como su perfil de seguridad, especialmente en relación con la resistencia a tetraciclina.

Para finalizar, los resultados obtenidos permiten relacionar este trabajo con varios Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030. En particular, la identificación de cepas de *Bifidobacterium* spp. con capacidad de adhesión a mucina, utilización de HMOs, producción de SCFAs, actividad antimicrobiana y reducción de la conjugación bacteriana refuerza su conexión con el ODS 3: Salud y bienestar, al aportar conocimiento orientado a la mejora de la salud intestinal infantil y al control de la resistencia antimicrobiana. Asimismo, la capacidad de determinadas cepas para metabolizar componentes propios de la leche materna, especialmente LNT y 2'FL, asocia los resultados con el ODS 2: Hambre cero, ya que destaca la importancia de la nutrición temprana en el establecimiento de una microbiota beneficiosa. Por último, la evaluación de sobrenadantes bacterianos como posibles postbióticos sitúa este trabajo en el marco del ODS 9: Industria, innovación e infraestructura, al generar información útil para el desarrollo futuro de productos biotecnológicos seguros y funcionales. En conjunto, estos hallazgos muestran que la caracterización funcional de cepas del entorno materno-infantil no solo tiene interés microbiológico, sino también relevancia en salud pública, nutrición e innovación biomédica.

7. Conclusiones

La caracterización funcional de las 14 cepas de *Bifidobacterium spp*. aisladas del entorno materno-infantil mostró una notable heterogeneidad en todas las propiedades evaluadas, confirmando que las capacidades funcionales de este género deben valorarse de forma independiente a la especie, observando su potencial a nivel de cepa

La adhesión a mucina fue heterogénea entre las cepas estudiadas y dependiente de las condiciones experimentales. Las cepas de *B. bifidum* mostraron una mayor adhesión en condiciones estáticas, destacando *B. bifidum* IATA102, mientras que algunas cepas de *B. breve*, especialmente *B. breve* IATA059, incrementaron su adhesión cuando se mantuvieron metabólicamente activas. Estos resultados proponen que la interacción con la mucina depende de las condiciones ambientales y del estado fisiológico de cada cepa.

El perfil metabólico mostró una elevada variabilidad. Aunque la mayoría de los aislados utilizó fuentes comunes de carbono, el consumo de HMOs fue específico: el LNT fue metabolizado por todas las cepas, el 2'FL únicamente por *B. infantis* IATA009 e IATA132 y el 6'SL por ninguna, lo que refuerza el papel de los HMOs como sustratos selectivos en el microbioma materno-infantil.

La cuantificación de SCFAs confirmó al ácido acético como principal metabolito, con mayor producción en MRS que en GAM y *B. infantis* IATA132 e IATA331 y *B. bifidum* IATA365 como mayores productoras, evidenciando una funcionalidad dependiente tanto de la cepa como del medio.

La sensibilidad a tetraciclina fue heterogénea y cepa-dependiente, con MIC entre 0,5 y 64 µg/mL, siendo *B. longum* IATA054 y *B. infantis* IATA009 las más sensibles y *B. pseudocatenulatum* IATA044 y *B. breve* IATA027 las más resistentes, por lo que su evaluación individualizada resulta esencial antes de considerar estas cepas como candidatas probióticas.

Los sobrenadantes en MRS inhibieron el crecimiento de los cuatro patógenos, principalmente por acidificación del medio, con una actividad más limitada en GAM. *B. longum* IATA054 fue la única cepa con actividad antimicrobiana tras la neutralización, lo que sugiere la producción de metabolitos antimicrobianos independientes del pH.

Los sobrenadantes redujeron la frecuencia de conjugación de forma dependiente de la concentración y del medio, principalmente por acidificación, manteniendo *B. longum* IATA054 una inhibición significativa a concentraciones bajas e independientemente del pH, lo que apoya una menor carga de ARGs en microbiotas dominadas por *Bifidobacterium* spp.

8. Bibliografía

Alessandri, G., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2021). The genus Bifidobacterium: from genomics to functionality of an important component of the mammalian gut microbiota. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 1472–1487. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.006

Alvarez-Molina, A., Trigal, E., Prieto, M., López, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2023). Assessment of a plasmid conjugation procedure to monitor horizontal transfer of an extended-spectrum β-lactamase resistance gene under food chain scenarios. *Current Research in Food Science*, *6*, 100405. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.11.024

Apiwatsiri, P., Pupa, P., Yindee, J., Niyomtham, W., Sirichokchatchawan, W., Lugsomya, K., Shah, A. A., & Prapasarakul, N. (2021). Anticonjugation and Antibiofilm Evaluation of Probiotic Strains Lactobacillus plantarum 22F, 25F, and Pediococcus acidilactici 72N Against Escherichia coli Harboring mcr-1 Gene. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.614439

Argentini, C., Lugli, G. A., Tarracchini, C., Fontana, F., Mancabelli, L., Viappiani, A., Anzalone, R., Angelini, L., Alessandri, G., Bianchi, M. G., Taurino, G., Bussolati, O., Milani, C., van Sinderen, D., Turroni, F., & Ventura, M. (2024). Ecology- and genome-based identification of the *Bifidobacterium adolescentis* prototype of the healthy human gut microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, *90*(2). https://doi.org/10.1128/aem.02014-23

Arzamasov, A. A., Rodionov, D. A., Hibberd, M. C., Guruge, J. L., Kent, J. E., Kazanov, M. D., Leyn, S. A., Elane, M. L., Sejane, K., Furst, A., Bode, L., Barratt, M. J., Gordon, J. I., & Osterman, A. L. (2025). Integrative genomic reconstruction reveals heterogeneity in carbohydrate utilization across human gut bifidobacteria. *Nature Microbiology*, *10*(8), 2031–2047. https://doi.org/10.1038/s41564-025-02056-x

Casaburi, G., Duar, R. M., Vance, D. P., Mitchell, R., Contreras, L., Frese, S. A., Smilowitz, J. T., & Underwood, M. A. (2019). Early-life gut microbiome modulation reduces the abundance of antibiotic-resistant bacteria. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *8*(1), 131. https://doi.org/10.1186/s13756-019-0583-6

Collado, M. C., Gueimonde, M., Hernández, M., Sanz, Y., & Salminen, S. (2005). Adhesion of Selected Bifidobacterium Strains to Human Intestinal Mucus and the Role of Adhesion in Enteropathogen Exclusion. *Journal of Food Protection*, *68*(12), 2672–2678. https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.12.2672

Dai, D. L. Y., Petersen, C., Hoskinson, C., Del Bel, K. L., Becker, A. B., Moraes, T. J., Mandhane, P. J., Finlay, B. B., Simons, E., Kozyrskyj, A. L., Patrick, D. M., Subbarao, P., Bode, L., Azad, M. B., & Turvey, S. E. (2023). Breastfeeding enrichment of B. longum subsp. infantis mitigates the effect of antibiotics on the microbiota and childhood asthma risk. *Med*, *4*(2), 92-112.e5. https://doi.org/10.1016/j.medj.2022.12.002

De Bruyn, F., James, K., Cottenet, G., Dominick, M., & Katja, J. (2024). Combining Bifidobacterium longum subsp. infantis and human milk oligosaccharides synergistically increases short chain fatty acid production ex vivo. *Communications Biology*, *7*(1), 943. https://doi.org/10.1038/s42003-024-06628-1

Deng, L., & Wang, S. (2024). Colonization resistance: the role of gut microbiota in preventing *Salmonella* invasion and infection. *Gut Microbes*, *16*(1). https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2424914

Díaz, R., & Garrido, D. (2024). Screening competition and cross-feeding interactions during utilization of human milk oligosaccharides by gut microbes. *Microbiome Research Reports*, *3*(1). https://doi.org/10.20517/mrr.2023.61

Duar, R. M., Kyle, D., & Casaburi, G. (2020). Colonization Resistance in the Infant Gut: The Role of B. infantis in Reducing pH and Preventing Pathogen Growth. *High-Throughput*, *9*(2), 7. https://doi.org/10.3390/ht9020007

Egan, M., O'Connell Motherway, M., Kilcoyne, M., Kane, M., Joshi, L., Ventura, M., & van Sinderen, D. (2014). Cross-feeding by Bifidobacterium breve UCC2003 during co-cultivation with Bifidobacterium bifidum PRL2010 in a mucin-based medium. *BMC Microbiology*, *14*(1), 282. https://doi.org/10.1186/s12866-014-0282-7

Engevik, M. A., Luk, B., Chang-Graham, A. L., Hall, A., Herrmann, B., Ruan, W., Endres, B. T., Shi, Z., Garey, K. W., Hyser, J. M., & Versalovic, J. (2019). Bifidobacterium dentium Fortifies the Intestinal Mucus Layer via Autophagy and Calcium Signaling Pathways. *MBio*, *10*(3). https://doi.org/10.1128/mBio.01087-19

Feehily, C., O'Neill, I. J., Walsh, C. J., Moore, R. L., Killeen, S. L., Geraghty, A. A., Lawton, E. M., Byrne, D., Sanchez-Gallardo, R., Nori, S. R. C., Nielsen, I. B., Wortmann, E., Matthews, E., O'Flaherty, R., Rudd, P. M., Groeger, D., Shanahan, F., Saldova, R., McAuliffe, F. M., … Cotter, P. D. (2023). Detailed mapping of Bifidobacterium strain transmission from mother to infant via a dual culture-based and metagenomic approach. *Nature Communications*, *14*(1), 3015. https://doi.org/10.1038/s41467-023-38694-0

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 & Microbe*, *24*(1), 133-145.e5. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.005

Flores Ventura, E., Esteban-Torres, M., Gueimonde, M., van Sinderen, D., Koren, O., Hall, L. J., Segata, N., Valles-Colomer, M., & Collado, M. C. (2025). Mother-to-infant vertical transmission in early life: a systematic review and proportional meta-analysis of Bifidobacterium strain transmissibility. *Npj Biofilms and Microbiomes*, *11*(1), 121. https://doi.org/10.1038/s41522-025-00720-y

Fusco, W., Lorenzo, M. B., Cintoni, M., Porcari, S., Rinninella, E., Kaitsas, F., Lener, E., Mele, M. C., Gasbarrini, A., Collado, M. C., Cammarota, G., & Ianiro, G. (2023). Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients*, *15*(9), 2211. https://doi.org/10.3390/nu15092211

GraphPad Software. (2023). GraphPad Prism (Versión 10) [Software]. GraphPadSoftware, LLC. https://www.graphpad.com

Getino, M., Sanabria-Ríos, D. J., Fernández-López, R., Campos-Gómez, J., Sánchez-López, J. M., Fernández, A., Carballeira, N. M., & de la Cruz, F. (2015). Synthetic Fatty Acids Prevent Plasmid-Mediated Horizontal Gene Transfer. *MBio*, *6*(5). https://doi.org/10.1128/mBio.01032-15

Harata, G., Yoda, K., Wang, R., Miyazawa, K., Sato, M., He, F., & Endo, A. (2021). Species- and Age/Generation-Dependent Adherence of Bifidobacterium bifidum to Human Intestinal Mucus In Vitro. *Microorganisms*, *9*(3), 542. https://doi.org/10.3390/microorganisms9030542

He, S., Chen, C., Cao, L., Nauta, A., Liu, X., Chen, H., Spoelstra, J., & Yang, B. (2025). Metabolic diversity and competitive interactions of infant-derived bifidobacteria in human milk oligosaccharides and galacto-oligosaccharide utilization. *Journal of Dairy Science*, *108*(9), 9034–9047. https://doi.org/10.3168/jds.2025-26559

Jarman, J. B., Torres, P. J., Stromberg, S., Sato, H., Stack, C., Ladrillono, A., Pace, S., Jimenez, N. L., Haselbeck, R. J., Insel, R., Van Dien, S., & Culler, S. J. (2025). Bifidobacterium deficit in United States infants drives prevalent gut dysbiosis. *Communications Biology*, *8*(1), 867. https://doi.org/10.1038/s42003-025-08274-7

Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). factoextra: Extract and visualize theresults of multivariate data analyses (R package version 1.0.7) [Software]. https://CRAN.R-project.org/package=factoextra

Khalil, A., Samara, A., O'Brien, P., & Ladhani, S. (2023). Listeria outbreaks cause maternal and perinatal mortality and morbidity: we must do better. *The Lancet Microbe*, *4*(4), e206–e207. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00388-3

Kiu, R., Darby, E. M., Alcon-Giner, C., Acuna-Gonzalez, A., Camargo, A., Lamberte, L. E., Phillips, S., Sim, K., Shaw, A. G., Clarke, P., van Schaik, W., Kroll, J. S., & Hall, L. J. (2025). Impact of early life antibiotic and probiotic treatment on gut microbiome and resistome of very-low-birth-weight preterm infants. *Nature Communications*, *16*(1), 7569. https://doi.org/10.1038/s41467-025-62584-2

Kwapong, A. A., Stapleton, P., & Gibbons, S. (2019). Inhibiting plasmid mobility: The effect of isothiocyanates on bacterial conjugation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *53*(5), 629–636. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.01.011

Laursen, M. F., Sakanaka, M., von Burg, N., Mörbe, U., Andersen, D., Moll, J. M., Pekmez, C. T., Rivollier, A., Michaelsen, K. F., Mølgaard, C., Lind, M. V., Dragsted, L. O., Katayama, T., Frandsen, H. L., Vinggaard, A. M., Bahl, M. I., Brix, S., Agace, W., Licht, T. R., & Roager, H. M. (2021). Bifidobacterium species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut. *Nature Microbiology*, *6*(11), 1367–1382. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00970-4

Li, Z., Hu, J., Pan, Y., Xi, Y., & Zhang, L. (2025). *Bifidobacterium infantis* modulates intestinal microecology to inhibit the spread of antimicrobial resistance. *MSystems*, *10*(11). https://doi.org/10.1128/msystems.00728-25

Liu, G., Olsen, J. E., & Thomsen, L. E. (2019). Identification of Genes Essential for Antibiotic-Induced Up-Regulation of Plasmid-Transfer-Genes in Cephalosporin Resistant Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02203

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*, *88*(1). https://doi.org/10.1128/mmbr.00094-23

Ma, Y., Kan, A., & Johnson, D. R. (2024). Metabolic interactions control the transfer and spread of plasmid-encoded antibiotic resistance during surface-associated microbial growth. *Cell Reports*, *43*(9), 114653. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114653

Masco, L. (2006). Antimicrobial susceptibility of Bifidobacterium strains from humans, animals and probiotic products. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(1), 85–94. https://doi.org/10.1093/jac/dkl197

Milani, C., Lugli, G. A., Duranti, S., Turroni, F., Bottacini, F., Mangifesta, M., Sanchez, B., Viappiani, A., Mancabelli, L., Taminiau, B., Delcenserie, V., Barrangou, R., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2014). Genomic Encyclopedia of Type Strains of the Genus Bifidobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(20), 6290–6302. https://doi.org/10.1128/AEM.02308-14

Milani, C., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Duranti, S., Turroni, F., Ferrario, C., Mangifesta, M., Viappiani, A., Ferretti, P., Gorfer, V., Tett, A., Segata, N., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2015). Exploring Vertical Transmission of Bifidobacteria from Mother to Child. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(20), 7078–7087. https://doi.org/10.1128/AEM.02037-15

Milani, C., Turroni, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Ferrario, C., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2016). Genomics of the Genus Bifidobacterium Reveals Species-Specific Adaptation to the Glycan-Rich Gut Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(4), 980–991. https://doi.org/10.1128/AEM.03500-15

Mills, D. A., German, J. B., Lebrilla, C. B., & Underwood, M. A. (2023). Translating neonatal microbiome science into commercial innovation: metabolism of human milk oligosaccharides as a basis for probiotic efficacy in breast-fed infants. *Gut Microbes*, *15*(1). https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2192458

Moubareck, C., Lecso, M., Pinloche, E., Butel, M. J., & Doucet-Populaire, F. (2007). Inhibitory Impact of Bifidobacteria on the Transfer of β-Lactam Resistance among *Enterobacteriaceae* in the Gnotobiotic Mouse Digestive Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(3), 855–860. https://doi.org/10.1128/AEM.02001-06

Neil, K., Allard, N., & Rodrigue, S. (2021). Molecular Mechanisms Influencing Bacterial Conjugation in the Intestinal Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673260

Nøhr-Meldgaard, K., Struve, C., Ingmer, H., & Agersø, Y. (2021). The Tetracycline Resistance Gene, tet(W) in Bifidobacterium animalis subsp. lactis Follows Phylogeny and Differs From tet(W) in Other Species. *Frontiers in Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.658943

O'Brien, C. E., Meier, A. K., Cernioglo, K., Mitchell, R. D., Casaburi, G., Frese, S. A., Henrick, B. M., Underwood, M. A., & Smilowitz, J. T. (2022). Early probiotic supplementation with B. infantis in breastfed infants leads to persistent colonization at 1 year. *Pediatric Research*, *91*(3), 627–636. https://doi.org/10.1038/s41390-020-01350-0

Ott, L. C., & Mellata, M. (2022). Models for Gut-Mediated Horizontal Gene Transfer by Bacterial Plasmid Conjugation. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.891548

Özcan, E., & Sela, D. A. (2018). Inefficient Metabolism of the Human Milk Oligosaccharides Lacto-N-tetraose and Lacto-N-neotetraose Shifts Bifidobacterium longum subsp. infantis Physiology. *Frontiers in Nutrition*, *5*. https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00046

Pantazi, A. C., Balasa, A. L., Mihai, C. M., Chisnoiu, T., Lupu, V. V., Kassim, M. A. K., Mihai, L., Frecus, C. E., Chirila, S. I., Lupu, A., Andrusca, A., Ionescu, C., Cuzic, V., & Cambrea, S. C. (2023). Development of Gut Microbiota in the First 1000 Days after Birth and Potential Interventions. *Nutrients*, *15*(16), 3647. https://doi.org/10.3390/nu15163647

Pedersen, T. L. (2024). patchwork: The composer of plots (R package version1.3.0) [Software]. https://CRAN.R-project.org/package=patchwork

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

R Core Team. (2024). R: A language and environment for statistical computing (Versión 4.4) [Software]. R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/

Reyman, M., van Houten, M. A., Watson, R. L., Chu, M. L. J. N., Arp, K., de Waal, W. J., Schiering, I., Plötz, F. B., Willems, R. J. L., van Schaik, W., Sanders, E. A. M., & Bogaert, D. (2022). Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. *Nature Communications*, *13*(1), 893. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28525-z

Rizzo, S. M., Vergna, L. M., Alessandri, G., Lee, C., Fontana, F., Lugli, G. A., Carnevali, L., Bianchi, M. G., Barbetti, M., Taurino, G., Sgoifo, A., Bussolati, O., Turroni, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2024). <scp>GH136</scp> -encoding gene (<scp> *per* B </scp>) is involved in gut colonization and persistence by *Bifidobacterium bifidum* <scp>PRL2010</scp>. *Microbial Biotechnology*, *17*(2). https://doi.org/10.1111/1751-7915.14406

Roozbahani, F., Ahanjan, M., Moshiri, M., Abediankenari, S., Goli, H. R., Kakavan, M., & Gholami, M. (2024). Characterization of Antimicrobial Activities *of Bifidobacterium lactis* BB-12 and Their Inhibitory Effect Against Some Foodborne Pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, *21*(6), 370–377. https://doi.org/10.1089/fpd.2023.0182

Sadeghpour Heravi, F., & Hu, H. (2023). Bifidobacterium: Host–Microbiome Interaction and Mechanism of Action in Preventing Common Gut-Microbiota-Associated Complications in Preterm Infants: A Narrative Review. *Nutrients*, *15*(3), 709. https://doi.org/10.3390/nu15030709

Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021a). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *18*(9), 649–667. https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6

Samarra, A., Alcañiz, A. J., Martínez-Costa, C., Marina, A., Comas, I., Segata, N., Quijada, N. M., & Collado, M. C. (2025). Breastfeeding and early Bifidobacterium-driven microbial colonization shape the infant gut resistome. *Nature Communications*, *16*(1), 6099. https://doi.org/10.1038/s41467-025-61154-w

Samarra, A., Flores, E., Bernabeu, M., Cabrera-Rubio, R., Bäuerl, C., Selma-Royo, M., & Collado, M. C. (2024). *Shaping Microbiota During the First 1000 Days of Life* (pp. 1–28). https://doi.org/10.1007/978-3-031-58572-2_1

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, M. C. (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). https://doi.org/10.1080/19490976.2025.2501192

Sanchez, L., Viana, M. V. C., Robert, V., Chain, F., Chadi, S., Azevedo, V., Mosca, A., Langella, P., Binda, S., & Martín, R. (2026). Isolation and Characterization of Bifidobacterium longum A1, an Isolate from Faeces of an Exclusively Breast-fed Infant with Probiotic Potential. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. https://doi.org/10.1007/s12602-026-11017-7

Segui-Perez, C., Huang, L. Z. X., Paganelli, F. L., Lievens, E., & Strijbis, K. (2025). Probiotic Bifidobacterium bifidum strains desialylate MUC13 and increase intestinal epithelial barrier function. *Scientific Reports*, *15*(1), 8778. https://doi.org/10.1038/s41598-025-92125-2

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

Shao, Y., Garcia-Mauriño, C., Clare, S., Dawson, N. J. R., Mu, A., Adoum, A., Harcourt, K., Liu, J., Browne, H. P., Stares, M. D., Rodger, A., Brocklehurst, P., Field, N., & Lawley, T. D. (2024). Primary succession of Bifidobacteria drives pathogen resistance in neonatal microbiota assembly. *Nature Microbiology*, *9*(10), 2570–2582. https://doi.org/10.1038/s41564-024-01804-9

Slater, A. S., Hickey, R. M., & Davey, G. P. (2025). Interactions of human milk oligosaccharides with the immune system. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1523829

Taft, D. H., Liu, J., Maldonado-Gomez, M. X., Akre, S., Huda, M. N., Ahmad, S. M., Stephensen, C. B., & Mills, D. A. (2018). Bifidobacterial Dominance of the Gut in Early Life and Acquisition of Antimicrobial Resistance. *MSphere*, *3*(5). https://doi.org/10.1128/mSphere.00441-18

Terlizzi, M., Speranza, B., Sinigaglia, M., Corbo, M. R., & Bevilacqua, A. (2025). Antibiotic Resistance in Bifidobacterium animalis subsp. lactis and Bifidobacterium longum: Definition of Sensitivity/Resistance Profiles at the Species Level. *Microorganisms*, *13*(7), 1647. https://doi.org/10.3390/microorganisms13071647

Tremblay, A., Bronner, S., & Binda, S. (2023). Review and Perspectives on Bifidobacterium lactis for Infants' and Children's Health. *Microorganisms*, *11*(10), 2501. https://doi.org/10.3390/microorganisms11102501

Vandenplas, Y., Carnielli, V. P., Ksiazyk, J., Luna, M. S., Migacheva, N., Mosselmans, J. M., Picaud, J. C., Possner, M., Singhal, A., & Wabitsch, M. (2020). Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutrition*, *78*, 110812. https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110812

Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant graphics for data analysis (2.ª ed.). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T. L. Miller, E., Bache, S. M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D. P., Spinu, V., … Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. Journal of Open Source Software, 4(43), 1686. https://doi.org/10.21105/joss.01686

Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2023). dplyr: A grammar of data manipulation (R package version 1.1.4) [Software]. https://CRAN.R-project.org/package=dplyr

Wickham, H., Vaughan, D., & Girlich, M. (2024). tidyr: Tidy messy data (R package version 1.3.1) [Software]. https://CRAN.R-project.org/package=tidyr

Wilke, C. O. (2024). cowplot: Streamlined plot theme and plot annotations for "ggplot2" (R package version 1.1.3) [Software]. https://CRAN.R-project.org/package=cowplot

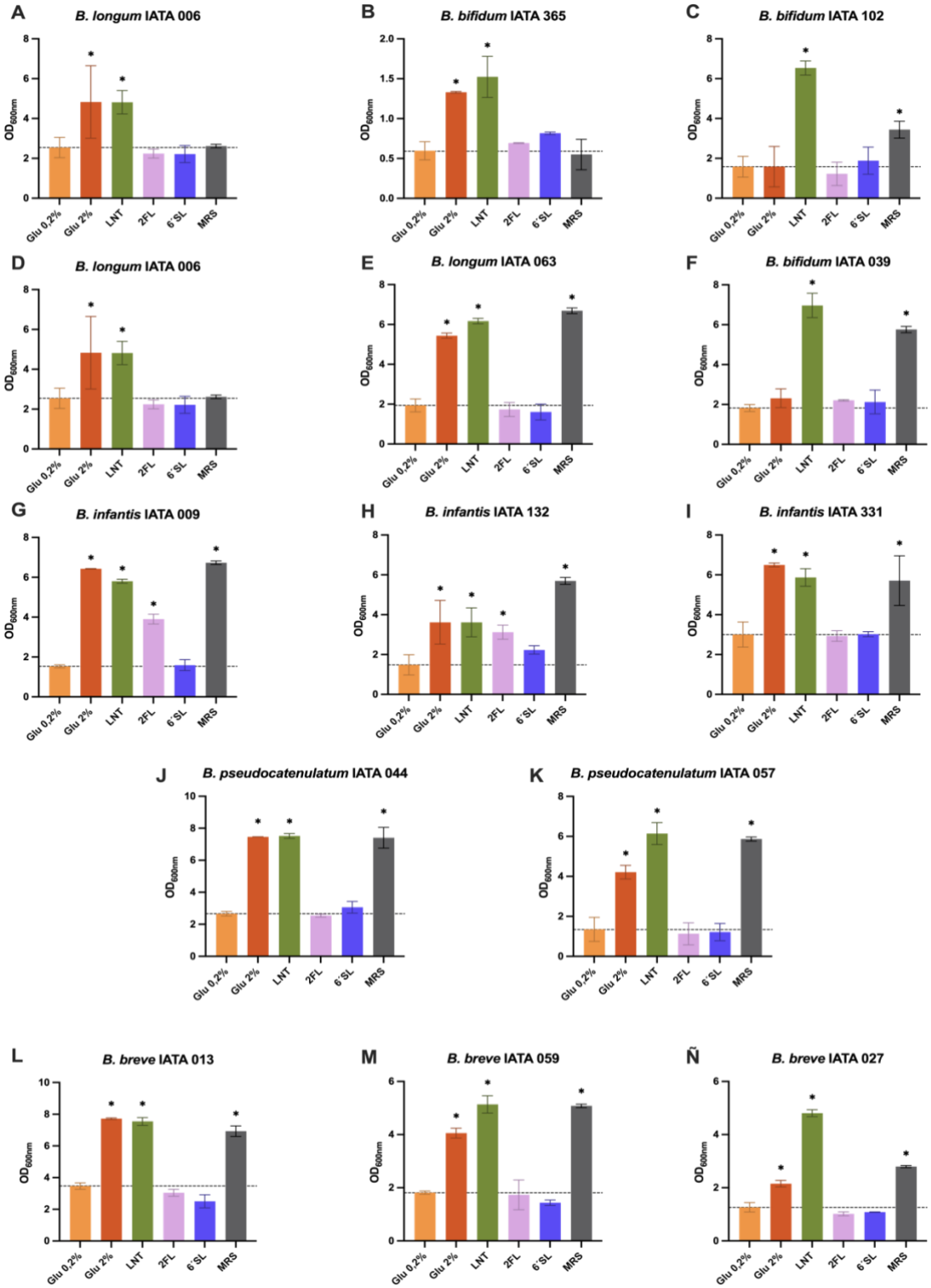
Woelfel, S., Silva, M. S., & Stecher, B. (2024). Intestinal colonization resistance in the context of environmental, host, and microbial determinants. *Cell Host & Microbe*, *32*(6), 820–836. https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.05.002

Wu, S., Luo, G., Jiang, F., Jia, W., Li, J., Huang, T., Zhang, X., Mao, Y., Su, S., Han, W., He, F., & Cheng, R. (2025). Early life bifidobacterial mother–infant transmission: greater contribution from the infant gut to human milk revealed by microbiomic and culture-based methods. *MSystems*, *10*(7). https://doi.org/10.1128/msystems.00480-25

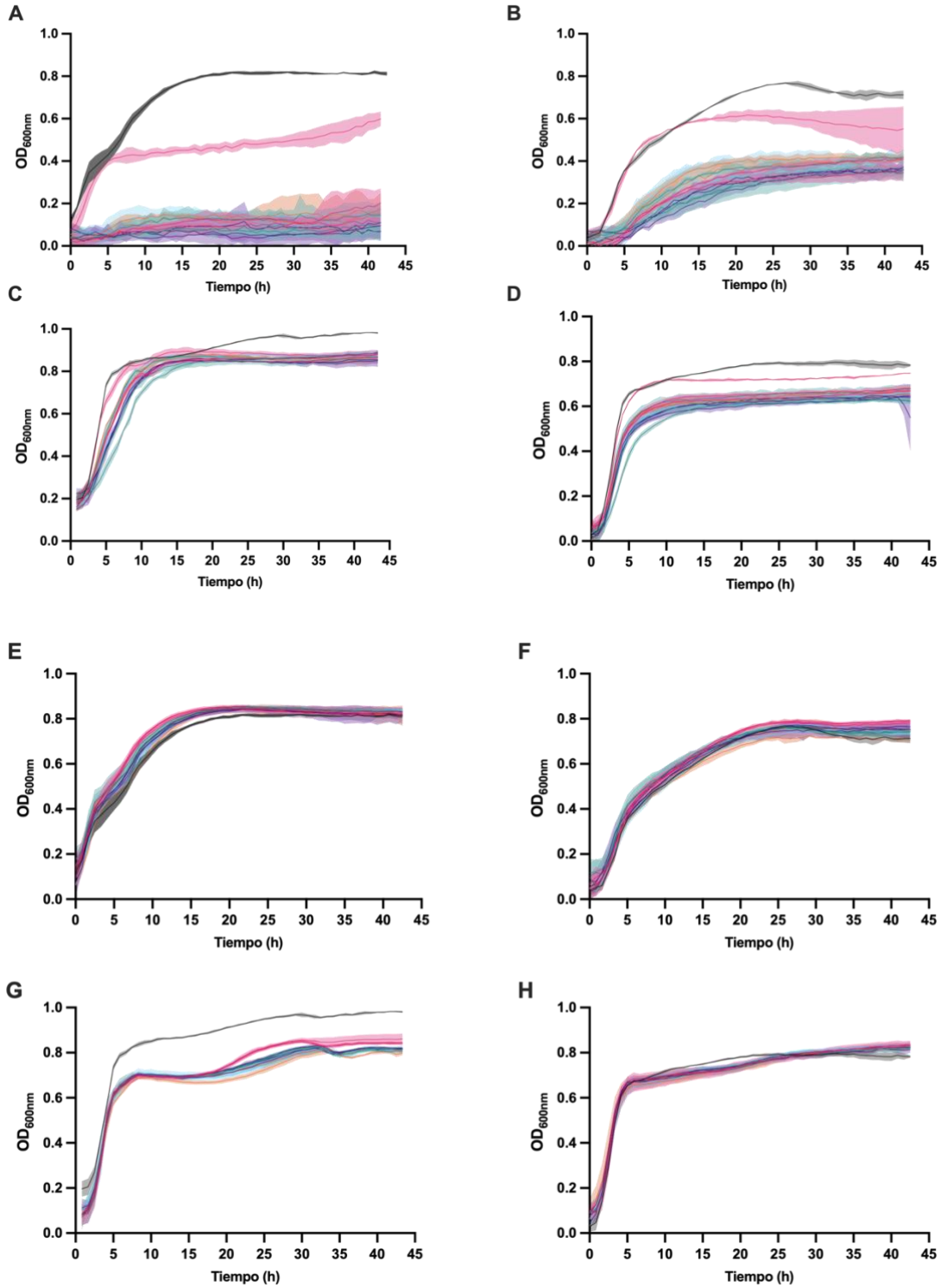
Xiao, L., & Zhao, F. (2023). Microbial transmission, colonisation and succession: from pregnancy to infancy. *Gut*, *72*(4), 772–786. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-328970

Yang, S., Cai, J., Su, Q., Li, Q., & Meng, X. (2024). Human milk oligosaccharides combine with *Bifidobacterium longum* to form the “golden shield” of the infant intestine: metabolic strategies, health effects, and mechanisms of action. *Gut Microbes*, *16*(1). https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2430418

9. Anexos



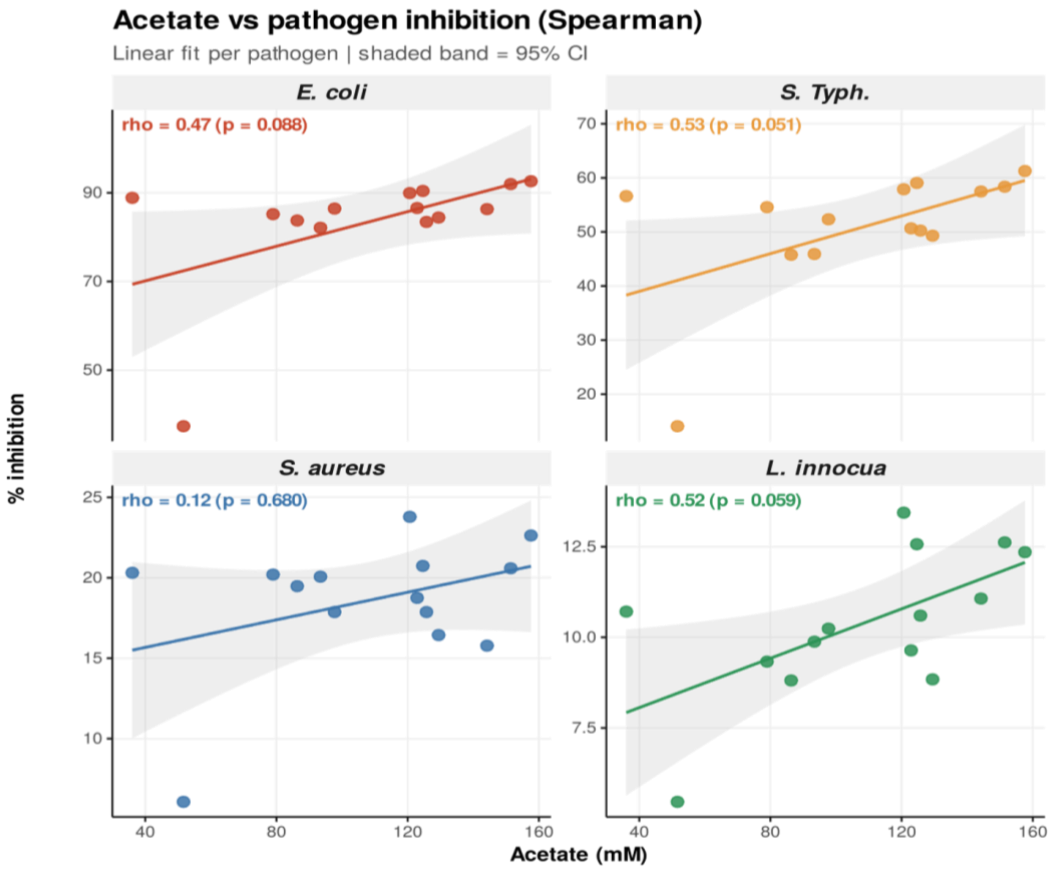
Anexo 1. Evaluación del crecimiento de cepas de *Bifidobacterium* en presencia de HMOs**.** Absorbancia final de los cultivos de *Bifidobacterium* en los ensayos de HMOs.



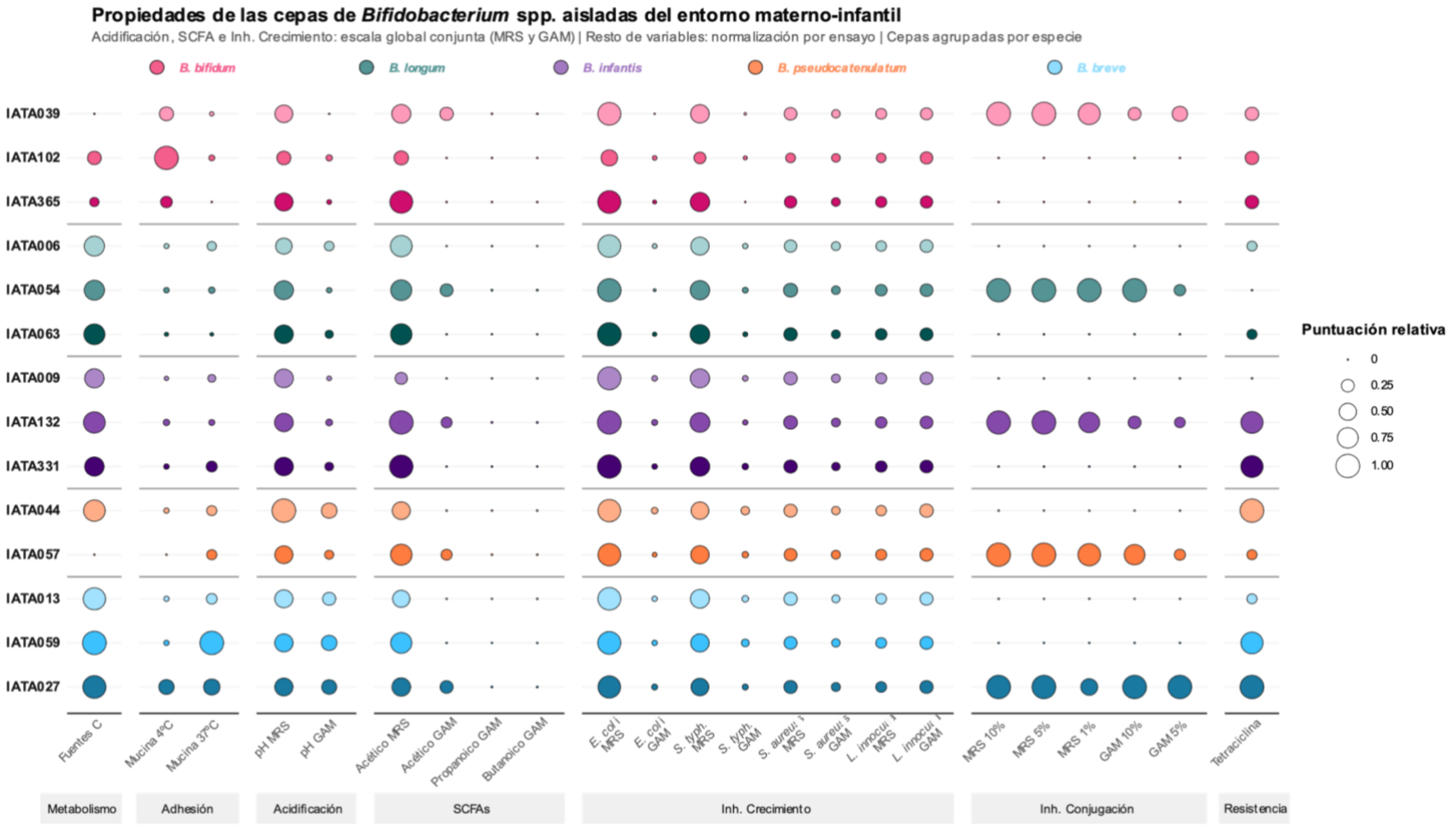
Anexo 2. Cinéticas de crecimiento de las bacterias con potencial patógeno en presencia de sobrenadantes de *Bifidobacterium*. (A) *Escherichia coli*. con sobrenadantes de *Bifidobacterium* en medio MRS (B) *Salmonella typhimurium*. con sobrenadantes de *Bifidobacterium* en medio MRS (C) *Staphylococcus aureus*. con sobrenadantes de *Bifidobacterium* en medio MRS (D) *Listeria innocua* con sobrenadantes de *Bifidobacterium* en medio MRS. (E) *Escherichia coli*. con sobrenadantes de *Bifidobacterium* en medio GAM (F) *Salmonella typhimurium*. con sobrenadantes de *Bifidobacterium* en medio GAM (G) *Staphylococcus aureus*. con sobrenadantes de *Bifidobacterium* en medio GAM (H) *Listeria innocua* con sobrenadantes de *Bifidobacterium* en medio GAM.

Anexo 3. Resultados de la medición de pH en los sobrenadantes de *Bifidobacterium*

Cepas	SN MRS			SN GAM		
	completo	10% en LB	10% en BHI	completo	10% en LB	10% en BHI
B. bifidum IATA039	4.03	4.75	6.26	5.15	6.39	7.2
B. bifidum IATA365	3.97	4.69	6.21	5.11	6.40	7.19
B. bifidum IATA102	4.51	5.50	6.88	5.06	6.39	7.21
B. longum IATA006	4.23	4.66	6.30	4.88	6.25	7.13
B. longum IATA063	3.88	4.76	5.99	4.97	6.28	7.12
B. longum IATA054	3.84	4.59	5.74	5.09	6.35	7.14
B. infantis IATA009	3.87	4.59	6.07	5.11	6.36	7.16
B. infantis IATA132	3.90	4.59	6.00	5.04	6.52	7.14
B. infantis IATA331	3.89	4.68	6.04	4.94	6.23	7.14
B. pseudocatenulatum IATA044	3.06	4.83	6.36	4.34	5.64	6.89
B. pseudocatenulatum IATA057	4.00	4.77	6.22	4.92	6.25	7.1
B. breve IATA013	3.98	4.75	6.19	4.59	5.96	6.96
B. breve IATA059	3.96	4.75	6.20	4.34	5.72	6.89
B. breve IATA027	3.98	4.81	6.00	4.41	5.82	6.93



Anexo 4. Representación de la correlación de Spearman entre la producción de ácido acético y la inhibición de bacterias con potencial patógeno.



Anexo 5. Dot plot de las 14 cepas de *Bifidobacterium* con el rendimiento de cada una de las cepas en todos los ensayos evaluados.. El tamaño de cada punto codifica la puntuación normalizada [0–1] y el color identifica cada cepa dentro de su especie.