



Universidad
Zaragoza



Universidad de Zaragoza
Facultad de Medicina

Trabajo Fin de Máster Universitario en Condicionantes Genéticos,
nutricionales y ambientales del crecimiento y desarrollo - NUTRENVIGEN
(G+D) *Factors*

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LECHE
MATERNA PARA SU USO COMO PROBIÓTICOS
EN POBLACIÓN INFANTIL**

Daniel Escobar Sáez
Zaragoza, 2023



Universidad de Zaragoza
Facultad de Medicina

Trabajo Fin de Máster Universitario en Condicionantes Genéticos,
nutricionales y ambientales del crecimiento y desarrollo - NUTRENVIGEN
(G+D) *Factors*

**Título: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE
LECHE MATERNA PARA SU USO COMO PROBIÓTICOS
EN POBLACIÓN INFANTIL**

Memoria para optar al título oficial del Máster en Condicionantes Genéticos,
Nutricionales y Ambientales del Crecimiento y Desarrollo – NUTRENVIGEN
(G+D) *Factors*

Autor: Daniel Escobar Sáez

Directora (1): Belén Orgaz Martín. Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Directora (2): María Marín Martínez. Sección Departamental de Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

El presente trabajo se enmarca en la línea de investigación n^o6, relativa al *Estudio de la microbiota y su relación con la salud*.

Centro en el que se ha realizado: Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.



Universidad
Zaragoza



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LECHE MATERNA PARA SU USO COMO PROBIÓTICOS EN POBLACIÓN INFANTIL

Autor: Daniel Escobar Sáez

Fdo:

Directora (1): Dra. Belén Orgaz Martín

Fdo:

Directora (2): Dra. María Marín Martínez

Fdo:

Belén Orgaz Martín, directora 1, y María Marín Martínez, directora 2 del TFM titulado: *Aislamiento e identificación de microorganismos de leche materna para su uso como probióticos en población infantil*, realizado por el alumno Daniel Escobar Sáez

CERTIFICAN: Que el TFM dispone de la autorización del Comité de Ética de la Investigación de Aragón (CEICA) con número de registro PI22/447

Departamento/Centro al que pertenecen las directoras:

Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid a ____ de septiembre de 2023



ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2.1. Composición de la leche materna | 3 |
| 2.1.1. Composición nutricional, inmunológica y compuestos bioactivos | 3 |
| 2.1.2. Composición microbiológica de la leche materna | 5 |
| 2.2. Beneficios de la leche materna en la salud materno-infantil | 6 |
| 2.3. Uso de probióticos en lactantes. Criterios de selección y seguridad | 7 |
| 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 13 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 13 |
| 4.1. Revisión bibliográfica | 13 |
| 4.2. Diseño del estudio | 13 |
| 4.3. Obtención de las muestras de leche materna | 14 |
| 4.4. Procesamiento de las muestras de leche materna | 16 |
| 4.4.1. Preparación de medios de cultivo | 16 |
| 4.4.2. Análisis microbiológico de las muestras de leche materna | 17 |
| 4.5. Identificación de los aislados seleccionados de muestras de leche materna por secuenciación parcial del gen 16S ARNr | 18 |
| 4.6. Caracterización de los aislados con potencial efecto probiótico | 19 |
| 4.6.1. Cinética de crecimiento | 19 |
| 4.6.2. Pruebas de supervivencia in vitro a distintas condiciones del tracto gastrointestinal | 20 |
| 4.6.3. Crecimiento de los aislados en medio de cultivo y leche de vaca | 20 |
| 4.7. Análisis estadístico | 20 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 21 |
| 5.1. Recuentos microbiológicos de las muestras de leche materna | 21 |
| 5.2. Identificación de especies microbianas de muestras de leche materna | 23 |
| 5.3. Caracterización de los aislados con potencial efecto probiótico | 26 |
| 5.3.1. Cinética de crecimiento | 26 |
| 5.3.2. Pruebas de supervivencia in vitro a las distintas condiciones del tracto gastrointestinal | 28 |
| 5.3.3. Aptitudes tecnológicas y crecimiento de los aislados en medio de cultivo y leche de vaca | 30 |
| 6. CONCLUSIONES | 33 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 34 |
| 8. ANEXOS | 45 |



1. RESUMEN

La lactancia materna proporciona innumerables beneficios relacionados con la salud materno-infantil. En este sentido, el estudio de la microbiota de la leche materna resulta de gran interés ya que contiene microorganismos con efecto probiótico potencial, algunos de ellos utilizados actualmente en el tratamiento y la prevención de patologías relevantes en la población infantil. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar microorganismos con un efecto probiótico potencial de muestras de leche materna para su uso en población infantil.

Para ello, se obtuvieron 25 muestras de leche materna de mujeres sanas, que se cultivaron en diferentes medios de cultivo para, posteriormente, identificar los aislados mediante secuenciación parcial del gen 16S ARNr. En aquellos con potencial efecto probiótico pertenecientes a las especies *Ligilactobacillus salivarius* (2) y *Lactobacillus gasseri* (5), se evaluó su cinética de crecimiento, su supervivencia *in vitro* en el tracto gastrointestinal y ciertas aptitudes tecnológicas.

Los aislados que crecían más rápidamente fueron *L. gasseri* 112A y *L. gasseri* 676. Todos los aislados mostraron una reducción significativa de su crecimiento a las condiciones de pH del estómago, sin embargo, las sales biliares no tuvieron efecto. Todos los aislados crecieron en leche y, en algunos casos, se apreciaron cambios fisicoquímicos, lo que podría ser interesante para su uso como probióticos en formulaciones infantiles.

Serían necesarios estudios adicionales para profundizar en la caracterización de las cepas seleccionadas (evaluación de su actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos, resistencia antibiótica, etc.) para su empleo como probióticos en población infantil.

Palabras clave: leche materna, microbiota, probióticos, población infantil.



ABSTRACT

Breastfeeding provides countless benefits related to maternal and infant health. In this regard, the study of breast milk microbiota is of great interest as it contains microorganisms with potential probiotic effects, some of which are currently used in the treatment and prevention of relevant pathologies in the infant population. In this context, the objective of this study was to isolate and identify microorganisms with potential probiotic effects from breast milk samples for use in the infant population.

To achieve this objective, 25 samples of breast milk were obtained from healthy women and cultured in different culture media. Subsequently, the isolates were identified through partial sequencing of the 16S rRNA gene. Among those with potential probiotic effects, belonging to the species *Ligilactobacillus salivarius* (2) and *Lactobacillus gasseri* (5), the growth kinetics, in vitro evaluation of gastrointestinal survival, and certain technological capabilities were evaluated.

The isolates that exhibited the most rapid growth were *L. gasseri* 112A and *L. gasseri* 676. All isolates showed a significant reduction in their growth under stomach pH conditions; however, bile salts had no effect. All isolates demonstrated growth in milk, and in certain cases, some physicochemical changes were observed, which could be interesting for their use as probiotics in infant formulations.

Additional studies would be necessary to further characterize the selected strains (evaluation of their antimicrobial activity against pathogenic microorganisms, antibiotic resistance, etc.) for their use as probiotics in the infant population.

Keywords: breast milk, microbiota, probiotics, infants.



2. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la lactancia materna es el estándar de alimentación de cualquier lactante, independientemente de su edad gestacional o situación médica debido a la composición nutricional y a otros componentes de la leche materna [1]. Además, la lactancia ha demostrado ser beneficiosa para la salud de la mujer [2] y de gran importancia para el vínculo afectivo madre-hijo [3].

La leche materna es un fluido biológico complejo que contiene todos los nutrientes esenciales para el crecimiento y el desarrollo del lactante, además de otros componentes de gran interés en la salud materno-infantil, como por ejemplo células y moléculas con función inmunitaria (linfocitos, inmunoglobulinas, citoquinas, etc.), hormonas y factores de crecimiento, otros compuestos bioactivos (oligosacáridos) y una microbiota característica [4]. Esta composición es variable en función del periodo y la duración de la lactancia materna, así como las características del tipo de parto (prematuro o a término), la dieta materna o la influencia de los ritmos circadianos de la propia mujer [5-7].

Además de todos estos compuestos, en la leche materna también existe un nicho microbiológico diverso, origen de algunos probióticos comercializados actualmente (pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*) por sus potenciales efectos beneficiosos en la salud materno-infantil [8]. Por ello, el estudio de la composición microbiológica de la leche materna, en la búsqueda de nuevas cepas con potencial efecto probiótico es de gran interés.

2.1. Composición de la leche materna

2.1.1. Composición nutricional, inmunológica y compuestos bioactivos

La etapa de lactancia es determinante en la composición nutricional de la leche materna, pues se originan cambios transitorios relativos al aspecto, volumen y composición desde el calostro (primera leche producida durante aproximadamente los primeros 5 días tras el parto), hasta una leche más madura (> 14 días tras el parto). La duración de la lactancia materna puede generar ligeras variaciones en la composición nutricional, microbiológica y en determinados compuestos bioactivos, pero sus características fisicoquímicas no se ven perjudicadas [9-12].

Aunque pueda existir una ligera variación en la composición nutricional en el calostro según el tipo de parto (pretérmino o término) o el contenido en proteínas y/o sodio en la leche madura según el tiempo de duración de la lactancia materna, la composición general de leche materna no sufre grandes modificaciones [13-16]. De manera individual, como se observa en la **Tabla 1**, el calostro es generalmente más rico en la fracción proteica en comparación con la leche madura, la cual es



más rica en grasas y lactosa. Esta concentración proteica ligeramente elevada en el caso del calostro incluye fracciones proteicas con función inmunitaria como pueden ser las inmunoglobulinas (sIgA¹, IgG, IgM), linfocitos (TCD14, Th₁ y Th₂) o factores antimicrobianos (lactoferrina o lisozima) [15,17] de gran importancia para el sistema inmunitario inmaduro de los lactantes, y especialmente en prematuros [18].

Tabla 1. Comparación del aporte energético y la composición de macronutrientes del calostro y la leche madura

| Componentes | Calostro (1-5 días) | Leche madura (>14 días) |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------|
| Energía (Kcal) | 50-60 | 60-70 |
| Agua (%) | 85-90 | 87-90 |
| <i>Macronutrientes</i> | | |
| Proteínas totales (g/L) | 14-16 | 8-10 |
| Grasas totales (g/L) | 15-20 | 35-40 |
| Carbohidratos totales (g/L) | 50-62 | 60-70 |
| Lactosa (g/L) | 20-30 | 67-70 |

Adaptado de Kim et al. (2020) [15] y Lawrence et al. (2021) [19]

Otros componentes bioactivos de gran interés son los oligosacáridos (en inglés, *HMO: Human Milk Oligosaccharides*), compuestos de estructura química compleja con función prebiótica, promoviendo el crecimiento y la actividad de bacterias beneficiosas a nivel intestinal [20-21]. Además, actúan como receptores que inhiben la adhesión de patógenos (como por ejemplo distintos virus que causan gastroenteritis aguda), protegiendo al lactante contra infecciones [22-23] (**Figura 1**). Estos compuestos también se han asociado con la reducción del riesgo de alergia y el desarrollo del sistema inmunológico [24-25].

¹ Inmunoglobulina A secretora

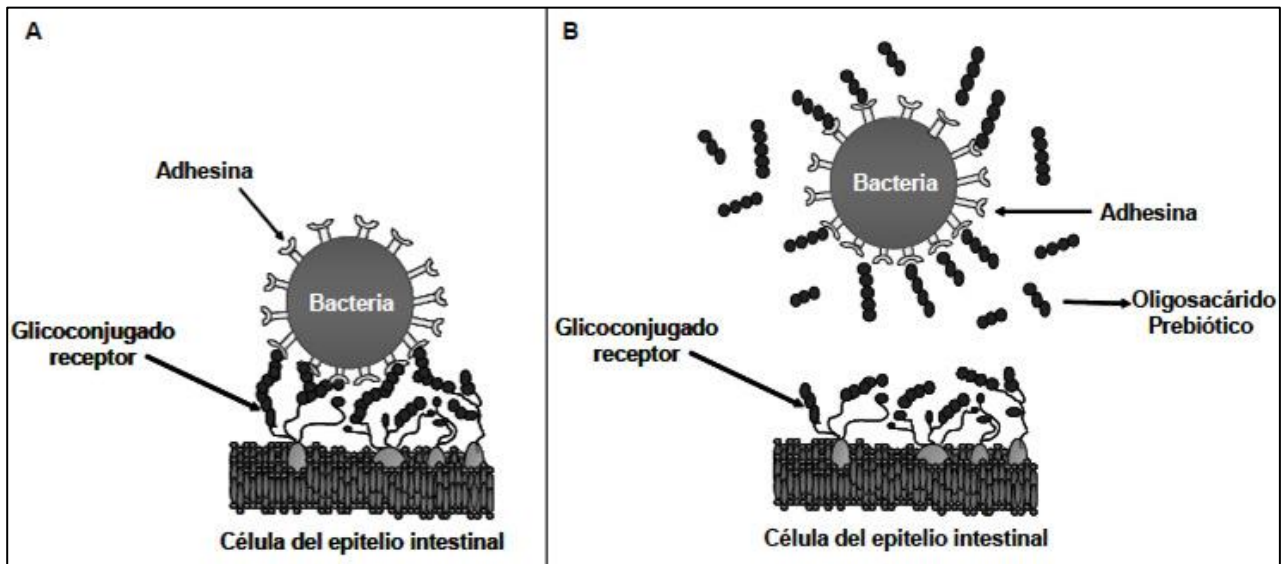


Figura 1. Acción de los oligosacáridos en la prevención de algunas infecciones intestinales. Obtenido de: Oliveira G et al. (2016) [26].

2.1.2. Composición microbiológica de la leche materna

La leche materna presenta una diversidad bacteriana común entre diferentes mujeres, compuesta principalmente por los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y otras grampositivas, aunque también existe variabilidad individual característica de cada mujer. Generalmente, en ausencia de patología subyacente, la concentración microbiológica de la leche materna es $< 3 \log_{10}$ UCF/mL. Varios géneros bacterianos (como, por ejemplo, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) actualmente comercializados como probióticos tienen como origen la leche materna. Esta diversidad bacteriana está condicionada por diversos factores, entre ellos el entorno y la salud materna. Por ejemplo, el desarrollo de infecciones como la mastitis o la disbiosis intestinal juegan un papel importante. En este sentido, la composición microbiana de la leche materna está relacionada con la microbiota intestinal dado que se ha demostrado la traslocación microbiana a través de la ruta enteromamaria [27-30] (**Figura 2**). Otros factores como la duración de la lactancia también pueden modificar esta diversidad bacteriana [31].

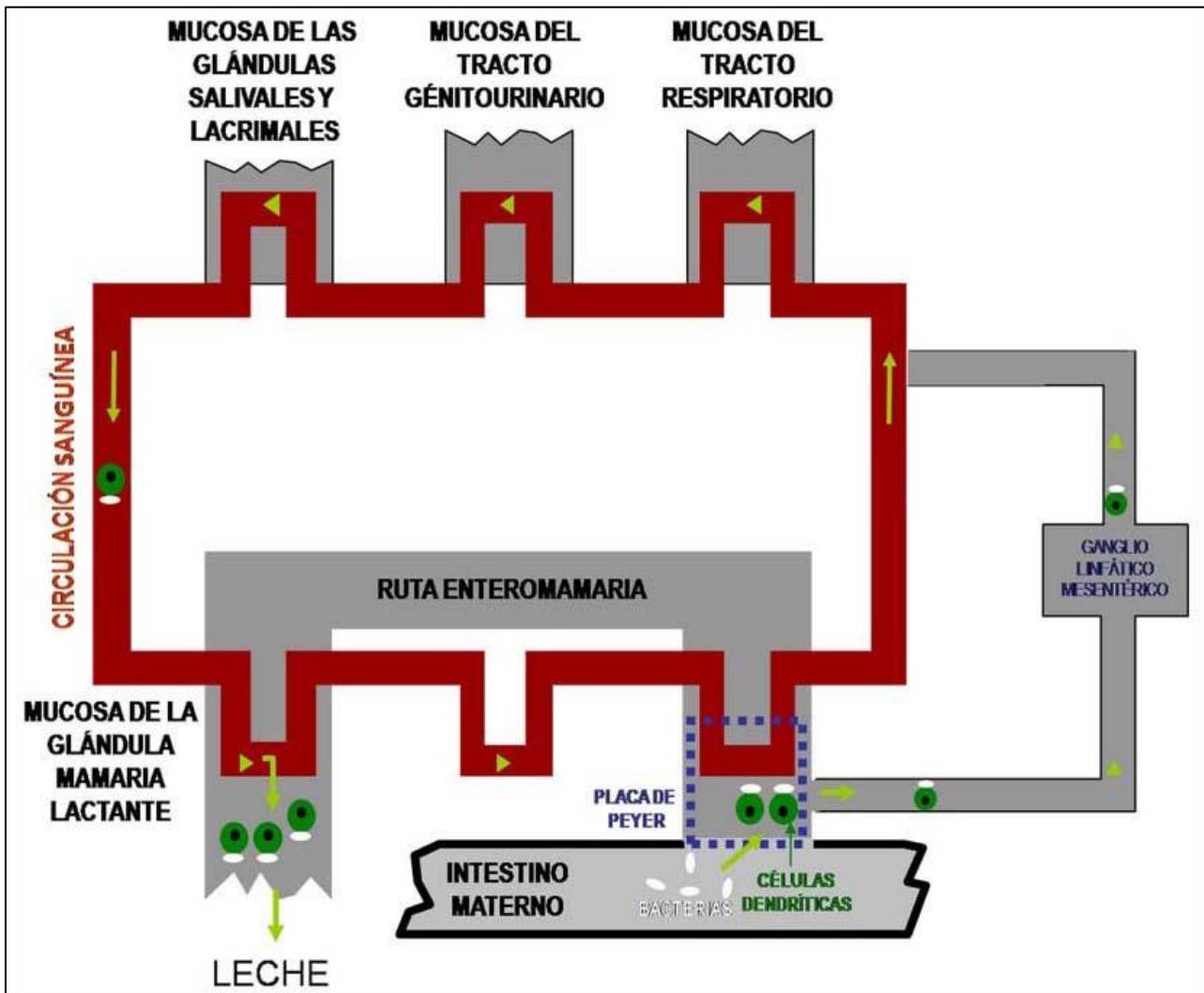


Figura 2. Esquema de la ruta entero-mamaria. Fuente: Fernández et al. (2013) [38].

En el lactante, la colonización microbiana está determinada por distintos factores, como el tipo de parto o el inicio de la lactancia materna [32]. En este sentido, los microorganismos presentes de manera natural en la leche materna son de los primeros colonizadores en los lactantes, contribuyendo a la implantación de una microbiota infantil “saludable” [33].

Se han descrito diferencias en la microbiota de lactantes alimentados con fórmula o con leche materna. Estos últimos presentan una menor incidencia de comorbilidades a corto, medio y largo plazo y menor mortalidad debido a infecciones, siendo estas una de las primeras causas de mortalidad durante la etapa perinatal, especialmente en el caso de prematuros [34-37].

2.2. Beneficios de la leche materna en la salud materno-infantil

La alimentación con leche materna confiere al lactante adecuado desarrollo [39], así como una protección frente al desarrollo de ciertas infecciones [40] o el riesgo de desarrollar diabetes o



sobrepeso u obesidad [41]. La lactancia materna no sólo reporta beneficios al lactante, sino también a la madre. De hecho, se ha correlacionado con un aumento en los niveles de oxitocina, un mayor bienestar emocional [42], una reducción de la adiposidad [43], la disminución del riesgo de diabetes tipo 2 [44-45] y de enfermedades cardiovasculares [46]. La revisión sistemática de Verduci et al. (2021) [47] destaca el papel de la lactancia en la programación metabólica, repercutiendo en la salud a largo plazo, y en la creación de vínculos afectivos en la unidad madre-hijo

No obstante, en situaciones donde no hay disponibilidad de leche materna propia para alimentar al lactante, se recurre a los preparados para lactantes y la leche materna donada. Un banco de leche es un servicio especializado cuyo objetivo es promover la lactancia materna y procesar y suministrar leche donada de una forma segura y estandarizada a todo aquel lactante que la precise. En España, el primer banco de leche se fundó en el año 2001 en las Islas Baleares, seguido en 2007 por el del Hospital 12 de octubre de Madrid [48]. Posteriormente se crearon nuevos bancos de leche en otras provincias. La leche materna ha demostrado ser adecuada para el desarrollo y el crecimiento de los lactantes, además de proteger frente el desarrollo de la enterocolitis necrotizante (NEC) [49-50]. Lamentablemente, el proceso de pasteurización al que se somete la leche de donante hace que la microbiota se vea comprometida y la leche pierda su capacidad probiótica [27].

2.3. Uso de probióticos en lactantes. Criterios de selección y seguridad

La leche materna puede contener propiedades probióticas gracias a algunos géneros como *Lactobacillus*. En este sentido, se sabe que algunas especies bacterianas presentes en la leche materna pueden proteger frente a ciertas infecciones [8]. Esto es de gran interés a nivel clínico, por lo que el uso de cepas probióticas en el ambiente hospitalario está en auge desde hace unos años para tratar diferentes trastornos digestivos (diarrea/estreñimiento, enterocolitis necrotizante) en la población infantil [51], así como infecciones del tracto respiratorio o las afecciones de la piel como el desarrollo de eczemas o dermatitis atópica, como se ha recopilado en la **Tabla 2**.

Según la FAO/OMS, se puede considerar a un probiótico: “*microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador*” (FAO/OMS, 2001) [52]. No obstante, para considerar una cepa probiótica, se deben tener en cuenta diferentes criterios científicos, clínicos y, tecnológicos recogidos en la **Figura 3**. Como puede apreciarse, antes de la comercialización de probióticos deben realizarse diferentes ensayos que determinen la inocuidad de la cepa para su uso en la salud humana, así como el cálculo de la dosis efectiva para conseguir un efecto beneficioso y la evaluación de la supervivencia del microorganismo a lo largo del tiempo. Específicamente, *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. gozan de evidencia científica suficientemente contrastada en términos de seguridad y propiedades



beneficiosas, siendo considerados como especies *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*; FDA, Estados Unidos) o *QPS* (*Qualified Presumption of Safety*, EFSA, EU) (EFSA, 2013) [53], incluso en población infantil [54-57].

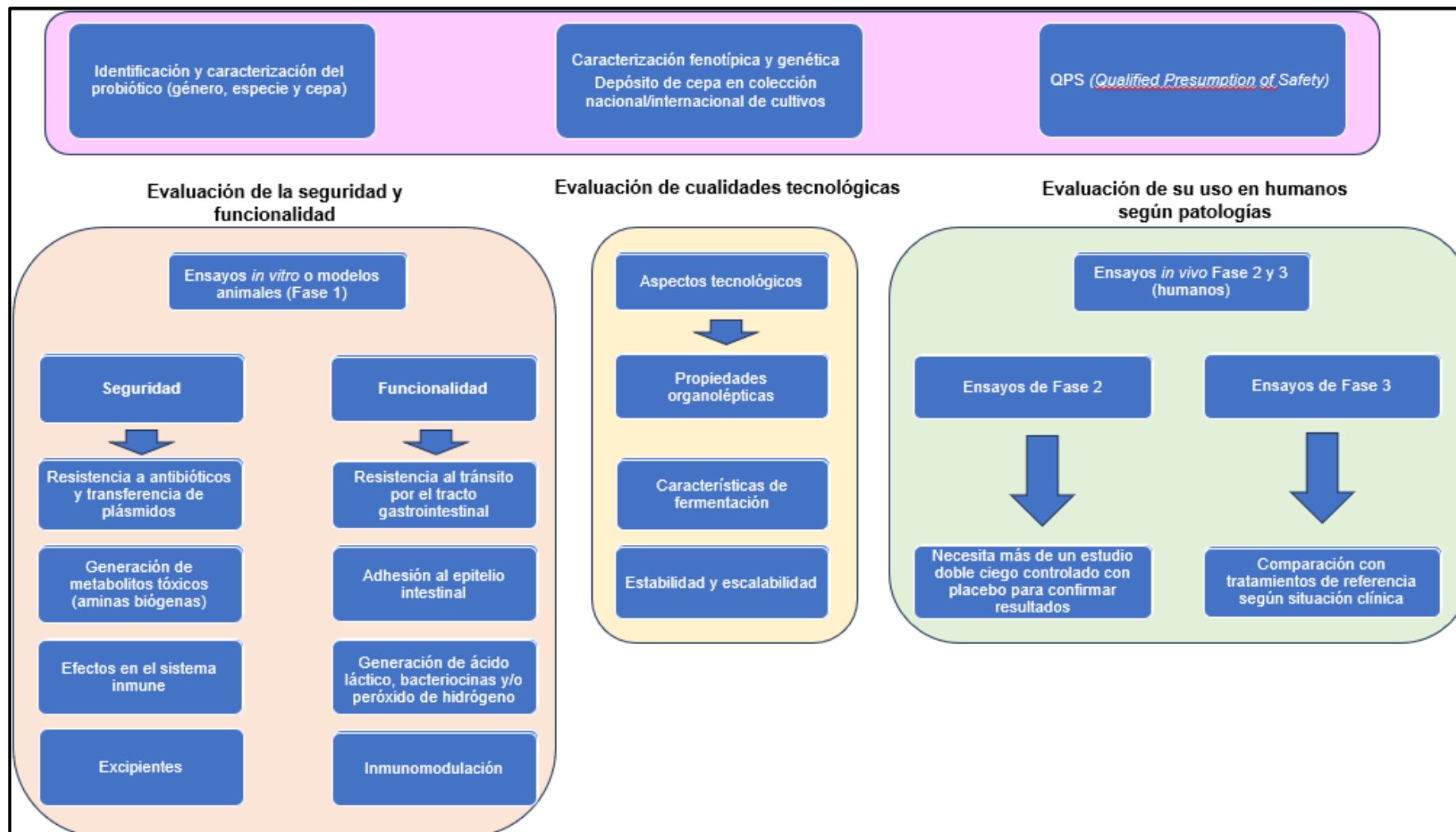


Figura 3. Directrices para la evaluación de los probióticos. Adaptado de Calatayud Álvarez et al. (2018) [58] y Roe et al. (2022) [59].

Tabla 2. Recopilación de estudios que evalúan el empleo de probióticos en población infantil como prevención o tratamiento de diferentes patologías

| Patología | Tipo de probiótico | Nº pacientes (criterio de inclusión) | Resultados principales | Referencia | |
|--------------------------|---------------------------------------|---|--|---|---------------------------|
| Afecciones respiratorias | Asma, rinitis | <i>L. rhamnosus</i> GG | 92 (0-7 años) | No se observaron diferencias significativas entre el control vs intervención en la incidencia acumulada de asmas, rinitis y eczema. | Cabana et al. (2022) [60] |
| | Infección respiratoria superior (IRS) | <i>L. rhamnosus</i> GG <i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> BB-12 <i>L. acidophilus</i> NCFM <i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bi-07 | 2.417 (0-10 años) | No se encontraron efectos adversos. <i>L. rhamnosus</i> GG mostró significancia estadística en la prevención del resfriado común. Las demás cepas probióticas utilizadas para el tratamiento de IRS mostraron significancia estadística en la reducción de nuevos episodios de enfermedad. | Araujo et al. (2015) [61] |
| Afecciones digestivas | NEC | Cultivos mono especie o combinaciones de las siguientes: <i>Bacillus</i> spp.; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Bifidobacterium</i> spp.; <i>S. salivarius</i> subsp <i>thermophilus</i> | 8.319 casos 9.283 controles (< 32 SEG) | Los probióticos multiespecie reducen significativamente la mortalidad. | Wang et al. (2023) [62] |
| | NEC | Cultivos mono especie o combinaciones de las siguientes: <i>Bifidobacterium</i> spp.; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Saccharomyces</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp. | 10.812 (< 32 SEG y/o < 1.500g) | Los probióticos multiespecie han demostrado reducir el riesgo de NEC. Se plantea además el uso de simbióticos combinados con HMO. | Sharif et al. (2020) [63] |

Tabla 2. (Continuación)

| Patología | Tipo de probiótico | Nº pacientes (criterio de inclusión) | Resultados principales | Referencia | |
|-----------------------|--------------------|--|---|--|-------------------------------|
| Afecciones digestivas | NEC | 5 estrategias con cultivos monoespecie o combinaciones de estas: <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Bifidobacterium</i> spp.; <i>Bacillus</i> spp.; <i>Saccharomyces</i> spp. | 9.161 prematuros (< 2.500g) | Las preparaciones multiespecie con <i>Bifidobacterium</i> spp. mostraron un mayor efecto en bebés prematuros. Los otros géneros de probióticos no lograron mostrar un efecto evidente para reducir la incidencia de NEC. | Bi et al. (2019) [64] |
| | Cólico | <i>L. reuteri</i> DSM 17938 | 4.899 lactantes (< .500g) | <i>L. reuteri</i> DSM 17938 puede acortar la duración del llanto en lactantes con cólico infantil. | Hjern et al. (2020) [65] |
| | Cólico | Cultivos monoespecie o multiespecie: <i>L. paracasei</i> ; <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> GG. <i>Bifidobacterium animalis</i> ; <i>Streptococcus</i> spp. | 1.886 lactantes (incluyendo prematuros de 32 SEG) | Se estudiaron probióticos mono- y multiespecie con diferentes combinaciones. Además, dos trabajos estudiaron la influencia del uso de probióticos durante el embarazo y la administración continuada al lactante después del nacimiento. No se encontraron diferencias en la reducción del cólico, pero sí en la duración del llanto del lactante (se encontró diferencia significativa para la cepa <i>L. reuteri</i> DSM). | Ong et al. (2019) [66] |
| | Diarrea | <i>L. rhamnosus</i> GG vs preparado probiótico multicepa de: <i>L. rhamnosus</i> GG + <i>L. helveticus</i> R0052 | 1.770 (3-48 meses) | La administración de probióticos no previene el desarrollo de gastroenteritis de moderada a grave dentro de los 14 días posteriores a la administración independientemente de la duración o frecuencia de la diarrea antes de la presentación. | Schnadower et al. (2021) [67] |

Tabla 2. (Continuación)

| | Patología | Tipo de probiótico | Nº pacientes (criterio de inclusión) | Resultados principales | Referencia |
|--------------------------|--|---|--|--|------------------------------|
| Afecciones digestivas | Diarrea | <i>L. reuteri</i> | 247 (4 meses) | <i>L. reuteri</i> DSM 17938 no fue efectivo para la prevención de la diarrea asociada a antibióticos | Kołodziej et al. (2019) [68] |
| | Eczema, dermatitis y otras afecciones afines | <i>L. rhamnosus</i> GG. Preparado probiótico multicepa: <i>Bifidobacterium</i> spp + <i>Lactococcus</i> spp + <i>Propionibacterium</i> spp. | 4.011 lactantes (0-12 meses) | Se observó que el uso de <i>L. rhamnosus</i> GG presentaba significancia estadística para la prevención del eczema durante el embarazo y primeros meses de vida. No se encontró significancia estadística para sibilancias, asma o enfermedad alérgica. | Sun et al. (2022) [69] |
| Afecciones de la piel | Dermatitis atópica | <i>Bifidobacterium</i> spp; <i>Lactobacillus</i> spp; Preparado probiótico multicepa sin especificar. | 3.039 (0-17 años) | El preparado probiótico multicepa mostró los resultados más significativos en la prevención de la dermatitis, seguido de <i>Lactobacillus</i> spp. No obstante, <i>Bifidobacterium</i> spp. obtuvo resultados negativos para la prevención de la dermatitis. | Jiang et al. (2020) [70] |

SEG: semanas de edad gestacional; HMO: *Human milk oligosaccharides* (Oligosacáridos de le leche humana); NEC: enterocolitis necrotizante; ; *L. rhamnosus*: *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG; *L. gasseri*: *Lactobacillus gasseri*; *B. animalis*: *Bifidobacterium animalis*; *L. acidophilus*: *Lactobacillus acidophilus*; *S. salivarius* subsp *thermophilus*: *Streptococcus salivarius subespecie thermophilus*; *L. reuteri*: *Limosilactobacillus reuteri*; *L. paracasei*: *Lacticaseibacillus paracasei*; *L. cremosis*: *Lactococcus cremoris*; *L. delbrueckii*: *Lactobacillus delbrueckii*; *B. longum*: *Bifidobacterium longum*; *B. infantis*: *Bifidobacterium infantis*; *B. breve*: *Bifidobacterium breve*; *C. butyricum* miyair: *Clostridium butyricum miyair*; *L. plantarum*: *Lactiplantibacillus plantarum*; *L. helveticus*: *Lactobacillus helveticus*.



3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La lactancia materna proporciona innumerables beneficios relacionados con la salud materno-infantil. En este sentido, el estudio de la microbiota de la leche materna resulta de gran interés ya que este fluido contiene microorganismos con potencial efecto probiótico, y algunos de ellos se utilizan actualmente en el tratamiento y la prevención de patologías relevantes en la población infantil. En este contexto, el **objetivo principal** del presente trabajo fue aislar e identificar microorganismos con un efecto probiótico potencial de muestras de leche materna para su uso en población infantil.

Para conseguirlo se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

1. Analizar la composición bacteriana de las muestras de leche materna mediante culturómica.
2. Identificar por técnicas genéticas distintos aislados para seleccionar especies con potencial efecto probiótico.
3. Caracterizar los aislados seleccionados mediante la evaluación de su cinética de crecimiento, su supervivencia *in vitro* a su paso por el tracto gastrointestinal y ciertas aptitudes tecnológicas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Revisión bibliográfica

Para abordar este trabajo, en primer lugar, se realizó una revisión de la literatura científica utilizando las siguientes bases de datos científicas: *Pubmed* y *Web of Science*. También se realizó una búsqueda en *Google Scholar* de aquellos artículos que no estaban a texto completo en las anteriores bases de datos. La búsqueda fue realizada en inglés mediante distintas combinaciones y agrupaciones de las siguientes palabras clave: *Human Milk microbiota, hospitalized infant, preterm, neonate, outbreak, neonatal intensive care unit, microbiome, probiotic, benefits breastfeeding*. Se incluyeron metaanálisis, revisiones sistemáticas, ensayos clínicos aleatorizados (ECA), estudios multicéntricos, estudios observacionales y de intervención, así como estudios de casos y controles en los últimos 10 años. No obstante, para desarrollar el apartado de la introducción se seleccionaron algunos estudios más antiguos debido a su relevancia.

4.2. Diseño del estudio

El reclutamiento de las mujeres lactantes que participaron en el estudio se realizó dando a conocer el trabajo en los tabloneros de anuncios de varias Facultades de Ciencias de la Salud de la UCM, así como en Asociaciones de Lactancia Materna y Centro de Salud de la Comunidad Autónoma de Madrid.



Los criterios de inclusión fueron los siguientes (**Anexo 1**):

- Ser mayor de edad.
- No tener ninguna patología crónica o aguda conocida.
- No haber tomado antibióticos en los últimos 3 meses.
- No haber tomado probióticos en los últimos 3 meses.
- No haber participado en otro estudio de investigación en los últimos 3 meses.
- No haber recibido transfusiones de sangre o hemoderivados en los últimos 3 meses.
- Estar alimentando al bebé con lactancia materna exclusiva o mixta.
- El lactante es menor de 12 meses.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón (CEICA) con número PI22/447 (**Anexo 2**).

Todas las mujeres participaron de manera voluntaria, firmaron el consentimiento informado, y se les aportó toda la información sobre la finalidad del estudio y el procedimiento de obtención de las muestras de leche materna. En total, participaron 25 mujeres lactantes que donaron aproximadamente 50 mL de leche materna.

4.3. Obtención de las muestras de leche materna

En el momento de la firma de consentimiento informado, a todas las participantes se les explicó el procedimiento de obtención y conservación de las muestras de leche materna, adaptado del Procedimiento en Microbiología Clínica Nº 54 de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [71] (**Figura 4**). A continuación, se enumeran las principales recomendaciones dadas a las participantes para evitar la contaminación de la muestra y garantizar su conservación adecuada:

- La muestra se debe recoger inmediatamente antes de la toma, y si es posible, tras haber transcurrido al menos 2 h desde la anterior.
- Evitar el uso de pezoneras o la aplicación de cremas/pomadas. En caso contrario, lave el pecho con agua y jabón y seque bien con una toalla antes de realizar la extracción.
- Realizar el lavado de las manos con agua y jabón antes de realizar la extracción.
- Asegúrese de que las partes de la bomba de extracción que están en contacto con su pecho están correctamente higienizadas.
- Utilizar recipientes estériles para recoger la muestra. Estos pueden ser biberones de cristal siempre y cuando estén esterilizados previamente. Cerrar bien el recipiente y etiquetar la muestra con fecha y hora de extracción.

- Si la muestra se va a procesar el mismo día, se puede mantener en refrigeración a 4 °C. Si el tiempo transcurrido desde la extracción hasta su procesado es superior a dos horas, debe congelarse a -20 °C.
- Evitar la rotura de la cadena de frío y la exposición de la muestra a la luz.

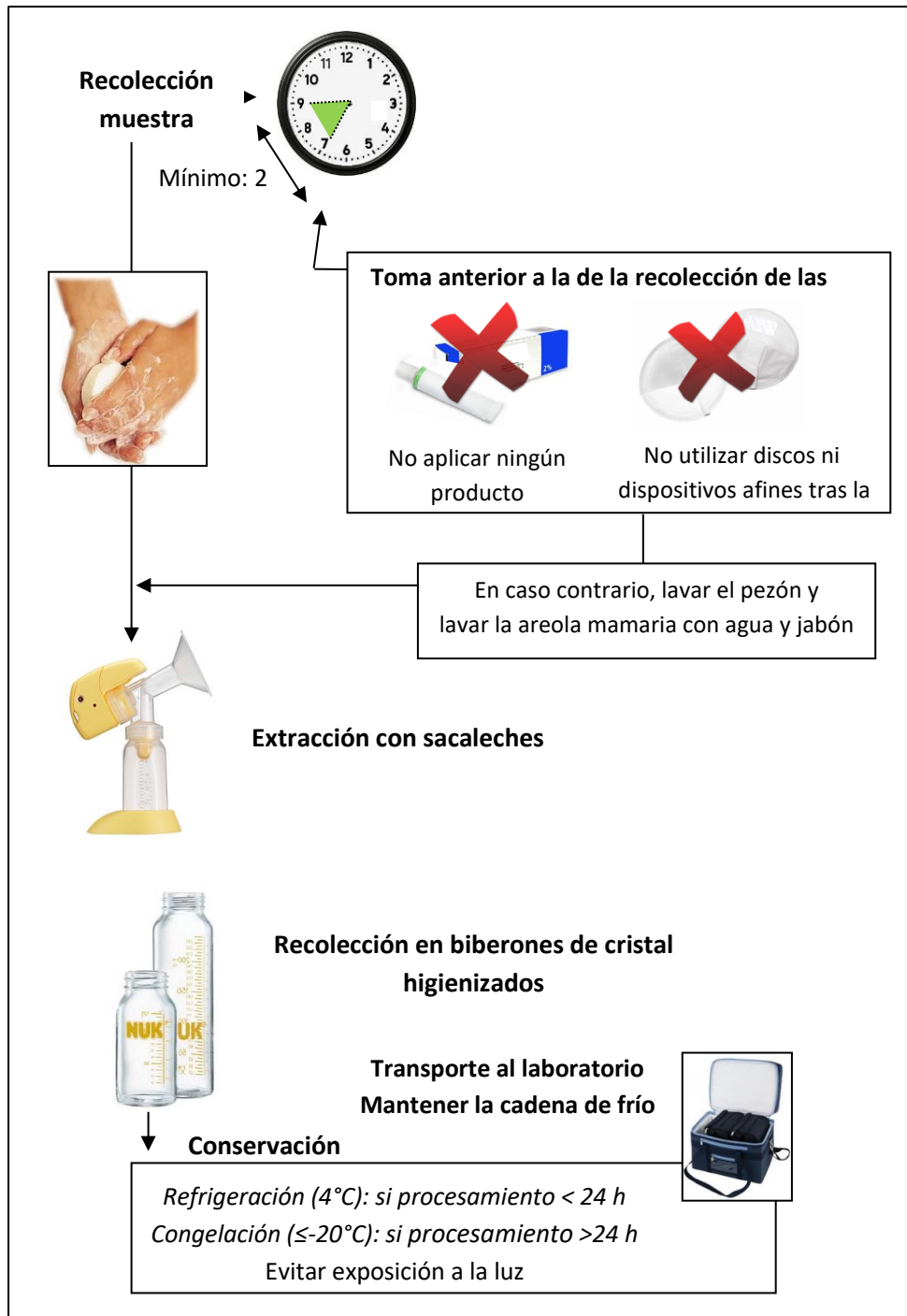


Figura 4. Diagrama de flujo del procedimiento utilizado en este estudio para la obtención y conservación de las muestras de leche materna para su posterior análisis microbiológico. Fuente: Adaptado de Arroyo et al. (2011) [72].



Si bien el protocolo recomendado en el procedimiento de obtención de la muestra recomienda la extracción manual, en este trabajo todas las muestras se obtuvieron mediante el uso de bomba de extracción para obtener una mayor cantidad de muestra de la leche materna.

4.4. Procesamiento de las muestras de leche materna

Este trabajo se ha realizado en 2 fases distintas (**Anexo 3**). La primera fase corresponde a la obtención y alicuotado de todas las muestras; la segunda corresponde al análisis de la microbiota, identificación y selección de los aislados según su potencial efecto probiótico.

Todas las muestras de leche materna se recibieron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se transportaron, en hielo en un tiempo no superior a 1 hora desde su obtención, a los laboratorios del departamento de Farmacia Galénica y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Para procesarlas adecuadamente se descongelaron y alicuotaron en tubos falcon de 15 y 50 mL bajo campana de flujo laminar. 2 mL de cada muestra se alicuotaron en dos tubos eppendorf para posteriormente realizar los análisis. Una vez alicuotadas las muestras se codificaron con un número aleatorio de 3 dígitos sin repetición y se mantuvieron en congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

4.4.1. Preparación de medios de cultivo

Para realizar los análisis microbiológicos, se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- Infusión Agar cerebro-corazón, BHI (*Brain Heart Infusion*, Oxoid®): medio de cultivo de uso general adecuado para el cultivo aerobio de una amplia variedad de microorganismos, incluidos las bacterias, levaduras y mohos filamentosos.
- Agar CNA (*Columbia Nalidixic Acid*, Oxoid®): medio selectivo para bacterias Gram-positivas, especialmente para el recuento de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y otras Gram-positivas.
- Agar MRS (*Man, Rogosa y Sharpe*, Oxoid®): medio selectivo para el crecimiento de bacterias lácticas.
- Agar MacConkey (Oxoid®): medio de cultivo selectivo para las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras especies Gram negativos.
- Agar PEMBA (*Bacillus cereus Selective Agar Base*, Oxoid®): medio específico y selectivo para *Bacillus cereus* y otros bacilos.

Se emplearon medios sólidos para el aislamiento de las bacterias y su posterior recuento, y los medios líquidos se utilizaron para el crecimiento de las colonias y aislados durante 24 horas.



Para la preparación de los medios sólidos, se llenó un vaso de precipitado con la cantidad necesaria de agua destilada, se calentó para una mejor disolución, se traspasó a matraz Erlenmeyer, añadiendo la cantidad de medio de cultivo en polvo según las especificaciones del fabricante. Para solidificar el medio, se utilizó agar bacteriostático (Oxoid®) (15 g/L). La mezcla se llevó a ebullición y posteriormente los medios de cultivo preparados se esterizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se atemperaron en un baño termostatzado a 55 °C y se distribuyeron en placas de Petri (con aproximadamente 20 mL/placa). Dichas placas se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta el momento de utilizarse.

En el caso del medio MRS, se enriqueció con L-cisteína (Sigma®) (0,25 %) y 16 mg de azul de bromofenol (Sigma®) (en este caso, MRSc) para favorecer el crecimiento y poder identificar mejor las bacterias lácticas con ayuda del colorante.

Para la preparación de los medios líquidos (BHI y MRSc), se siguió el procedimiento anterior, pero en este caso la mezcla del agua destilada y el medio se calentó hasta su disolución, y seguidamente se llenaron tubos con tapón de rosca con una cantidad de 10 mL de medio de cultivo. Se esterizaron en autoclave al igual que los medios sólidos.

Las placas de agar CNA, MacConkey y PEMBA se adquirieron ya preparadas (Oxoid®) Además, se utilizó agua de peptona estéril (Sigma®) (15 g/L) para realizar las diluciones decimales de las muestras.

4.4.2. Análisis microbiológico de las muestras de leche materna

Las muestras de leche materna se sembraron en los medios mencionados en el apartado anterior. Para ello, cada placa de medio de cultivo se dividió en cuadrantes en los que se sembraron 20 µL de la muestra de las diluciones decimales apropiadas y se extendieron con un asa de siembra. Posteriormente, se incubaron en estufa a 37 °C durante 48 h en condiciones de aerobiosis. En el caso del agar MRSc, también se realizó una incubación en condiciones de anaerobiosis a 37 °C para facilitar la identificación de las bacterias lácticas y las bifidobacterias. Dato que el objetivo principal de este trabajo fue aislar bacterias lácticas y bifidobacterias con potencial efecto probiótico, todas las colonias que crecieron en agar MRSc en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis se seleccionaron para su posterior identificación. Además, se tomaron aislados de los medios agar MacConkey, PEMBA, CNA y BHI para identificar otras especies de la microbiota de la leche materna.

Se realizaron recuentos totales en los distintos medios en aquella dilución que presentaba entre 30-300 colonias.



Con el fin de confirmar la pureza de los aislados, se realizó un cultivo en caldo BHI que se sembró en placa por agotamiento para visualizar las colonias separadas. Confirmada la pureza, una colonia aislada se transfirió a un tubo de 10 mL de caldo BHI y se incubó durante 24 h a 37 °C. Un mililitro de este cultivo se congeló a -20 °C en un criotubo estéril en presencia de glicerol al 20% (v/v).

4.5. Identificación de los aislados seleccionados de muestras de leche materna por secuenciación parcial del gen 16S ARNr

La identificación de los aislados se realizó mediante secuenciación de un fragmento del gen 16S ARNr, previamente amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para ello se procedió inicialmente a la extracción del ADN a partir de una colonia de cada aislado. La colonia se transfirió a un tubo eppendorf que contenía 100 µL de agua milli-Q estéril. A continuación, se añadieron 20 µL de un tampón de lisis (que contenía dodecil sulfato sódico y NaOH) y los tubos se incubaron en un termobloque a 95 °C durante 5 minutos. Seguidamente se añadieron 180 µL de agua de grado molecular (Sigma[®]) y la mezcla se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un segundo tubo estéril, que se congeló a -20 °C hasta la realización de la PCR.

Cada reacción de PCR contenía los siguientes componentes: (a) Buffer comercial (DNTPs, MgCl₂ y ADN polimerasa) (Bio-Line[®]): 12,5 µL, (b) Cebadores universales Anlacto-I y Anlacto-II: 0,5 µL de cada cebador, (c) Muestra de ADN (extraída en el paso anterior): 2,5 µL, (d) Agua estéril de grado molecular (Sigma[®]): 9 µL. Las reacciones tienen lugar en un termociclador (Bio-Rad[®]), empleando el siguiente programa: 96 °C, 4 minutos (1 ciclo), seguido de 30 ciclos (cada ciclo: 96 °C – 30 s, 50 °C – 30 s y 72 °C – 45 s) y un ciclo final a 72 °C durante 4 minutos.

Tras las PCRs, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (buffer TAE con un 1,2 % de agarosa [Sigma[®]]) para confirmar que cada reacción había originado un solo amplicón.

Se colocaron 5 µL de cada reacción en cada pocillo, a excepción del primer pocillo, en el que se colocaron 5 µL del marcador HyperLadder™ II (Ecogen[®]) y el último pocillo, en el que se pusieron 5 µL de un control negativo (una mezcla con todos los componentes de la PCR, pero a la que no se le había añadido ninguna muestra). La electroforesis se corrió a 90 V durante 30 minutos y el gel se analizó en un transiluminador (Bio-Rad[®]) (**Figura 5**).

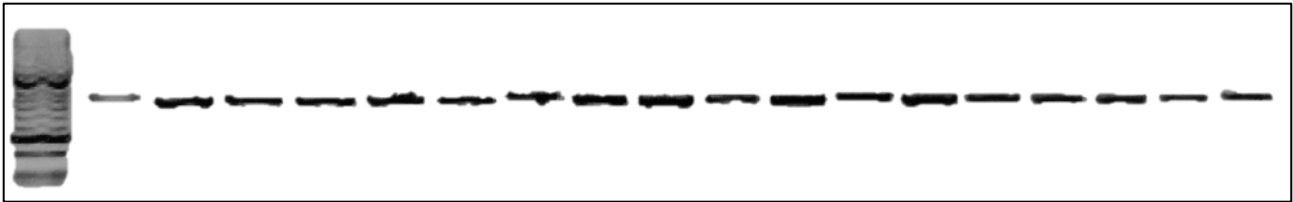


Figura 5. Ejemplo de análisis en transiluminador del gel de agarosa de 19 pocillos. El grosor e intensidad de cada banda corresponde a la concentración de material genético purificado.

Una vez comprobada la existencia de un único amplicón del tamaño correcto, se purificaron los productos de PCR empleando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel®) siguiendo las instrucciones del proveedor. Finalmente, para comprobar la pureza y la concentración de ADN se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS (NanoDrop™, Thermo Scientific®).

Los productos purificados se remitieron en a la empresa STAB-Vida (Portugal) donde se realizó la secuenciación. Las secuencias se analizaron en la plataforma informática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), frente a las depositadas en las bases de datos para determinar el género/la especie a la que pertenecía ca aislado (superior al 95%). Tras la identificación de las secuencias de los aislados obtenidos de leche materna, se seleccionaron 7 aislados de aquellas especies que podrían tener un potencial efecto probiótico, todas ellas pertenecientes al género *Lactobacillus* spp.

4.6. Caracterización de los aislados con potencial efecto probiótico

4.6.1. Cinética de crecimiento

Para realizar la cinética de crecimiento de los aislados seleccionados de las muestras de leche materna, se partió de una colonia aislada que se revitalizó en caldo BHI durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se rellenó una placa de 96 pocillos con 20 µL de BHI y 180 µL de una batería de diluciones decimales del cultivo, siendo el volumen final de cada pocillo de 200 µL. Se incluyó un control empleando solo medio BHI.

Para estudiar la cinética de crecimiento de los aislados seleccionados se midió la absorbancia a 600 nm durante 24 h cada 15 minutos a una temperatura de 37 °C con un lector de placas multipocillos Varioskan Lux (Thermo Scientific®). Los resultados se representaron en una gráfica de Unidades de Absorbancia en función del tiempo (h), a partir de la cual se obtuvo la ecuación de una recta con expresión: $y = a + bx$, donde “a” es la ordenada en el origen y “b” la pendiente. A partir de estos resultados, se calculó la velocidad máxima de crecimiento ($V_{m\acute{a}x}$) (incremento en el número



de células por unidad de tiempo) (h^{-1}) y el tiempo de generación (g) (tiempo que tarda una población microbiana en duplicarse) (h) mediante la siguiente fórmula: $g = \frac{\log 2}{V_{\max}}$

4.6.2. Pruebas de supervivencia in vitro a distintas condiciones del tracto gastrointestinal

Para simular las condiciones del estómago (jugo gástrico) se utilizó BHI ajustado con ácido clorhídrico 1N para conseguir un pH= 2. Para simular las condiciones del intestinales se empleó BHI con distintas concentraciones de sales biliares porcinas (Sigma®) [0,10%, 0,25% y 0,50% (p/v)].

Para los ensayos, se tomó 1 mL de los cultivos de 24 h de los aislados y se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min. Posteriormente, se retiraron los sobrenadantes y las células se resuspendieron nuevamente en caldo BHI. En un tubo eppendorf estéril, a 100 μ L de esta suspensión se le adicionaron 900 μ L de las soluciones descritas anteriormente. En paralelo se realizaron los ensayos control. Las muestras se incubaron durante 2 h a 37 °C. Tras el periodo de incubación. 20 μ L de cada muestra se sembraron las diluciones pertinentes en placas de agar BHI y se realizó un recuento tras 24 h de incubación a 37 °C. Los ensayos se realizaron por duplicado y se expresaron como \log_{10} UFC/mL.

4.6.3. Crecimiento de los aislados en medio de cultivo y leche de vaca

De cara a una aplicación probiótica se evaluó el crecimiento de estos 7 aislados en medios de cultivo y leche de vaca. Para ello, se traspasaron 50 μ L de los aislados almacenados en criotubos con glicerol al 10% a medios de cultivo líquido (MRSc y BHI) para su revitalización. A partir de estos se obtuvieron los cultivos de trabajo que se incubaron por duplicado en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis durante 48 h a 37 °C. Además, se prepararon tubos con 10 mL de leche desnatada en polvo (10% p/v) que se esterilizaron en autoclave, a los que se inocularon 50 μ L del cultivo de cada uno de los aislados y se incubaron en las condiciones comentadas.

Tras las 48 h, los cultivos se sembraron en placas de BHI que se incubaron a 37 °C durante 24 h para poder contabilizar el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Además, se registraron los cambios de textura y la formación de espuma de los cultivos de leche debido al metabolismo bacteriano.

4.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete SPSS versión 28.0.1.1 (15). Se realizaron los estadísticos *t-Student* y análisis de varianzas (ANOVA). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa ante un p-valor= <0,05 con un intervalo de confianza del 95%.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Recuentos microbiológicos de las muestras de leche materna

En la **Tabla 3** se muestran los recuentos microbiológicos de las muestras de leche materna en los distintos medios de cultivo (BHI, CNA, MRSc y MCK) expresados como la media, la mediana, con la varianza, el rango y los valores mínimos y máximos. De las 25 muestras de leche materna incluidas inicialmente en este estudio, en 6 de ellas no se registró crecimiento por lo que no se han tenido en cuenta para este análisis. En general, el valor medio de crecimiento microbiano fue de $4,19 \pm 0,76 \log_{10}$ UFC/mL, con un rango que osciló entre 2,98 y 5,39 \log_{10} UFC/mL para el medio BHI, siendo el medio de cultivo con mayores recuentos microbiológicos. En el medio CNA, selectivo para Gram-positivos, se observó un menor crecimiento ($3,96 \pm 0,83 \log_{10}$ UFC/mL, [2,00 – 5,26 \log_{10} UFC/mL]). En el caso del medio MRSc, selectivo para el crecimiento de bacterias lácticas y bifidobacterias, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los recuentos bajo las distintas condiciones ensayadas, aerobiosis ($3,24 \pm 0,87 \log_{10}$ UFC/mL, [1,40 – 4,44 \log_{10} UFC/mL]) y anaerobiosis ($3,06 \pm 0,90 \log_{10}$ UFC/mL, [1,40 – 4,23 \log_{10} UFC/mL]). Estos resultados son similares a los descritos por otros autores que analizaron muestras de leche materna [73-75].

Tabla 3. Recuentos bacterianos totales (\log_{10} UFC/mL) de las muestras de leche materna (N= 19) en distintos medios de cultivo

| Medio de cultivo | Media (DS) | Varianza | Mediana | Rango | Mínimo | Máximo |
|------------------|-------------|----------|---------|-------|--------|--------|
| BHI | 4,19 (0,76) | 0,58 | 4,41 | 2,41 | 2,98 | 5,39 |
| CNA | 3,96 (0,83) | 0,70 | 4,15 | 3,26 | 2,00 | 5,26 |
| MCK | 2,38 (1,05) | 1,11 | 2,30 | 3,06 | 1,40* | 4,46 |
| MRSc AE | 3,24 (0,87) | 0,75 | 3,44 | 3,04 | 1,40* | 4,44 |
| MRSc ANA | 3,06 (0,90) | 0,82 | 3,22 | 2,83 | 1,40* | 4,23 |

BHI: *Brain Heart Infusion* (medio de cultivo de uso general); CNA: *Columbia Nalidixic Acid* (medio de cultivo selectivo para *Staphylococcus* y *Streptococcus* y otras grampositivas); MCK: MacConkey (medio selectivo para enterobacterias); MRSc: *Man, Rogosa y Sharpe* (medio selectivo para bacterias lácticas) enriquecido con L-cisteína (2%). AE: incubación en aerobiosis; ANA: incubación en anaerobiosis. DS= Desviación estándar. (*) Valor correspondiente al logaritmo de la mitad del límite de detección de la técnica.

En el medio MCK, selectivo para el recuento de enterobacterias, se obtuvieron recuentos inferiores al resto de los medios de cultivo ($2,38 \pm 1,05 \log_{10}$ UFC/mL, [1,40 – 4,44 \log_{10} UFC/mL]). Sin embargo, en alguna de las muestras se obtuvieron valores de crecimiento elevado, como indican los valores máximos de 4,44 \log_{10} UFC/mL. Estos resultados son similares a los obtenidos por Rodríguez-Cruz et al (2020) [74], donde se observaron rangos de crecimiento similares entre muestras de leche materna (2,30 – 3,86 \log_{10} UFC/mL) y valores elevados de enterobacterias en las mismas muestras dado que fueron obtenidas mediante bomba de extracción (2,70 – 4,87 \log_{10} UFC/mL). Reyes et al (2021) [76] también encontraron recuentos elevados de enterobacterias en muestras de leche materna obtenidas mediante bomba de extracción ($> 10^4 \log_{10}$ UFC/mL). Por tanto, una posible falta de buenas prácticas de higiene personal, a la hora de la extracción de las muestras, y/o la correcta limpieza de la bomba de extracción y sus partes, podría explicar los resultados obtenidos con respecto al crecimiento de enterobacterias.

Los resultados correspondientes a los recuentos se representan en la **Figura 6** en forma de diagrama tipo “caja y bigotes”. En algunas muestras sembradas en MCK, MRSc, AE y MRSc ANA, no se registró crecimiento, por lo que se asumió un valor correspondiente a la mitad del log del límite de detección de la técnica (*i.e.* 1,40 \log_{10} UCF/mL).

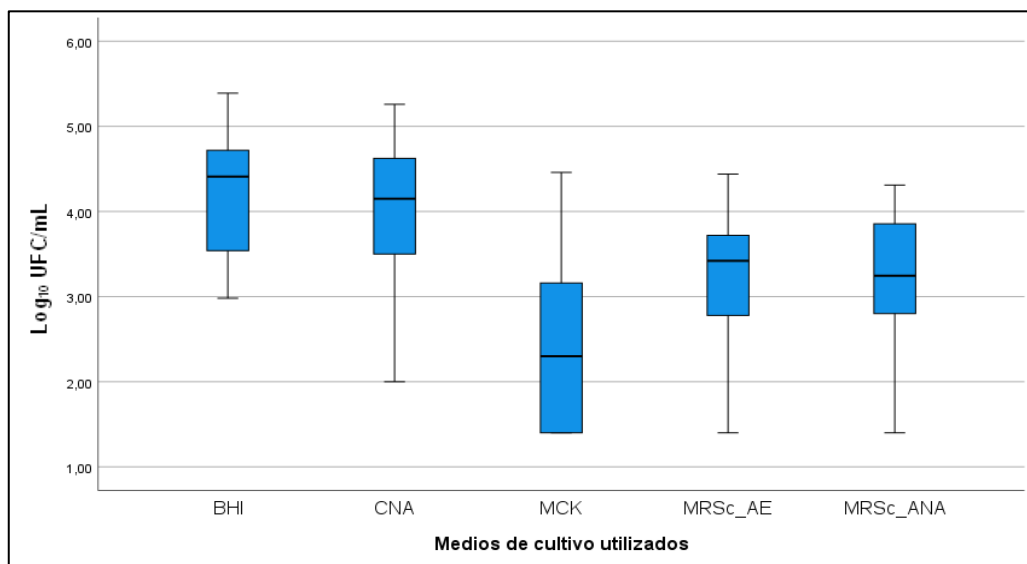


Figura 6. Representación mediante diagrama de caja y bigotes de los recuentos bacterianos (\log_{10} UFC/mL) de las muestras de leche materna (N= 19) en distintos medios de cultivo. BHI: Brain Heart Infusion (medio de cultivo de uso general); CNA: Columbia Nalidixic Acid (medio de cultivo selectivo para *Staphylococcus*, *Streptococcus* y otras bacterias Gram positivas); MCK: MacConkey (medio selectivo para enterobacterias); MRSc: Man, Rogosa y Sharpe (medio selectivo para bacterias lácticas) enriquecido con L-cisteína (2%). AE: incubación en aerobiosis; ANA: incubación en anaerobiosis.

5.2. Identificación de especies microbianas de muestras de leche materna

De las muestras de leche materna, se obtuvieron un total de 102 aislados que se identificaron mediante secuenciación parcial del gen 16S ARNr. En la **Tabla 4** se muestran las especies bacterianas identificadas.

Tabla 4. Identificación de las especies bacterias mediante técnica de secuenciación parcial del gen 16S ARNr en los aislados seleccionados de las muestras de leche materna (N= 102)

| Especies | Nº de especies identificadas (% respecto al total de aislados) |
|---|---|
| <i>Staphylococcus</i> spp. | |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 52 (50,98%) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 (4,90%) |
| <i>Staphylococcus hominis</i> | 4 (3,92%) |
| <i>Staphylococcus pasteurii</i> | 1 (0,98%) |
| <i>Staphylococcus capitis</i> | 1 (0,98%) |
| Bacterias lácticas | |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | 5 (4,90%) |
| <i>Ligilactobacillus salivarius</i> | 2 (1,96%) |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 15 (14,71%) |
| Enterobacteriaceae | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 3 (2,94%) |
| <i>Enterobacter ludwigii</i> | 1 (0,98%) |
| <i>Enterobacter hormaechei</i> | 1 (0,98%) |
| <i>Enterobacter kobei</i> | 1 (0,98%) |
| <i>Klebsiella michiganensis</i> | 1 (0,98%) |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 (0,98%) |
| <i>Kosakonia sacchari</i> | 2 (1,96%) |
| <i>Serratia marcescens</i> | 2 (1,96%) |
| Otros microorganismos | |
| <i>Bacillus cereus</i> | 3 (2,94%) |
| <i>Corynebacterium tuberculostearicum</i> | 1 (0,98%) |
| <i>Propionibacterium</i> spp. | 1 (0,98%) |



Globalmente, el género más frecuente aislado en las muestras fue *Staphylococcus* y la especie mayoritaria dentro de este fue *Staphylococcus epidermidis* (~51% del total de los aislados). Dentro de las bacterias lácticas, la especie mayoritaria fue *Enterococcus faecalis* (~15%) y, además, se identificaron 2 aislados de *Ligilactobacillus salivarius* (anteriormente *Lactobacillus salivarius*) y 5 de *Lactobacillus gasseri*. Respecto a la familia *Enterobacteriaceae*, *Enterobacter* fue el género más representativo. Se identificaron otras enterobacterias pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Kosakonia* y *Serratia*. Se identificaron otros microorganismos como *Corynebacterium tuberculostearicum* y *Propionibacterium* spp.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los descritos en otros estudios similares que identificaron especies bacterianas a partir de muestras de leche materna mediante técnicas de secuenciación parcial del gen 16S ARNr. En estos trabajos los microorganismos aislados fueron principalmente especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*, y también se identificaron bacterias lácticas y otras bacterias grampositivas como *Corynebacterium*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* [8, 74, 76].

En una de las muestras se encontró un aislado identificado como *Bacillus cereus*, con capacidad de formar esporas resistentes a la temperatura, que pueden dar problemas en leches que hayan recibido un tratamiento de pasteurización, como es la leche donada [77].

Las principales especies que se han aislado de muestras de leche materna con efecto probiótico pertenecen a los géneros *Lactobacillus* spp. o *Bifidobacterium* spp.; no obstante, recientes investigaciones están considerando el posible efecto probiótico de otros microorganismos como por ejemplo *Propionibacterium* spp. o *Corynebacterium* spp. [8, 78]. En este trabajo, se seleccionaron los aislados correspondientes al género *Lactobacillus* como potenciales probióticos, concretamente de las especies *L. gasseri* (5 aislados) y *L. salivarius* (2 aislados), cuyas condiciones de crecimiento están reflejadas en las **Tabla 5**.

Tabla 5. Medio de cultivo del que se obtuvieron los aislados seleccionados de leche materna y condiciones de crecimiento

| Especies identificadas | Aislado | Medio | Condiciones de incubación a 37 °C |
|------------------------|---------|-------|-----------------------------------|
| <i>L. gasseri</i> | 112A | PEMBA | Anaerobiosis |
| <i>L. gasseri</i> | 112B | MRS | Anaerobiosis |
| <i>L. gasseri</i> | 112C | MRS | Aerobiosis |
| <i>L. salivarius</i> | 974 | MRS | Anaerobiosis |
| <i>L. salivarius</i> | 165 | MRS | Aerobiosis |
| <i>L. gasseri</i> | 676 | MRS | Anaerobiosis |
| <i>L. gasseri</i> | 833 | MRS | Anaerobiosis |

PEMBA: medio selectivo para bacterias del género *Bacillus*; MRS: *Man, Rogosa y Sharpe* (medio selectivo para bacterias lácticas). *L. gasseri*: *Lactobacillus gasseri*; *L. salivarius*: *Ligilactobacillus salivarius*.

Dentro del género *Lactobacillus*, una de las especies de interés para la salud gastrointestinal es *L. gasseri*, que ha mostrado eficacia en la mejora de la barrera intestinal, al aumentar los niveles de inmunoglobulina A secretora (SIgA) en el intestino delgado facilitando la defensa intraepitelial contra patógenos, productos microbianos, y en la diarrea asociada a antibióticos [79-80]. Además, Scillato et al. (2021) [81] informaron de la capacidad de antimicrobiana frente a patógenos urogenitales.

Otra de las especies con potencial efecto probiótico es *L. salivarius*. Varios estudios han evidenciado los efectos de las distintas cepas de *L. salivarius* en la salud, atendiendo a su capacidad antimicrobiana, sus efectos inmunológicos o la modulación de la microbiota intestinal y la función de barrera [82]. Con respecto a su capacidad antimicrobiana, Sobrino et al. (2021) [83] informaron que la administración de *L. salivarius*, en sustitución de la terapia antibiótica metafiláctica en modelos animales, tenía un notable efecto inhibitorio de distintos patógenos como *Salmonella* Enteritidis, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y otras bacterias Gram-negativas causantes de infecciones de carácter grave en la población infantil. Recientemente, Jiménez et al. (2021) [84] demostraron el efecto preventivo de la suplementación con *L. salivarius* PS2 sobre la aparición de mastitis en mujeres sanas. Estos resultados son de gran interés para la salud de la mujer y para fomentar la lactancia materna que, en ocasiones, puede verse interrumpida por la aparición de sintomatología compatible con mastitis [85].

5.3. Caracterización de los aislados con potencial efecto probiótico

5.3.1. Cinética de crecimiento

En la **Figura 7** se muestra la cinética de crecimiento de los aislados seleccionados a lo largo de 24 h, expresadas como aumento de la absorbancia (A_{600nm}). La mayoría alcanzaron un crecimiento máximo antes de las diez primeras horas de incubación. De forma individual, el aislado que alcanzó un mayor crecimiento fue *L. gasseri* 833 con un valor aproximado de 1,15 unidades de A_{600nm} (UA_{600nm}). Los aislados *L. salivarius* 165 y *L. salivarius* 974 fueron los que menor crecimiento experimentaron en comparación con el resto de aislados. Los datos representados en la gráfica corresponden a UA_{600nm} , que a su vez reflejan el aumento de turbidez en el medio. El aumento de esta turbidez se debe principalmente al aumento de la concentración celular, pero también puede ser debida a la producción de materiales extracelulares, como exopolisacáridos (EPS), biopolímeros de alto peso molecular, lo que podría en parte explicar las diferencias observadas entre las distintas cepas [85-88].

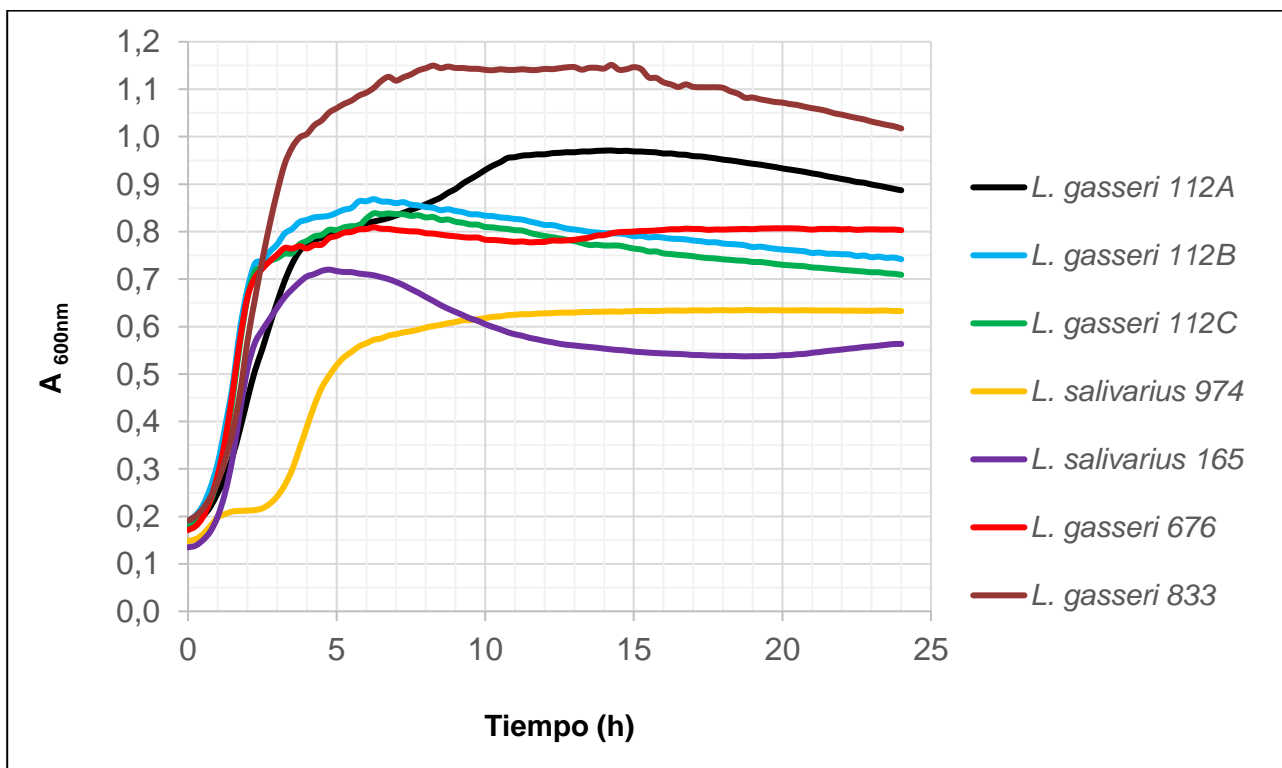


Figura 7. Cinética de crecimiento (24 h) de los aislados de bacterias lácticas seleccionadas a partir de leche materna. *L. gasseri*: *Lactobacillus gasseri*; *L. salivarius*: *Ligilactobacillus salivarius*.

A partir de los datos de las curvas de cinética, se calcularon los parámetros que se incluyen en la **Tabla 6**, la velocidad máxima de crecimiento (h^{-1}) y el tiempo de generación (h). Los aislados con menor tiempo de generación (0,19 y 0,21 h), y por tanto los que crecían más rápidamente, fueron *L. gasseri* 112A y *L. gasseri* 676, respectivamente.

Tabla 6. Parámetros cinéticos relativos a la velocidad máxima de crecimiento ($V_{\text{máx}}$ crecimiento) y tiempo de generación para los diferentes aislados seleccionados de las muestras de leche materna

| Aislados | $V_{\text{máx}}$ crecimiento (h^{-1}) | Tiempo de generación (h) |
|--------------------------|---|--------------------------|
| <i>L. gasseri</i> 112A | 1,55 | 0,19 |
| <i>L. gasseri</i> 112B | 0,97 | 0,31 |
| <i>L. gasseri</i> 112C | 0,97 | 0,31 |
| <i>L. salivarius</i> 974 | 1,49 | 0,20 |
| <i>L. salivarius</i> 165 | 1,01 | 0,30 |
| <i>L. gasseri</i> 676 | 1,43 | 0,21 |
| <i>L. gasseri</i> 833 | 1,06 | 0,28 |

L. gasseri: *Lactobacillus gasseri*; *L. salivarius*: *Ligilactobacillus salivarius*

El resto de aislados de *L. gasseri* presentaron un crecimiento más lento con tiempos de generación similares ($\sim 0,30$ h). Por otro lado, *L. salivarius* 974 presentó un tiempo de generación similar a *L. gasseri* 112A, siendo el aislado que creció más rápido de esta especie. Sin embargo, pese a que en la fase exponencial el crecimiento de esta cepa fue muy rápido, este aislado alcanzó una menor densidad óptica y tuvo mayor fase de latencia que el resto. A pesar de que *L. salivarius* 165 tuvo una $V_{\text{máx}}$ de crecimiento similar a los aislados de *L. gasseri* 112B, 112C y 833, alcanzó valores de crecimiento menores, observándose una bajada del crecimiento a partir de las 5 h de incubación (**Figura 7**).

Las características de crecimiento pueden estar influenciadas, en parte, por el tamaño de cada especie. Rajab et al. (2020) [89] evaluaron el crecimiento de 10 especies del género *Lactobacillus* (incluidas *L. salivarius* y *L. gasseri*) y concluyeron que aquellas con menor tamaño celular presentaban un crecimiento mayor (\log_{10} UCF/mL). Otros factores, como la producción de exopolisacáridos puede contribuir a aumentar los valores de absorbancia debido a un aumento de la turbidez del medio [88]. Se conoce que algunas cepas del género *Lactobacillus* son productoras de EPS, incluídas *L. gasseri* y *L. salivarius*, con un efecto probiótico [86-87] [91-93] Más estudios son pues necesarios para esclarecer las diferencias observadas entre los distintos aislados.

5.3.2. Pruebas de supervivencia *in vitro* a las distintas condiciones del tracto gastrointestinal

Con respecto a la resistencia *in vitro* de los aislados a las diferentes condiciones del tracto gastrointestinal, las condiciones simuladas del estómago (pH= 2) redujeron significativamente ($p= 0,020$) la población microbiana de todos los aislados con respecto al control (**Figura 8**).

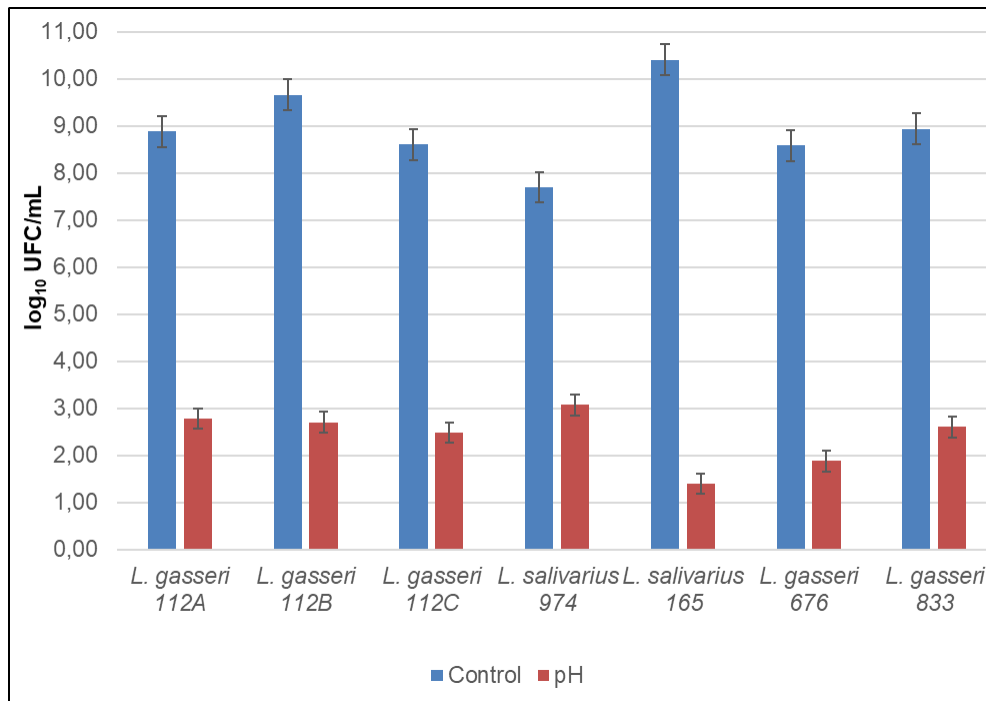


Figura 8. Supervivencia de los aislados seleccionados de leche materna a las condiciones del estómago (jugo gástrico con pH = 2). Los valores representados corresponden al promedio \pm DS ($n=2$). *L. gasseri*: *Lactobacillus gasseri*; *L. salivarius*: *Ligilactobacillus salivarius*

Globalmente se produjo una reducción logarítmica entre 5-8 log₁₀ UFC/mL, siendo *L. salivarius* 165 y *L. gasseri* 676 las cepas más sensibles (población residual tras el tratamiento < 2 log₁₀ UFC/mL) y *L. salivarius* 974 la más resistente (población residual tras el tratamiento ~ 3 log₁₀ UFC/mL). Estos resultados son similares a los de Vougiouklaki et al. (2023) [91] que estudiaron las propiedades probióticas de bacterias lácticas del género *Lactobacillus* y su tolerancia a las condiciones gástricas simuladas *in vitro*. Estos autores concluyeron que especies como *L. rhamnosus*, *L. brevis* y *L. plantarum* son más resistentes que *L. gasseri*, que es más sensible a las condiciones de pH. Rajab et al (2020) [89] también obtuvieron resultados similares al estudiar la supervivencia de distintas cepas de *Lactobacillus* spp. a las condiciones del tracto gastrointestinal. No obstante, algunos estudios han demostrado que ciertas especies del género *Lactobacillus*, concretamente *L. gasseri* y/o *L. salivarius* pueden crecer en condiciones de pH ~ 2 [94-95]. El valor de pH empleado en este trabajo es ligeramente inferior a las condiciones en el estómago de los

adultos (~ pH 2,5-3,5), en el caso de los recién nacidos el pH es ligeramente superior, por lo que el efecto del pH sobre la supervivencia de estos microorganismos sería menos acusado. Con respecto a la supervivencia a las condiciones gástricas (pH = 2), las concentraciones iniciales de estos probióticos deberían ajustarse durante la formulación del preparado para evitar una reducción drástica de la carga microbiana a su paso por el estómago.

Las condiciones del tracto intestinal (sales biliares en concentraciones de 0,10%, 0,25% y 0,50%) (**Figura 9**), no redujeron significativamente el crecimiento de ninguno de los aislados ($p > 0,05$).

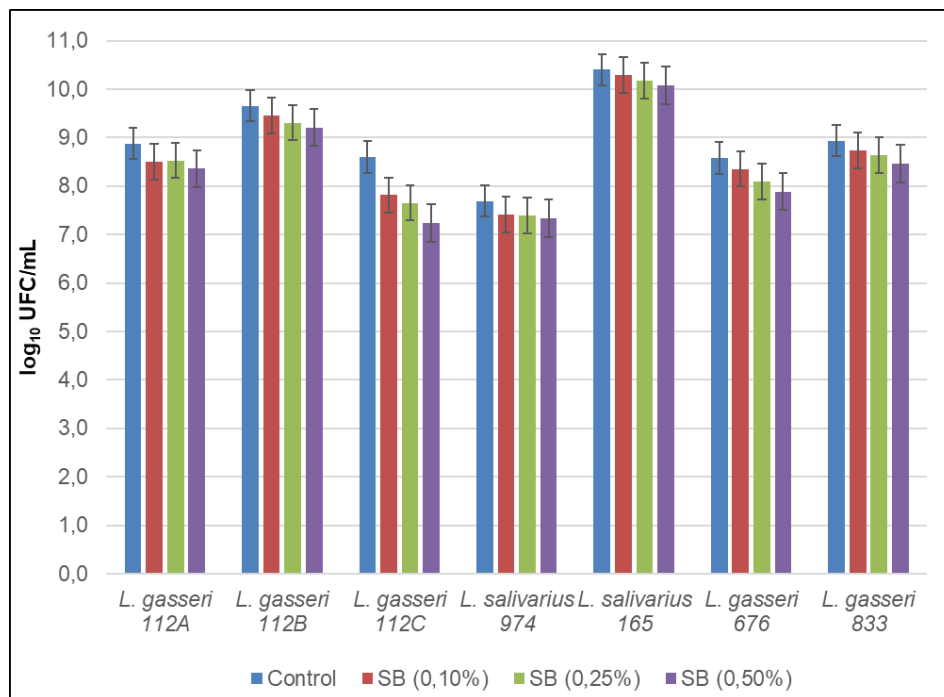


Figura 9. Supervivencia de los aislados seleccionados de leche materna a las condiciones del tracto gastrointestinal. Los valores representados corresponden al promedio \pm DS ($n = 2$). SB: Sales biliares. *L. gasseri*: *Lactobacillus gasseri*; *L. salivarius*: *Ligilactobacillus salivarius*

Únicamente, el aislado *L. gasseri* 112C mostró una ligera reducción en su crecimiento (~ 1 \log_{10} UFC/mL) al emplear la mayor concentración de sales biliares (0,50%). Los resultados muestran que los aislados obtenidos de leche materna pueden soportar las condiciones simuladas del tracto intestinal (sales biliares). Mahmoud et al. (2022) [95], concluyeron que otros aislados de *L. gasseri* tenían una supervivencia adecuada a las condiciones de pH y sales biliares simuladas. Otros estudios recientes [96-97] relacionaron la supervivencia de *L. salivarius* a las condiciones del tracto intestinal con la síntesis de fosfotransferasas, chaperonas y la producción de exopolisacárido. Esto podría explicar las diferencias que se observan en este trabajo en la tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal *in vitro* para los aislados *L. salivarius* 974 y *L. salivarius* 165.

No obstante, existe una gran variabilidad a nivel de cepa, por ello es importante llevar a cabo estos estudios previamente a su uso como probiótico [89].

5.3.3. Aptitudes tecnológicas y crecimiento de los aislados en medio de cultivo y leche de vaca

En la **Tabla 7** se muestran los resultados obtenidos al crecer los aislados en medio de cultivo BHI y en leche desnatada de vaca en polvo [10% (p/v)] estéril bajo distintas condiciones de incubación. En algunos trabajos previos se ha demostrado que ciertas cepas de *L. gasseri* presentan dificultades para crecer adecuadamente en leche, lo que puede perjudicar su uso como probiótico [98]. Sin embargo, todos los aislados ensayados crecieron en leche adecuadamente.

Tabla 7. Aptitudes tecnológicas y condiciones de crecimiento de los aislados en leche de vaca desnatada en polvo reconstituida al 10% (p/v)

| Especies identificadas | Aislado | Condiciones de incubación a 37 °C | Cambios en el medio | Formación de espuma |
|------------------------|---------|-----------------------------------|---|------------------------|
| <i>L. gasseri</i> | 112A | Aerobiosis Anaerobiosis | Separación de fases Aspecto de “papilla” | Estable Inestable |
| <i>L. gasseri</i> | 112B | Aerobiosis Anaerobiosis | Separación de fases Formación de gel | Inestable Inestable |
| <i>L. gasseri</i> | 112C | Aerobiosis Anaerobiosis | Separación de fases Aspecto de “papilla” | Estable Estable |
| <i>L. salivarius</i> | 974 | Aerobiosis Anaerobiosis | Separación de fases Formación de gel | Estable Estable |
| <i>L. salivarius</i> | 165 | Aerobiosis Anaerobiosis | Separación de fases Separación de fases | Inestable Estable |
| <i>L. gasseri</i> | 676 | Aerobiosis Anaerobiosis | Formación de gel Formación de gel | Inestable Inestable |
| <i>L. gasseri</i> | 833 | Aerobiosis Anaerobiosis | Formación de gel Separación de fases | Inestable Inestable |

L. gasseri: *Lactobacillus gasseri*; *L. salivarius*: *Ligilactobacillus salivarius*.

Cuando los aislados se incubaron en anaerobiosis, se observó un aumento de la viscosidad en los medios e incluso la formación de geles (**Figura 10**). Cuando los aislados se incubaron en condiciones de aerobiosis y en leche, se observó una tendencia a la separación de fases. El género *Lactobacillus* produce ácidos orgánicos que reducen el pH del medio, lo que podría explicar los cambios visibles en la leche [79]. En concreto, las alteraciones en el pH pueden condicionar la estabilidad de las proteínas lácteas [99-100].

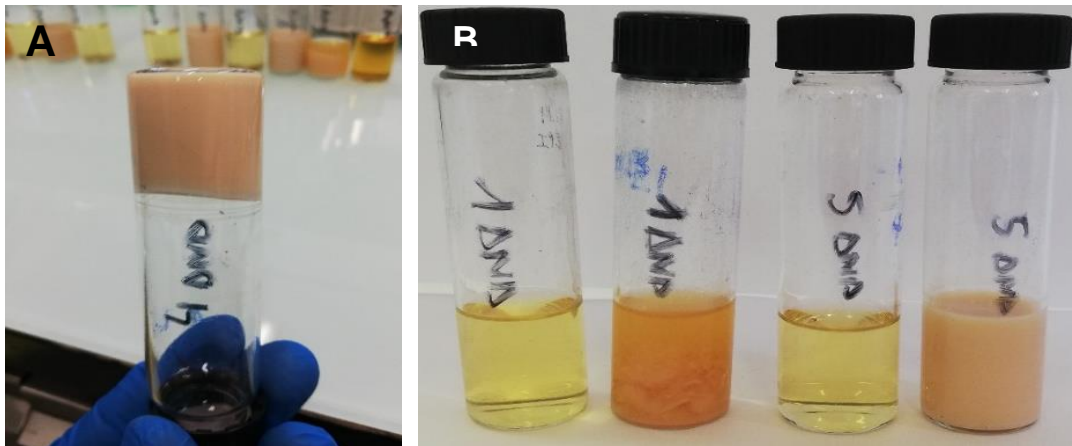


Figura 10. Efecto del crecimiento de los aislados seleccionados en el medio de cultivo BHI y en leche de vaca en polvo esterilizada [10% (p/v)]. (A) Formación de coágulo en leche de vaca. (B) Ejemplo de las diferencias observadas en el aspecto de la leche de vaca

Además, algunos aislados fueron capaces de formar espumas estables. Con respecto a la formación de espumas, esto podría deberse a la generación de biosurfactantes. Los biosurfactantes son moléculas tensioactivas que reducen la tensión superficial de la superficie en contacto entre dos fases (por ejemplo, dos líquidos inmiscibles o un sistema líquido-gas). En función de su naturaleza química, estos biosurfactantes pueden actuar como estabilizadores o solubilizadores de sistemas coloidales (mezclas conformadas por dos o más fases, normalmente una fluida de líquido o gas y otra dispersa en forma de partículas generalmente sólidas muy finas). En ese aspecto, se conoce que bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* son generadoras de estos compuestos tensioactivos que tienen un papel crucial en la reducción de la capacidad de adhesión de varias patógenos [101]. En este sentido, estudiar la capacidad de producción de biosurfactantes de los de los aislados seleccionados en este estudio sería de gran interés para establecer si estos microorganismos son capaces de evitar la adhesión de bacterias patógenas.

Dependiendo del tipo de formulación planteada para la suplementación con estos probióticos, habría que tener en cuenta estos cambios fisicoquímicos observados en la leche. Por ejemplo, un aumento de la viscosidad sería interesante para desarrollar formulaciones espesas con consistencia de puré. En cambio, la formación de espumas sería indeseable en formatos líquidos con alto contenido en grasa porque aumenta la velocidad de oxidación lipídica [102].

Una de las estrategias recientes para la suplementación con probióticos en lactantes y prematuros consiste en restaurar la microbiota de la leche materna en leche donada. A este aspecto, Cacho et al. (2017) [73] consiguieron restaurar la microbiota de la leche materna en muestras de leche pasteurizada adicionando inóculos de la primera, sin observar cambios significativos en la



diversidad de la microbiota restaurada con respecto a la original. Torrez Lamberti et al. (2021) [75] obtuvieron resultados similares utilizando muestras de leche materna congelada como inóculo.

En este sentido, algunos de los aislados obtenidos en este trabajo podrían emplearse con esta finalidad. Serían necesarios estudios adicionales para caracterizar estos aislados y garantizar su eficacia y su seguridad, teniendo en cuenta la vulnerabilidad de los lactantes, y muy especialmente, de los prematuros.



6. CONCLUSIONES

I. Globalmente, la microbiota de las muestras de leche materna está dominada por microorganismos Gram-positivos. Sin embargo, los elevados recuentos de enterobacterias obtenidos en algunas muestras sugieren que su calidad está condicionada por factores externos. En este sentido, unas buenas prácticas de higiene personal y la correcta limpieza de las bombas de extracción y sus partes podrían minimizar la presencia de microorganismos no deseados en la leche materna.

II. El género más frecuentemente aislado en las muestras fue *Staphylococcus* y la especie mayoritaria dentro de este fue *Staphylococcus epidermidis* (~51% del total de los aislados). Entre los microorganismos que se identificaron, se seleccionaron 2 aislados de *Ligilactobacillus salivarius* y 5 de *Lactobacillus gasseri* como probióticos potenciales.

III. Todos los aislados seleccionados fueron capaces de crecer en condiciones de aerobiosis, siendo el aislado que alcanzó un mayor crecimiento *Lactobacillus gasseri* 833. Además, los aislados de esta especie fueron los que presentaron un menor tiempo de generación. Esto podría ser una ventaja competitiva para su empleo en una formulación probiótica frente a los aislados de la especie de *Ligilactobacillus salivarius*.

IV. Las condiciones simuladas del estómago redujeron significativamente y de forma drástica la población microbiana de todos los aislados, mientras que la presencia de sales biliares fue bien tolerada. De cara a una optimización de la concentración microbiana del preparado probiótico se deben pues considerar estas pérdidas de viabilidad a su paso por el tracto gastrointestinal.

V. Serían necesarios estudios adicionales para profundizar en la caracterización probiótica de las cepas seleccionadas (evaluación de su actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos, resistencia antibiótica, etc.) para su empleo en población infantil.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018). Guía para la aplicación: proteger, promover y apoyar la lactancia materna en los establecimientos que prestan servicios de maternidad y neonatología: revisión de la iniciativa hospitales amigos del niño 2018. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326162>. [Internet]. Consultado: Julio 2023.
2. Del Ciampo LA, Del Ciampo IRL. Breastfeeding and the benefits of lactation for women's health. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2018;40(6):354-359. English. doi: 10.1055/s-0038-1657766)
3. Peñacoba C, Catala P. Associations between breastfeeding and mother-infant relationships: a systematic review. *Breastfeed Med.* 2019;14(9):616-629. doi: 10.1089/bfm.2019.0106).
4. Yi DY, Kim SY. Human breast milk composition and function in human health: from nutritional components to microbiome and microRNAs. *Nutrients.* 2021;13(9):3094. doi: 10.3390/nu13093094.
5. Bravi F, Wiens F, Decarli A, Dal Pont A, Agostoni C, Ferraroni M. Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2016;104(3):646-62. doi: 10.3945/ajcn.115.120881.
6. Italianer MF, Naninck EFG, Roelants JA, van der Horst GTJ, Reiss IKM, Goudoever JBV, Joosten KFM, Chaves I, Vermeulen MJ. Circadian variation in human milk composition, a systematic review. *Nutrients.* 2020;12(8):2328. doi: 10.3390/nu12082328.
7. Poulsen KO, Meng F, Lanfranchi E, Young JF, Stanton C, Ryan CA, Kelly AL, Sundekilde UK. Dynamic changes in the human milk metabolome over 25 weeks of lactation. *Front Nutr.* 2022;9:917659. doi: 10.3389/fnut.2022.917659.
8. Fernández L, Rodríguez JM. Human milk microbiota: origin and potential uses. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2020; 94:75-85. doi: 10.1159/000505031.
9. Suárez Rodríguez M, Iglesias García V, Ruiz Martínez P, Lareu Vidal S, Caunedo Jiménez M, Martín Ramos S, García López E. Composición nutricional de la leche materna donada según el periodo de lactancia. *Nutr Hosp* 2020;37(6):1118-1122 DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.03219>.
10. Golan Y, Assaraf YG. Genetic and physiological factors affecting human milk production and composition. *Nutrients.* 2020;12(5):1500. doi: 10.3390/nu12051500.
11. Basdeki AM, Fatouros DG, Biliaderis CG, Moschakis T. Physicochemical properties of human breast milk during the second year of lactation. *Curr Res Food Sci.* 2021;4:565-576. doi: 10.1016/j.crfs.2021.08.001



12. Filatava EJ, Shelly CE, Overton NE, Gregas M, Glynn R, Gregory KE. Human milk pH is associated with fortification, postpartum day, and maternal dietary intake in preterm mother-infant dyads. *J Perinatol.* 2023;43(1):60-67. doi: 10.1038/s41372-022-01492-5.
13. Fischer Fumeaux CJ, Garcia-Rodenas CL, De Castro CA, Courtet-Compondu M.-C., Thakkar SK, Beauport L., Tolsa J.-F., Affolter M. Longitudinal analysis of macronutrient composition in preterm and term Leche humana: un estudio de cohorte prospectivo. *Nutrientes.* 2019; 11 :1525. doi: 10.3390/nu11071525.
14. Mills L., Coulter L., Savage E., Modi N. Contenido de macronutrientes de la leche de donantes de un banco regional de leche humana: variación con las características de la madre y el bebé de la donante. *Hermano J. Nutr.* 2019; 122 :1155–1167. doi: 10.1017/S0007114519002228.
15. Kim SY, Yi DY. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin Exp Pediatr.* 2020;63(8):301-309. doi: 10.3345/cep.2020.00059.
16. Rigourd V, Lopera I, Cata F, Benoit G, Jacquemet B, Lapillonne A. Role of daily milk volume and period of lactation in nutrient content of human milk: results from a prospective study. *Nutrients.* 2020;12(2):421. doi: 10.3390/nu12020421.
17. Rio-Aige K, Azagra-Boronat I, Castell M, Selma-Royo M, Collado MC, Rodríguez-Lagunas MJ, Pérez-Cano FJ. El inmunoglobulinoma de la leche materna. *Nutrientes.* 202;13 (6): 1810. doi: 10.3390/nu13061810).
18. Qazi KR, Bach Jensen G, van der Heiden M, Björkander S, Holmlund U, Haileselassie Y, Kokkinou E, Marchini G, Jenmalm MC, Abrahamsson T, Sverremark-Ekström E. Los bebés extremadamente prematuros tienen alteraciones significativas en su compartimento convencional de células T durante las Primeras Semanas de Vida. *J Immunol.* 2020;204 (1): 68-77. doi: 10.4049/jimmunol.1900941.
19. Lawrence RA, R.M L. Breastfeeding. A Guide for the Medical Profession. 8th ed.: Elsevier; 2021.
20. Garwolińska D, Namieśnik J, Kot-Wasik A, Hewelt-Belka W. Chemistry of Human Breast Milk-A Comprehensive review of the composition and role of milk metabolites in child development. *J Agric Food Chem.* 2018;66(45):11881-11896. doi: 10.1021/acs.jafc.8b04031.
21. Wiciński M, Sawicka E, Gębalski J, Kubiak K, Malinowski B. Human milk oligosaccharides: health benefits, potential applications in infant formulas, and pharmacology. *Nutrients.* 2020;12(1):266. doi: 10.3390/nu12010266.



22. Leong A, Liu Z, Almshawit H, Zisu B, Pillidge C, Rochfort S, Gill H. Oligosaccharides in goats' milk-based infant formula and their prebiotic and anti-infection properties. *Br J Nutr.* 2019;122(4):441-449. doi: 10.1017/S000711451900134X.
23. Hanisch FG, Aydogan C. Oligosaccharides and Viral Infection: Human milk oligosaccharides versus algal fucan-type polysaccharides. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2020;94:124-132. doi: 10.1159/000505338.
24. Plaza-Díaz J, Fontana L, Gil A. Human milk oligosaccharides and immune system development. *Nutrients.* 2018;10(8):1038. doi: 10.3390/nu10081038.
25. Cukrowska B, Bierła JB, Zakrzewska M, Klukowski M, Maciorkowska E. The relationship between the infant gut microbiota and allergy. the role of *Bifidobacterium breve* and prebiotic oligosaccharides in the activation of anti-allergic mechanisms in early life. *Nutrients.* 2020;12(4):946. doi: 10.3390/nu12040946.
26. Oliveira Gabriel y Gonzáles-Molero Inmaculada. Actualización de prebióticos, probióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinol Nutr.* 2016;63(9):482-494. doi: 10.1016/j.endonu.2016.07.006.
27. Fernández L, Ruiz L, Jara J, Orgaz B, Rodríguez JM. Strategies for the Preservation, restoration and modulation of the human milk microbiota. implications for human milk banks and neonatal intensive care units. *Front Microbiol.* 2018; 9:2676. doi: 10.3389/fmicb.2018.02676.
28. Fernández L, Pannaraj PS, Rautava S, Rodríguez JM. The microbiota of the human mammary ecosystem. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:586667. doi: 10.3389/fcimb.2020.586667.
29. Zimmermann P, Curtis N. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *J Infect.* 2020;81(1):17-47. doi: 10.1016/j.jinf.2020.01.023.
30. Qi C, Zhou J, Tu H, Tu R, Chang H, Chen J, Li D, Sun J, Yu R. Lactation-dependent vertical transmission of natural probiotics from the mother to the infant gut through breast milk. *Food Funct.* 2022;13(1):304-315. doi: 10.1039/d1fo03131g.
31. Ding M, Zheng Y, Liu F, Tian F, Ross RP, Stanton C, Yu R, Zhao J, Zhang H, Yang B, Chen W. Lactation time influences the composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* at species level in human breast milk. *Benef Microbes.* 2022;13(4):319-330. doi: 10.3920/BM2021.0119.
32. Mesa MD, Loureiro B, Iglesia I, Fernandez Gonzalez S, Llurba Olivé E, García Algar O, Solana MJ, Cabero Perez MJ, Sainz T, Martinez L, Escuder-Vieco D, Parra-Llorca A, Sánchez-Campillo M, Rodriguez Martinez G, Gómez Roig D, Perez Gruz M, Andreu-Fernández V, Clotet J, Sailer S, Iglesias-Platas I, López-Herce J, Aras R, Pallás-Alonso C, de Pipaon MS, Vento M, Gormaz



- M, Larqué Daza E, Calvo C, Cabañas F. The evolving microbiome from pregnancy to early infancy: a comprehensive review. *Nutrients*. 2020;12(1):133. doi: 10.3390/nu12010133.
33. Asnicar F, Manara S, Zolfo M, Truong DT, Scholz M, Armanini F, Ferretti P, Gorfer V, Pedrotti A, Tett A, Segata N. Studying vertical microbiome transmission from mothers to infants by strain-level metagenomic profiling. *mSystems*. 2017;2(1): e00164-16. doi: 10.1128/mSystems.00164-16.
34. Principi N, Di Pietro G, Esposito S. Bronchopulmonary dysplasia: clinical aspects and preventive and therapeutic strategies. *J Transl Med*. 2018; 16(1).
35. Soriano Faura J, Martín Peinador Y, Pallás Alonso C, García González P, Ginovart Galiana G, Jiménez Moya A, et al. Evaluación y seguimiento del recién nacido prematuro menor de 1500 gramos y/o menor de 32 semanas de gestación. *Pediatría Integral*. 2019. [Consultado el 23 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2019-05/evaluacion-y-seguimiento-del-recien-nacido-prematuro-menor-de-1-500-gramos-y-o-menor-de-32-semanas-de-gestacion/>.
36. Zhang D, Pi C, Zhou L, Yang W. Gold standard for nutrition: a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota. *Microb Cell Fact*. 2021;28;20(1):108. doi: 10.1186/s12934-021-01599-y.
37. Ficara M, Pietrella E, Spada C, Della Casa Muttini E, Lucaccioni L, Iughetti L, Berardi A. Changes of intestinal microbiota in early life. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2020;33(6):1036-1043. doi: 10.1080/14767058.2018.1506760) Zhang S, Li T, Xie J,
38. Fernández L, Rodríguez Gómez JM. Mastitis el lado oscuro de la lactancia: microbiota mamaria: de la fisiología a las mastitis. *Probiserch S.L*. Madrid: Gráficas Pedraza; 2013. ISBN: 978-84-616-2650-2.
39. Ramirez V, Montañó FA, Bautista RJ, Mummidi S, Alvarenga JC, Bautista CJ. Lactation plays a fundamental role in developmental programming. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2021;21(10):1817-1829. doi: 10.2174/1871530320999201209223341.
40. Agbankpe AJ, Dougnon TV, Balarabe R, Deguenon E, Baba-Moussa L. *In vitro* assessment of antibacterial activity from *Lactobacillus* spp. strains against virulent *Salmonella* species isolated from slaughter animals in Benin. *Vet World*. 2019;12(12):1951-1958. doi: 10.14202/vetworld.2019.1951-1958.
41. Ma J, Qiao Y, Zhao P, Li W, Katzmarzyk PT, Chaput JP, Fogelholm M, Kuriyan R, Lambert EV, Maher C, Maia J, Matsudo V, Olds T, Onywera V, Sarmiento OL, Standage M, Tremblay MS,



- Tudor-Locke C, Hu G; ISCOLE Research group. breastfeeding and childhood obesity: A 12-country study. *Matern Child Nutr.* 2020;16(3):e12984. doi: 10.1111/mcn.12984.
42. Whitley J, Wouk K, Bauer AE, Grewen K, Gottfredson NC, Meltzer-Brody S, Propper C, Mills-Koonce R, Pearson B, Stuebe A. Oxytocin during breastfeeding and maternal mood symptoms. *Psychoneuroendocrinology.* 2020;113:104581. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.104581.
43. Guzmán-Mercado E, Vázquez-Garibay EM, Sánchez Ramírez CA, Muñoz-Esparza NC, Larrosa-Haro A, Meza Arreola PL. Full Breastfeeding modifies anthropometric and body composition indicators in nursing mothers. *Breastfeed Med.* 2021;16(3):264-271. doi: 10.1089/bfm.2020.0144.
44. Tarrant M, Chooniedass R, Fan HSL, Del Buono K, Masina S. Breastfeeding and postpartum glucose regulation among women with prior gestational diabetes: a systematic review. *J Hum Lact.* 2020;36(4):723-738. doi: 10.1177/0890334420950259.
45. Hewage SS, Koh XYH, Soh SE, Pang WW, Fok D, Cai S, Müller-Riemenschneider F, Yap F, Tan KH, Chua MC, Lim SB, Godfrey KM, Colega MT, Chong YS, Chan SY, Yoong J, Chong MFF. Breastfeeding duration and development of dysglycemia in women who had gestational diabetes mellitus: evidence from the GUSTO cohort study. *Nutrients.* 2021;13(2):408. doi: 10.3390/nu13020408.
46. Bhatnagar D, Bhatnagar P. Breastfeeding and cardiovascular risk factors. *Curr Opin Lipidol.* 2019;30(1):45-47. doi: 10.1097/MOL.0000000000000564.
47. Verduci E, Gianni ML, Vizzari G, Vizzuso S, Cerasani J, Mosca F, Zuccotti GV. The triad mother-breast milk-infant as predictor of future health: a narrative review. *Nutrients.* 2021;13(2):486. doi: 10.3390/nu13020486.
48. García NR, Peña M, Flores B, Gormaz M, Martínez MJ. asociación española de bancos de leche humana [sede Web]. Madrid: García NR; 2019. Disponible en: <https://www.aeblh.org/>.
49. Altobelli E, Angeletti PM, Verrotti A, Petrocelli R. The impact of human milk on necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2020;12(5):1322. doi: 10.3390/nu12051322.
50. Li Y, Chi C, Li C, Song J, Song Z, Wang W, Sun J. Efficacy of donated milk in early nutrition of preterm infants: a meta-analysis. *Nutrients.* 2022;14(9):1724. doi: 10.3390/nu14091724.
51. Boggio Marzet C, Burgos F, Del Compare M, Gerold I, Tabacco O, Vinderola G. Approach to probiotics in pediatrics: the role of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Arch Argent Pediatr.* 2022;120(1):e1-e7. English, Spanish. doi: 10.5546/aap.2022.eng.e1.



52. *Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization*. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO 2002.
53. *European Food Safety Authority (EFSA)*. Opinión científica sobre el mantenimiento de la lista de agentes biológicos QPS añadidos intencionadamente a alimentos y piensos (actualización de 2013). *EFSA J*. 11: 3449.
54. Van den Akker CHP, van Goudoever JB, Shamir R, Domellöf M, Embleton ND, Hojsak I, Lapillonne A, Mihatsch WA, Berni Canani R, Bronsky J, Campoy C, Fewtrell MS, Fidler Mis N, Guarino A, Hulst JM, Indrio F, Kolaček S, Orel R, Vandenplas Y, Weizman Z, Szajewska H. Probiotics and Preterm Infants: A Position Paper by the *European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition and the European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Working Group for Probiotics and Prebiotics*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020;70(5):664-680. doi: 10.1097/MPG.0000000000002655.
55. Morgan RL, Preidis GA, Kashyap PC, Weizman AV, Sadeghirad B; McMaster Probiotic, prebiotic, and synbiotic work group. probiotics reduce mortality and morbidity in preterm, low-birth-weight infants: a systematic review and network meta-analysis of randomized trials. *Gastroenterology*. 2020;159(2):467-480. doi: 10.1053/j.gastro.2020.05.096. Epub 2020 Jun 24. PMID: 32592699; PMCID: PMC8014956.
56. Chi C, Li C, Buys N, Wang W, Yin C, Sun J. Effects of probiotics in preterm infants: a network meta-analysis. *Pediatrics*. 2021;147(1): e20200706. doi: 10.1542/peds.2020-0706. Epub 2020 Dec 15. PMID: 33323491.
57. Westaway JAF, Huerlimann R, Kandasamy Y, Miller CM, Norton R, Watson D, Infante-Vilamil S, Rudd D. Exploring the long-term colonization and persistence of probiotic-prophylaxis species on the gut microbiome of preterm infants: a pilot study. *Eur J Pediatr*. 2022;181(9):3389-3400. doi: 10.1007/s00431-022-04548-y.
58. Calatayud Álvarez G, Lardiés Mateos AM. Guía de actuación y documento de consenso sobre el manejo de preparados con probióticos y prebióticos en la farmacia comunitaria SEFAC-SEPyP. 2018. ISBN: 978-84-09-01961-8.
59. Roe AL, Boyte ME, Elkins CA, Goldman VS, Heimbach J, Madden E, Oketch-Rabah H, Sanders ME, Sirois J, Smith A. Considerations for determining safety of probiotics: A USP perspective. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2022;136:105266. doi: 10.1016/j.yrtph.2022.105266.



60. Cabana MD, LeCroy MN, Menard-Livingston A, Rodgers CRR, McKean M, Caughey AB, Fong L, Lynch S, Wong A, Leong R, Boushey HA, Hilton JF. Effect of early infant probiotic supplementation on eczema, asthma, and rhinitis at 7 years of age. *Pediatrics*. 2022;149(5): e2021052483. doi: 10.1542/peds.2021-052483. PMID: 35419605.
61. Araujo GV, Oliveira Junior MH, Peixoto DM, Sarinho ES. Probiotics for the treatment of upper and lower respiratory-tract infections in children: systematic review based on randomized clinical trials. *J Pediatr (Rio J)*. 2015 Sep-Oct;91(5):413-27. doi: 10.1016/j.jpmed.2015.03.002. Epub 2015. PMID: 26054771.
62. Wang H, Meng X, Xing S, Guo B, Chen Y, Pan YQ. Probiotics to prevent necrotizing enterocolitis and reduce mortality in neonates: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(8): e32932. doi: 10.1097/MD.00000000000032932. PMID: 36827026.
63. Sharif S, Meader N, Oddie SJ, Rojas-Reyes MX, McGuire W. Probiotics to prevent necrotizing enterocolitis in very preterm or very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;10(10):CD005496. doi: 10.1002/14651858.CD005496.pub5. PMID: 33058137; PMCID: PMC8094746.
64. Bi LW, Yan BL, Yang QY, Li MM, Cui HL. Which is the best probiotic treatment strategy to prevent the necrotizing enterocolitis in premature infants: A network meta-analysis revealing the efficacy and safety. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(41): e17521. doi: 10.1097/MD.00000000000017521. PMID: 31593123; PMCID: PMC6799420.
65. Hjern A, Lindblom K, Reuter A, Silfverdal SA. A systematic review of prevention and treatment of infantile colic. *Acta Paediatr*. 2020;109(9):1733-1744. doi: 10.1111/apa.15247. Epub 2020. PMID: 32150292.
66. Ong TG, Gordon M, Banks SS, Thomas MR, Akobeng AK. Probiotics to prevent infantile colic. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;3(3):CD012473. doi: 10.1002/14651858.CD012473.pub2. PMID: 30865287; PMCID: PMC6415699.
67. Schnadower D, O'Connell KJ, VanBuren JM, Vance C, Tarr PI, Schuh S, Hurley K, Rogers AJ, Poonai N, Roskind CG, Bhatt SR, Gouin S, Mahajan P, Olsen CS, Powell EC, Farion K, Sapien RE, Chun TH, Freedman SB; Pediatric emergency care applied research network and pediatric emergency research canada. association between diarrhea duration and severity and probiotic efficacy in children with acute gastroenteritis. *Am J Gastroenterol*. 2021;116(7):1523-1532. doi: 10.14309/ajg.0000000000001295. PMID: 34183579; PMCID: PMC8259780.



68. Kołodziej M, Szajewska H. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(6):699-704. doi: 10.1016/j.cmi.2018.08.017.
69. Sun S, Chang G, Zhang L. The prevention effect of probiotics against eczema in children: an update systematic review and meta-analysis. *J Dermatolog Treat.* 2022;33(4):1844-1854. doi: 10.1080/09546634.2021.1925077. Epub 2021 PMID: 34006167.
70. Jiang W, Ni B, Liu Z, Liu X, Xie W, Wu IXY, Li X. The role of probiotics in the prevention and treatment of atopic dermatitis in children: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Paediatr Drugs.* 2020;22(5):535-549. doi: 10.1007/s40272-020-00410-6. PMID: 32748341.
71. Delgado S, García-Garrote F, Padilla B, Rodríguez Gómez JM, Romero B. Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y al puerperio. En: Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, eds. *Procedimientos en microbiología clínica*, n.º 54. Padilla B, coord. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2015
72. Arroyo, P. Mediano, V. Martín, E. Jiménez, S. Delgado, L. Fernández, M. Marín, J.M. Rodríguez. Diagnóstico etiológico de las mastitis infecciosas: propuesta de protocolo para el cultivo de muestras de leche humana. *Acta Pediatr Esp.* 2011;69(6): 276-281.
73. Cacho NT, Harrison NA, Parker LA, Padgett KA, Lemas DJ, Marcial GE, Li N, Carr LE, Neu J, Lorca GL. Personalization of the microbiota of donor human milk with mother's own milk. *Front Microbiol.* 2017;8:1470. doi: 10.3389/fmicb.2017.01470.
74. Rodríguez-Cruz M, Alba C, Aparicio M, Checa MÁ, Fernández L, Rodríguez JM. Effect of sample collection (manual expression vs. pumping) and skimming on the microbial profile of human milk using culture techniques and metataxonomic analysis. *Microorganisms.* 2020;8(9):1278. doi: 10.3390/microorganisms8091278.
75. Torrez Lamberti MF, Harrison NA, Bendixen MM, DeBose-Scarlett EM, Thompson SC, Neu J, Parker LA, Lorca GL. Frozen mother's own milk can be used effectively to personalize donor human milk. *Front Microbiol.* 2021;12:656889. doi: 10.3389/fmicb.2021.656889.
76. Reyes SM, Allen DL, Williams JE, McGuire MA, McGuire MK, Hay AG, Rasmussen KM. Pumping supplies alter the microbiome of pumped human milk: An in-home, randomized, crossover trial. *Am J Clin Nutr.* 2021;114(6):1960-1970. doi: 10.1093/ajcn/nqab273.
77. Mallardi D, Piemontese P, Liotto N, Colombo RM, Dodaro A, Schiavello A, Tabasso C, Plevani L, Bezze E, Menis C, Roggero P, Mosca F. New operating approach to limit *bacillus cereus*



- contamination of donor human milk. *J Hum Lact.* 2022;38(1):102-107. doi: 10.1177/08903344211002563.
78. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(10):605-616. doi: 10.1038/s41575-019-0173-3.
79. Dempsey E, Corr SC. *Lactobacillus* spp. for gastrointestinal health: current and future perspectives. *Front Immunol.* 2022;13:840245. doi: 10.3389/fimmu.2022.840245.
80. Mann S, Park MS, Johnston TV, Ji GE, Hwang KT, Ku S. Oral probiotic activities and biosafety of *Lactobacillus gasseri* HHuMIN D. *Microb Cell Fact.* 2021;20(1):75. doi: 10.1186/s12934-021-01563-w.
81. Scillato M, Spitale A, Mongelli G, Privitera GF, Mangano K, Cianci A, Stefani S, Santagati M. Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *Microbiologyopen.* 2021;10(2):e1173. doi: 10.1002/mbo3.1173.
82. Guerrero Sánchez M, Passot S, Campoy S, Olivares M, Fonseca F. *Ligilactobacillus salivarius* functionalities, applications, and manufacturing challenges. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2022;106(1):57-80. doi: 10.1007/s00253-021-11694-0.
83. Sobrino OJ, Alba C, Arroyo R, Pérez I, Sariego L, Delgado S, Fernández L, de María J, Fumanal P, Fumanal A, Rodríguez JM. Replacement of metaphylactic antimicrobial therapy by oral administration of *Ligilactobacillus salivarius* MP100 in a pig farm. *Front Vet Sci.* 2021; 8:666887. doi: 10.3389/fvets.2021.666887.
84. Jiménez E, Manzano S, Schlembach D, Arciszewski K, Martin R, Ben Amor K, Roelofs M, Knol J, Rodríguez JM, Abou-Dakn M, Premium Study Group (2021) *Ligilactobacillus salivarius* PS2 supplementation during pregnancy and lactation prevents mastitis: a randomised controlled trial. *Microorganisms* 9:1933 (10/gnbbzt).
85. Crepinsek MA, Taylor EA, Michener K, Stewart F. Interventions for preventing mastitis after childbirth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;9(9):CD007239. doi: 10.1002/14651858.CD007239.pub4.
86. Castro-Bravo N, Wells JM, Margolles A, Ruas-Madiedo P. Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Front Microbiol.* 2018;9:2426. doi: 10.3389/fmicb.2018.02426.
87. Kawanabe-Matsuda H, Takeda K, Nakamura M, Makino S, Karasaki T, Kakimi K, Nishimukai M, Ohno T, Omi J, Kano K, Uwamizu A, Yagita H, Boneca IG, Eberl G, Aoki J, Smyth MJ, Okumura K. Dietary *Lactobacillus*-derived Exopolysaccharide Enhances Immune-Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 2022 May 2;12(5):1336-1355. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-



- 0929///Sørensen HM, Rochfort KD, Maye S, MacLeod G, Brabazon D, Loscher C, Freeland B. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: production, purification and health benefits towards functional food. *Nutrients*. 2022;14(14):2938. doi: 10.3390/nu14142938.
88. Kaur N, Dey P. Bacterial exopolysaccharides as emerging bioactive macromolecules: from fundamentals to applications. *Res Microbiol*. 2023;174(4):104024. doi: 10.1016/j.resmic.2022.104024.
89. Rajab S, Tabandeh F, Shahraky MK, Alahyaribeik S. The effect of *Lactobacillus* cell size on its probiotic characteristics. *Anaerobe*. 2020 Apr;62:102103. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.102103.
90. Vougiouklaki D, Tsironi T, Tsantes AG, Tsakali E, Van Impe JFM, Houhoula D. Probiotic properties and antioxidant activity in vitro of lactic acid bacteria. *Microorganisms*. 2023 11(5):1264. doi: 10.3390/microorganisms11051264.
91. Bikric S, Aslim B, Dincer İ, Yuksekdog Z, Ulusoy S, Yavuz S. Characterization of exopolysaccharides (EPSs) obtained from *Ligilactobacillus salivarius* strains and investigation at the prebiotic potential as an alternative to plant prebiotics at poultry. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2022;14(1):49-59. doi: 10.1007/s12602-021-09790-8.
92. Ahire JJ, Sahoo S, Kashikar MS, Heerekar A, Lakshmi SG, Madempudi RS. In vitro assessment of *Lactobacillus crispatus* UBLCP01, *Lactobacillus gasseri* UBLG36, and *Lactobacillus johnsonii* UBLJ01 as a potential vaginal probiotic candidate. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2023;15(2):275-286. doi: 10.1007/s12602-021-09838-9.
93. Fuso A, Bancalari E, Castellone V, Caligiani A, Gatti M, Bottari B. Feeding lactic acid bacteria with different sugars: effect on exopolysaccharides (EPS) Production and their molecular characteristics. *Foods*. 2023;12(1):215. doi: 10.3390/foods12010215.
94. Tsega KT, Maina KJ, Tesema NB. Characterization of potential probiotics *Lactobacillus* species isolated from the gastrointestinal tract of Rhode Island Red (RIR) chicken in Ethiopia. *Heliyon*. 2023;9(7):e17453. doi: 10.1016/j.heliyon. 2023.e17453.
95. Mahmoud SYM, Atallah AA, Badr OA, Moustafa MMA, Esmael A, Ebrahim N, Aljeldah M, Al Shammari B, Alsafari IA, Mohamed SA. Bioprospecting for novel probiotic strains from human milk and infants: Molecular, Biochemical, and Ultrastructural Evidence. *Biology (Basel)*. 2022;11(10):1405. doi: 10.3390/biology111014.
96. Wang G, Zhai Z, Ren F, Li Z, Zhang B, Hao Y. Combined transcriptomic and proteomic analysis of the response to bile stress in a centenarian-originated probiotic *Lactobacillus salivarius* Ren. *Food Res Int*. 2020;137:109331. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109331.



97. Pan Q, Shen X, Yu L, Tian F, Zhao J, Zhang H, Chen W, Zhai Q. Comparative genomic analysis determines the functional genes related to bile salt resistance in *Lactobacillus salivarius*. *Microorganisms*. 2021;9(10):2038. doi: 10.3390/microorganisms9102038.
98. Arakawa K, Matsunaga K, Takihiro S, Moritoki A, Ryuto S, Kawai Y, Masuda T, Miyamoto T. *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. *J Dairy Sci*. 2015;98(3):1593-603. doi: 10.3168/jds.2014-8860.
99. Behare PV, Mazhar S, Pennone V, McAuliffe O. Evaluation of lactic acid bacteria strains isolated from fructose-rich environments for their mannitol-production and milk-gelation abilities. *J Dairy Sci*. 2020;103(12):11138-11151. doi: 10.3168/jds.2020-19120
100. Tieu S, Harte F. Effect of mild thermal and pH changes on the sol-gel transition in skim milk. *J Dairy Sci*. 2022;105(10):7926-7939. doi: 10.3168/jds.2021-21299.
101. Satpute SK, Kulkarni GR, Banpurkar AG, Banat IM, Mone NS, Patil RH, Cameotra SS. Biosurfactant/s from *Lactobacilli* species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *J Basic Microbiol*. 2016;56(11):1140-1158. doi: 10.1002/jobm.201600143.
102. Damodaran S., Parkin K. L., eds. (2017). *Fennema's Food Chemistry*. 5th ed. CRC Press, Taylor & Francis. ISBN: 978-84-200-1192-9.



8. ANEXOS

Anexo 1. Información sobre el estudio y criterios de inclusión para mujeres lactantes interesadas en participar

¿Te gustaría participar en un Trabajo Fin de Máster (TFM) sobre leche materna?

Se está realizando un estudio para aislar e identificar microorganismos con un efecto probiótico potencial de muestras de la leche materna para su uso como probióticos en la población infantil.

Te invitamos a participar si cumples los siguientes requisitos:

- Ser mayor de edad.
- No tener ninguna patología crónica o aguda conocida.
- No haber tomado antibióticos en los últimos 3 meses.
- No haber tomado probióticos en los últimos 3 meses.
- No haber participado en otro estudio de investigación en los últimos 3 meses.
- No haber recibido transfusiones de sangre o hemoderivados en los últimos 3 meses.
- Estar alimentando al bebé con lactancia materna exclusiva o mixta.
- El lactante es menor de 12 meses.

Esta contribución al TFM es un gesto altruista y voluntario, que no conlleva ninguna compensación económica para las participantes.

Contacto: Daniel Escobar Sáez
(daniesco@ucm.es)
Asunto: TFM



Anexo 2. Dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación de Aragón (CEICA)

| | |
|---|---|
| | <p>Informe Dictamen Favorable Trabajos académicos C.I. PI22/447 31 de mayo de 2023</p> |
| <p>Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)</p> | |
| <p>CERTIFICA</p> | |
| <p>1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 31/05/2023, Acta Nº 11/2023 ha evaluado la modificación del Trabajo:</p> | |
| <p>Título: Reconstitución de la microbiota de la leche materna pasteurizada con un inóculo de cepas bacterias seleccionadas de leche materna cruda</p> | |
| <p>Alumno: Daniel Escobar Sáez Tutoras: Belén Orgaz Martín y María Marín Martínez</p> | |
| <p>Versión protocolo: versión 2. 26/10/2022 Versión documento de información y consentimiento: versión 2. 26/10/2022</p> | |
| <p>2º. Dicha modificación propone un cambio en las tutoras: MARIA MARÍN MARTÍNEZ sustituye a NATALIA GÓMEZ TORRES</p> | |
| <p>3º. Considera que</p> <ul style="list-style-type: none">- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.- El Tutor/Director garantiza la confidencialidad de la información, la obtención de los consentimientos y el adecuado tratamiento de los datos, en cumplimiento de la legislación vigente y la correcta utilización de los recursos materiales necesarios para su realización. | |
| <p>4º. Por lo que este CEIC emite DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.</p> | |
| <p>Lo que firmo en Zaragoza GONZALEZ HINJOS MARIA - DNI 03857456B DNI 03857456B Firmado digitalmente por GONZÁLEZ HINJOS MARIA - DNI 03857456B Fecha: 2023.06.06 15:34:35 +02'00' María González Hinjos Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)</p> | |

Anexo 3. Diagrama de las fases del procesamiento de las muestras de leche materna

