



Optimización de un medio de cultivo para *Escherichia coli* a base de miel de abeja

Optimization of a honey-based culture medium for *Escherichia coli*

Héctor Alexander Vilchez Cáceda^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-7094-0821>

Antonella Rosario Olortegui Quispe¹ <https://orcid.org/0000-0001-7900-0756>

Willian Esteban Chu Estrada¹ <https://orcid.org/0000-0002-8658-1904>

Christhian Alexander Alvia Saldarriaga² <https://orcid.org/0000-0002-5611-9655>

¹Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima, Perú.

²Universidad María Auxiliadora. Lima, Perú.

*Autor para la correspondencia. Correo electrónico: hvilchezc@uigv.edu.pe

RESUMEN

Introducción: La optimización de medios de cultivo, en la mayoría de los casos, ha sido realizada mediante procedimientos empíricos. Se utiliza el diseño factorial y la metodología de superficie de respuesta para que un medio sea más productivo.

Objetivos: Optimizar la productividad de un medio de cultivo sólido a base de miel de *Apis mellifera* para *Escherichia coli*.

Métodos: Enfoque cuantitativo, *in vitro*, comparativo; se realizó un ensayo fitoquímico preliminar de la miel. Se aplicó un diseño factorial (2^2) en el cual se evaluó la influencia del tiempo de incubación y la cantidad de miel en medios de cultivo. Se emplearon 40 placas de agar base con miel, distribuidas en 4 grupos (n= 10): grupo I (agar base con miel al 10 % e incubación por 12 horas), grupo II (agar base con miel al 10 % e incubación por 24 horas), grupo III (agar base con miel al 20 % e incubación por 12 horas) y grupo IV (agar base con miel al 20 % e incubación por 24 horas). Se utilizó la técnica ecométrica, para determinar la productividad.

<http://scielo.sld.cu>

<http://www.revmedmilitar.sld.cu>



Resultados: En el ensayo fitoquímico se detectaron carbohidratos, alcaloides, triterpenoides y glucósidos cardiotónicos. Se comprobó la mediana productividad de los grupos II y III. Los efectos principales y de la interacción fueron significativos y el índice de predicción del modelo fue adecuado.

Conclusiones: El medio de cultivo sólido optimizado a base de miel de abeja al 20 % e incubación por 24 horas para *Escherichia coli* presenta una alta productividad.

Palabras clave: miel; *Apis mellifera*; *Escherichia coli*; abejas.

ABSTRACT

Introduction: Optimization of culture media in most cases has been done by empirical procedures. Factorial design and response surface methodology are used to make a medium more productive.

Objectives: To optimize the productivity of a solid culture medium based on *Apis mellifera* honey for *Escherichia coli*.

Methods: Quantitative, in vitro and comparative approach, a preliminary phytochemical assay of honey was performed. A factorial design (2^2) was applied where the influence of incubation time and the amount of honey in culture media was evaluated. Forty agar base plates with honey were used, distributed in 4 groups (n = 10): group I (agar base with 10% honey and incubation for 12 hours), group II (agar base with 10% honey and incubation for 24 hours), group III (agar base with 20% honey and incubation for 12 hours) and group IV (agar base with 20% honey and incubation for 24 hours). The ecometric technique was used to determine productivity.

Results: In the phytochemical assay, carbohydrates, alkaloids, triterpenoids and cardiotonic glycosides were detected. The medium productivity of groups II and III was verified. The main and interaction effects were significant and the prediction index of the model was adequate.

Conclusions: The optimized solid culture medium based on 20% bee honey and incubation for 24 hours for *Escherichia coli* shows high productivity.

Key words: honey; *Apis mellifera*; *Escherichia coli*; bees.



Recibido: 10/02/2023

Aprobado: 12/06/2023

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una bacteria gramnegativa que forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*;⁽¹⁾ fue aislada y descrita por primera vez por el médico bávaro Theodor Escherich en 1885;⁽²⁾ habita en el intestino de los vertebrados; se le relaciona como un patógeno oportunista causante de infecciones urinarias, gastrointestinales, pulmonares, sanguíneas, etc.^(2,3,4) Exhibe flagelos en peritrico, no produce esporas, es anaerobia facultativa, con forma de bastón, mesófila y crece a un pH $7,2 \pm 0,2$.^(1,5) Se desarrolla rápido en un medio simple que contenga compuestos de carbono, los cuales podría fermentar en una mezcla de ácidos (lactato, acetato y formiato) y dióxido de carbono; y sales que suministren nitrógeno, fósforo y metales traza.^(1,5,6) Sin embargo, muestra un mejor crecimiento cuando se le proporciona aminoácidos, precursores de nucleótidos, vitaminas y otros metabolitos.^(1,5,6)

La miel de *Apis mellifera* (miel de abeja) es un producto ancestral endulzante que puede ser almacenado y usado tal cual es producido en la naturaleza, no requiere procesamiento o purificación;⁽⁷⁾ en su composición se aprecian azúcares reductores,⁽⁸⁾ los cuales constituyen el 80,0 % de su peso seco y varían según la clase de miel: fructosa 28,0 a 44,0 %; glucosa 22,0 a 38,0 %; sacarosa 0,2 a 5,0 %; maltosa 2,0 a 16,0 %; otros azúcares 0,1 a 8,0 %;⁽⁸⁾ proteínas y aminoácidos 0,2 a 2,0 %, vitaminas, minerales y otras sustancias como esteroides, flavonoides, leucoantocianidinas y compuestos fenólicos.^(8,9) Del mismo modo, se le atribuyen diversas propiedades como antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana; y otras de tipo bioquímicas y farmacológicas.^(9,10)

Para el mantenimiento de bacterias in vitro, se requiere de medios de cultivos que suministren diferentes nutrientes necesarios para su multiplicación,^(1,11) además de condiciones físicas que deben controlarse, como temperatura, disponibilidad de oxígeno, pH, condiciones osmóticas, entre otros.^(5,12)

La calidad y capacidad de recuperar microorganismos de un medio de cultivo se puede realizar mediante el uso del método ecométrico descrita por *Mossel* y otros,⁽¹³⁾ el cual evalúa la productividad de un medio para favorecer el desarrollo de un microorganismo.⁽¹³⁾

<http://scielo.sld.cu>

<http://www.revmedmilitar.sld.cu>



El uso de la miel de *Apis mellifera* (miel de abeja) en agar base ha evidenciado ser una alternativa para demostrar la capacidad fermentadora de *Escherichia coli*.⁽⁹⁾ Asimismo, existen diversas metodologías que hacen posible la optimización de medios de cultivo,⁽¹⁴⁾ algunas mediante procedimientos empíricos de ensayo y error, y otras como el diseño factorial que puede analizar los efectos de cada componente, así como, las interacciones entre ellos.^(15,16) De igual forma, la metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas útiles para desarrollar, mejorar y optimizar los procesos, también para el diseño, desarrollo y formulación de nuevos productos, así como en la mejora de los diseños de productos existentes.^(16,17)

El objetivo de la investigación es optimizar la productividad de un medio de cultivo sólido a base de miel de *Apis mellifera* para *Escherichia coli*.

MÉTODOS

Se realizó un estudio cuantitativo, *in vitro* y comparativo, en el laboratorio de investigación y desarrollo farmacéutico de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, durante el período comprendido desde marzo hasta octubre del 2022.

La recolección de la miel de *Apis mellifera* fue artesanal y aleatorizada en 12 colmenas de la comunidad campesina de Pargay, en Perú, luego la muestra fue sometida a un proceso de filtración mediante empleo de tamiz de acero quirúrgico, para eliminar restos de insectos, trozos de panal, etc.^(8,9)

La detección de metabolitos secundarios se realizó a través de pruebas químicas de caracterización, como: Molish (hidrato de carbono), ninhidrina (aminoácidos libres), Dragendorff (alcaloides), Shinoda (flavonoides), tricloruro férrico (compuestos fenólicos), gelatina - sal (taninos), Rosenheim (antocianinas), Lieberman - Burchard (esteroides y triterpenoides), Bornträger (antraquinonas), Legal y Baljet (lactonas sesquiterpénicas), KOH 0,5 M y UV (cumarinas) y el test de espuma (saponinas).⁽¹⁸⁾

La cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) procede del cepario del laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, su reactivación se realizó según los lineamientos del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI);⁽¹⁹⁾ se empleó el agar Mueller – Hinton (Britania®); se utilizó la técnica de siembra por



agotamiento por estrías para obtener colonias bien separadas, luego el cultivo se colocó en una incubadora (Mettler®) en posición invertida y se incubó a 37 °C por 24 horas.^(18,20) Para la preparación del inóculo, se emplearon 5 colonias separadas de la resiembra en agar Mueller - Hinton, sembradas con un hisopo estéril y suspendidas en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón (Britania®) a 37 °C por 5 horas hasta alcanzar una turbidez adecuada.^(18,20) La normalización del inóculo se realizó por turbidimetría en espectrofotómetro Thermo Scientific® Genesys 10S a 620 nm comparándola con la densidad estándar del tubo 0,5 de la escala Mc Farland, se obtuvo como resultado una suspensión semejante a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.^(18,20)

El experimento *in vitro* se realizó en el laboratorio de investigación y desarrollo farmacéutico, se cumplieron de manera estricta las normas de bioseguridad.⁽²⁰⁾ La preparación del agar base con miel de abeja se realizó según la metodología de Vilchez y otros,⁽⁹⁾ posterior a la esterilización, se dispensaron 20 mL de los medios de cultivo en placas de Petri 15 X 100 mm, se dejaron solidificar a temperatura ambiente y luego se almacenaron a $4,0 \pm 2,0$ °C hasta posterior uso.⁽⁹⁾ Se prepararon en total 40 placas de Petri (20 placas con miel al 10 % y 20 placas con miel al 20 %), las cuales se repartieron en 4 grupos de n= 10 placas. Distribución de los medios de cultivo y tiempo de incubación en los grupos:

Grupo I: agar base con miel de abeja al 10 % e incubación por 12 horas.

Grupo II: agar base con miel de abeja al 10 % e incubación por 24 horas.

Grupo III: agar base con miel de abeja al 20 % e incubación por 12 horas.

Grupo IV: agar base con miel de abeja al 20 % e incubación por 24 horas.

Para la inoculación en los diferentes grupos se utilizó la técnica de siembra en estría, denominada método ecométrico descrita por Mossel y otros.^(13,21) Cada medio de cultivo se dividió en 4 cuadrantes en la base y en cada cuadrante se trazaron 5 líneas paralelas y 1 línea en el centro, a continuación, mediante uso de asa calibrada desechable se cargaron 10 uL de la suspensión normalizada de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y se realizó la inoculación de la cepa por cada línea trazada.^(13,21) Este proceso se repitió en todos los medios de cultivo. Luego, los medios de cultivo se colocaron de manera invertida en una incubadora (Mettler®) a 37 °C.⁽²⁰⁾



Posterior al tiempo de incubación se observó el crecimiento en cada uno de los medios estudiados; se consideró válida cualquier estría que tuviera más del 25 % de crecimiento de la línea.⁽²²⁾

Las variables con las cuales se desarrolló el estudio, se definen en variables de entrada y salida. Dentro de las variables de entrada se consideraron X_1 : tiempo de incubación (12 y 24 horas) y X_2 : miel de *Apis mellifera* (10 y 20 gramos). La variable de salida fue productividad del medio de cultivo.

Para la evaluación de la productividad de los medios de cultivo se calculó el índice de crecimiento absoluto (ICA);^(13,21) este se obtuvo de la sumatoria de cada una de las 20 líneas de los 4 cuadrantes (cada línea posee un valor de 0,2), más la línea central con un valor de 1, es decir, que el crecimiento máximo que se puede tener es de 5.^(13,21) Los medios se clasificaron de acuerdo a su capacidad de recuperación del microorganismo en:

ICA= 4,5 - 5, medios altamente productivos.

ICA= 2,5 - 4,4, medios medianamente productivos.

ICA < 2,5, medios poco productivos.

ICA= 0, medios no productivos.^(13,21,22)

Los ICA fueron formulados como promedio aritmético \pm desviación estándar (SE), con un nivel de confianza del 95 % y un error relativo del 5 %; se utilizó un diseño factorial (2^2) completamente al azar; se aplicó análisis de varianza (ANOVA) y superficie de respuesta (MSR). Se consideró como nivel de significación ($p < 0,05$). El procesamiento se realizó a través del software estadístico STATISTICA v.10 para Windows versión 25.

El trabajo fue aprobado por el Comité de Ética para la investigación de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, con la resolución 308-2022-DFCFB.



RESULTADOS

En el tamizaje fitoquímico preliminar se detectaron la presencia de metabolitos como carbohidratos, compuestos fenólicos, alcaloides, triterpenoides y glucósidos cardiotónicos (tabla 1).

Tabla 1 - Tamizaje fitoquímico de la miel de *Apis mellifera*

Metabolito secundario	Reactivo	Resultado
Carbohidratos	Molish	+++
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	++
Taninos	Gelatina	+
Flavonoides	Shinoda	+
Antocianinas	Rosenheim	-
Aminoácidos libres	Ninhidrina	-
Alcaloides	Dragendorff	+++
Quinonas	Bornträger	-
Triterpenoides	Liebermann	+++
Saponinas	Espuma	-
Glucósidos cardiotónicos	Baljet	+++
Lactonas	Legal	-
Cumarinas	NaOH 10 %	-

+++ Abundante, ++ Moderado, + Escaso, - No presenta.

La información de la tabla 2, muestra la matriz de experimentos, plan de experimentación y la productividad. El análisis de datos se realiza en el software STATISTICA, para definir la variabilidad obtenida entre rangos máximos y mínimos, se establece el experimento y se definen las réplicas. Modelo a predecir: $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_{12}X_1X_2$. De igual forma, al calcular los ICA, el grupo II ($3,22 \pm 0,075$) y grupo III ($4,00 \pm 0,059$) lograron una mediana productividad. Mientras que el grupo IV ($4,22 \pm 0,075$) obtuvo una alta productividad y el grupo I ($2,40 \pm 0,078$) fue poco productivo.



Tabla 2 - Matriz de experimentos, plan de experimentación y productividad

N°	Matriz de experimentos		Plan de experimentación		Productividad				
	X ₁	X ₂	Tiempo (h)	Miel de abeja (g)	Réplicas				
1	-	-	12	10	2,4	2,4	2,8	2,2	2,4
					2,8	2,2	2,4	2,4	2,0
2	+	-	24	10	3,2	3,2	3,4	3,2	3,0
					3,6	2,8	3,4	3,4	3,0
3	-	+	12	20	4,0	3,8	3,8	4,0	4,0
					4,0	4,0	3,8	4,2	4,4
4	+	+	24	20	4,0	4,0	4,0	4,0	4,2
					4,6	4,6	4,2	4,2	4,4

Se aprecia en el software estadístico STATISTICA v.10 que los efectos principales β_1X_1 ; β_2X_2 y el efecto de la interacción $\beta_{1,2}X_1X_2$ son significativos (Fig. 1), a un intervalo de confianza del 95 % y un error relativo del 5 %.

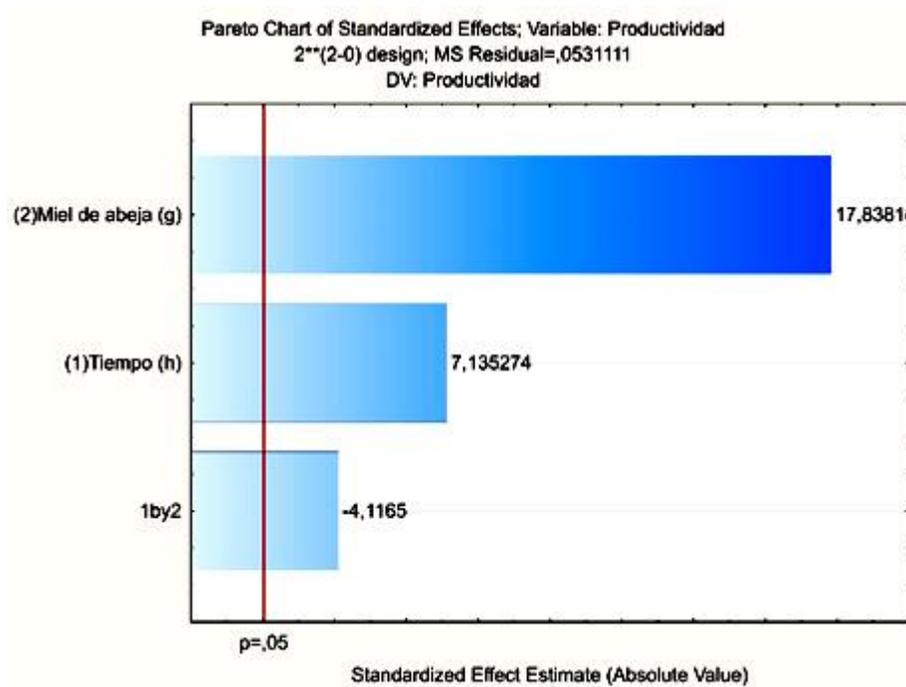


Fig. 1 - Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.



En la tabla 3, análisis de varianza (ANOVA) de los factores estudiados, se aprecia que los factores si explican el modelo estadístico del experimento con un $R^2 = 91,47 \%$. Los coeficientes de regresión del modelo: $Y = - 0,620 + 0,118X_1 + 0,220X_2 - 0,005X_1X_2$

Tabla 3 - Análisis de varianza (ANOVA)

Factor	ANOVA; Var.: Productividad; R-sqr = 0,9147; Adj: 0,9076 (diseño: 2** (2 - 0)); MS Residual = 0,0531111. DV: Productividad				
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
(X ₁) Tiempo (h)	2,70400	1	2,70400	50,9121	0,000000
(X ₂) Miel de Abeja (g)	16,90000	1	16,90000	318,2008	0,000000
Interacción (X ₁)(X ₂)	0,90000	1	0,90000	16,9456	0,000214
Error	1,91200	36	0,05311		
Total	22,41600	39			

Se aprecia en el software estadístico STATISTICA v.10 que la superficie de respuesta en 3D (Fig. 2) ilustra la interacción entre el tiempo de incubación (X₁) y la cantidad de miel de abeja (X₂); a mayor incremento de X₁ y X₂, mejor es la productividad del medio. El factor preponderante es la cantidad de miel de abeja. En la figura 2 se delimitan las diferentes áreas colorimétricas; los colores rojos muestran mayores índices de productividad, hasta llegar al amarillo con índices más bajos.

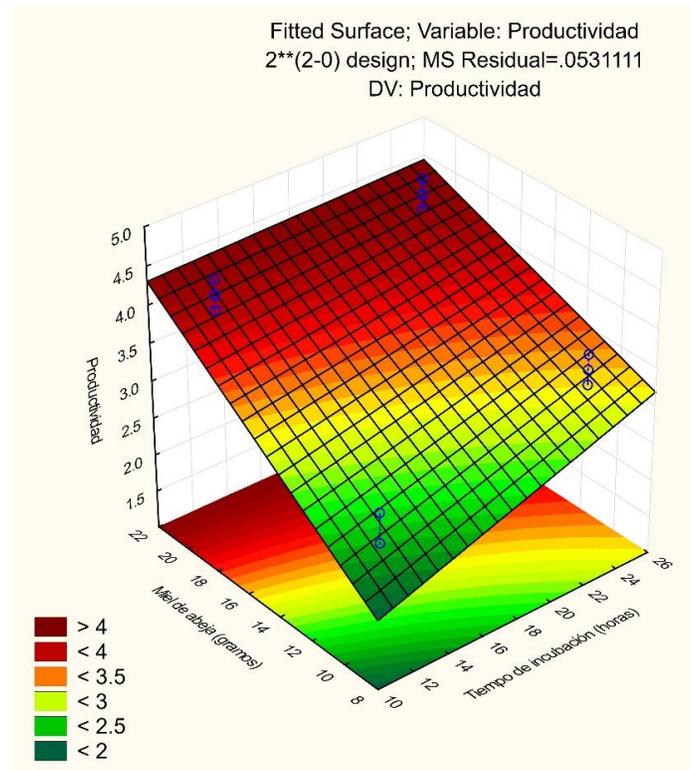


Fig. 2 - Superficie de respuesta en 3D.

DISCUSIÓN

En los últimos años la aplicación de técnicas moleculares y la metagenómica han hecho posible estudiar no solo a bacterias aisladas sino también en comunidad.^(23,24) Sin embargo, tales avances no han afectado el empleo de medios de cultivo, los cuales siguen siendo una herramienta fundamental para el aislamiento de bacterias comensales, pero también patógenas.⁽²⁵⁾

Escherichia coli presenta una tasa de crecimiento alta en medios que contengan hidratos de carbono.^(12,26) Al realizar el ensayo fitoquímico preliminar se detectaron de manera cualitativa abundantes carbohidratos, estos resultados son consistentes con lo declarado por *Vilchez* y otros⁽⁹⁾ y con lo sustentado por *Machado* y otros,⁽²⁷⁾ quienes indican que la miel se compone ante todo de carbohidratos.



Los resultados demuestran que el método ecométrico es adecuado para evaluar la productividad de los medios de cultivo en estudio, como lo confirman estudios realizados por *Weenk*,⁽²⁸⁾ y *Villalobos* y otros,⁽¹³⁾ quienes destacan las ventajas del método como la facilidad y rapidez de ejecución.

A fin de optimizar la productividad de un medio de cultivo a base de miel de abeja, se trabajó sobre el agar base con miel de *Apis mellifera* al 10 % desarrollado por *Vilchez* y otros,⁽⁹⁾ quienes evaluaron el uso del medio como diferenciador de oxidación-fermentación de carbohidratos, sin valorar la productividad. En el estudio se obtuvo un buen índice de predicción del modelo estadístico ($R^2 = 91,47\%$), lo que indica que se ajusta bien a los datos, por lo cual no se elimina ningún factor. En este aspecto, *Ahmad* y otros⁽¹⁶⁾ y *Macagnan* y otros,⁽²⁹⁾ consideran que un diseño es adecuado cuando un R^2 alcanza un valor \geq de 90 %. Los datos extraídos de la figura 2 indican, que el agar base con miel de abeja al 20 % e incubación por 24 horas, obtuvo una alta productividad. Sin embargo, se aprecia que el ICA no llegó a 5 tal vez por la sinergia de los metabolitos primarios y secundarios detectados, los cuales probablemente interfirieron en la productividad del medio.^(10,30) Este resultado no es consistente con lo declarado por *Vilchez* y otros,⁽⁹⁾ quienes reportan que los bioelementos primarios, secundarios y oligoelementos de la miel permiten la multiplicación de la cepa en estudio. En este sentido, *Tesfaye* y otros,⁽³¹⁾ informaron que la miel de *Apis mellifera* a más altas concentraciones puede inhibir el crecimiento bacteriano.

El grupo IV permitió el desarrollo adecuado de *E. coli* lo que indica que el aporte nutricional del medio es apropiado y podría ser una alternativa interesante para reproducir la bacteria pura. Por otro lado, en posteriores estudios se podría evaluar la productividad del grupo IV en otras bacterias gramnegativas, y adicionar inhibidores para que este medio sea selectivo para enterobacterias.

Se concluye que el medio de cultivo sólido optimizado a base de miel de *Apis mellifera* al 20 % e incubación por 24 horas para *Escherichia coli* ATCC 25922 presenta una alta productividad.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 6ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006.
2. Martinson JNV, Walk ST. *Escherichia coli* Residency in the Gut of Healthy Human Adults. EcoSal Plus. 2020 [acceso: 20/01/2023]; 9(1):[aprox. 27 p.]. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2020
3. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2021 [acceso: 20/01/2023]; 19:37-54. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-0416-x#citeas>
4. Sarowska J, Futoma B, Jama A, Frej M, Ksiazczyk M, Bugla G, et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. Gut Pathog. 2019 [acceso: 20/01/2023]; 11(10):1-16. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13099-019-0290-0#citeas>
5. Riedel S, Morse SA, Mietzner TA, Miller S. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 28ed. México D.F.: Editorial McGrawHill; 2020.
6. Elbing KL, Brent R. Recipes and Tools for Culture of *Escherichia coli*. Curr Protoc Mol Biol. 2019 [acceso: 20/01/2023]; 125(1):e83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6819147/>
7. Bicudo L, Monika O, Dietemann V, Eyer M, Freitas A, Martel A, et al. Standard methods for *Apis mellifera* honey research. Journal of Apicultural Research. 2020 [acceso: 20/01/2023]; 59(3):1-62. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2020.1738135>
8. Mokaya H, Bargul J, Irungu J, Lattorff H. Bioactive constituents, in vitro radical scavenging and antibacterial activities of selected *Apis mellifera* honey from Kenya. International journal of food science & technology. 2020 [acceso: 20/01/2023]; 55(3):1246-54. Disponible en: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijfs.14403>
9. Vílchez H, Cervantes L, Inocente M. Uso de la miel de *Apis mellifera* en agar base para diferenciar cepas bacterianas con característica oxidativa-fermentadora. Ars Pharm. 2019 [acceso: 20/01/2023]; 60(2):119-24. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2340-98942019000200119



10. Cilia G, Fratini F, Marchi M, Sagona M, Turchi B, Adamchuk L, et al. Antibacterial activity of honey samples from Ukraine. *Veterinary Sciences*. 2020 [acceso: 20/01/2023]; 7(4):1-14. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2306-7381/7/4/181>
11. Berenbaum M, Calla B. Honey as a functional food for *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*. 2021 [acceso: 20/01/2023]; 66:185-208. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-ento-040320-074933>
12. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2003.
13. Villalobos A, Calderón L, Figueroa C, Fierro C, Otárola G, Álvarez R, et al. Evaluación por método ecométrico de agar obtenido de algas rojas colombianas. *Universitas Scientiarum*. 2007 [acceso: 20/01/2023]; 12:57-65. Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4900>
14. Desai K, Survase S, Saudagar P, Lele S, Singhal R. Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan. *Biochemical Engineering Journal*. 2008 [acceso: 20/01/2023]; 41(3):266-73. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X08001733>
15. Ahmad M, Azoddien A, bin Mohd Zahari M, bin Abu Seman M. Application Of Factorial Design To The Stress Phenomenon Of *Bacillus cereus* (ATCC 14579) Growth. *Australian J. Basic and Appl. Sci*. 2016 [acceso: 20/01/2023]; 10(17):148-56. Disponible <http://www.ajbasweb.com/old/ajbas/2016/Special%20ICCEIB/148-156.pdf>
16. Ahmad M, Ahmad M, Hamid R, Abdin M, Javed S. Use of response surface methodology to study the effect of media composition on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin research*. 2013 [acceso: 20/01/2023]; 29(1):39-45. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12550-012-0151-x>
17. Abalos A, Maximo F, Manresa M, Bastida J. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT 10. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental*



& Clean Technology. 2022 [acceso: 20/01/2023]; 77 (7):777-84. Disponible en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.637>

18. Vílchez-Cáceda H, Cervantes-Ganoza L. Evaluación del efecto antibacteriano sinérgico de rifamicina en propóleo sobre bacterias grampositivas. Rev Cub Med Mil. 2021 [acceso: 20/01/2023]; 50(3):e02101336. Disponible en: <http://www.revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/1336>

19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. M02, 13th ed. USA: CLSI; 2018 [acceso: 20/01/2023]. Disponible en:

https://clsi.org/media/1925/m02ed13_sample.pdf

20. Vílchez-Cáceda H, Olortegui-Quispe A, Alvia-Saldarriaga C. Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Solanum sessiliflorum* Dunal (cocona) sobre *Streptococcus mutans*. Rev Cub Med Mil. 2023 [acceso: 20/01/2023]; 52(1):86-100. Disponible en:

<https://revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/2340>

21. López M, Pioli V, Breglia N, Teves S, Degrossi J. Comparación de medios de cultivo selectivos para el aislamiento de especies del Taxón K perteneciente al complejo *Burkholderia cepacia*. Ars Pharm. 2019 [acceso: 20/01/2023]; 60(2):93-100. Disponible en:

https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2340-98942019000200093

22. Alrahim M, Enaam H, Sanousi E, Mohammed G. Evaluation of six culture media for supporting the isolation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Sudan Journal of Science and Technology. 2021 [acceso: 20/01/2023]; 22(1):1-9. Disponible en:

[https://repository.sustech.edu/bitstream/handle/123456789/26825/1-](https://repository.sustech.edu/bitstream/handle/123456789/26825/1-Evaluation%20of%20six.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

[Evaluation%20of%20six.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.sustech.edu/bitstream/handle/123456789/26825/1-Evaluation%20of%20six.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

23. Abbasian F, Ghafar E, Magierowski S. Microbiological sensing technologies: a review.

Bioengineering. 2018 [acceso: 20/01/2023]; 5(1):1-33. Disponible: <https://www.mdpi.com/2306-5354/5/1/20>

24. Greninger A. The challenge of diagnostic metagenomics. Expert review of molecular diagnostics. 2018 [acceso: 20/01/2023]; 18(7):605-15. Disponible en:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14737159.2018.1487292>

<http://scielo.sld.cu>

<http://www.revmedmilitar.sld.cu>



25. Bonnet M, Lagier J, Raoult D, Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*. 2020 [acceso: 20/01/2023]; 34:1-29. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2052297519301192>
26. Ammar E, Wang X, Rao C. Regulation of metabolism in *Escherichia coli* during growth on mixtures of the non-glucose sugars: arabinose, lactose, and xylose. *Sci Rep*. 2018 [acceso: 20/01/2023]; 8(1):1-11. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-18704-0#citeas>
27. Machado A, Bicudo L, Sancho M, Pascual A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*. 2018 [acceso: 20/01/2023]; 57(1):1-33. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/00218839.2017.1338444?scroll=top&needAccess=true&role=tab>
28. Weenk G. Microbiological assessment of culture media: comparison and statistical evaluation of methods. *International Journal of Food Microbiology*. 1992 [acceso: 20/01/2023]; 17(2):159-81. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016816059290113H>
29. Macagnan KL, Alvez MI, Rodrigues AA, Furlan L, Da Silva R, Diaz P, et al. Complete factorial design to adjust pH and sugar concentration in the inoculum phase of *Ralstonia solanacearum* to optimize P (3HB) production. *Plos One*. 2017 [acceso: 20/01/2023]; 12(7):1-13. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0180563>
30. Brown E, O'Brien M, Georges K, Suepaul S. Physical characteristics and antimicrobial properties of *Apis mellifera*, *Frieseomelitta nigra* and *Melipona favosa* bee honeys from apiaries in Trinidad and Tobago. *BMC Complement Med Ther*. 2020 [acceso: 20/01/2023]; 20(85):1-9. Disponible en: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-020-2829-5#citeas>
31. Tesfaye O, Muleta D, Asnake D. In vitro antimicrobial properties of *Apis mellifera* L. and *Meliponula beccarii* L. honeys from Kellem and West Wollega Zones, Western Ethiopia. *International Journal of Food Properties*. 2021 [acceso: 20/01/2023]; 25(1):1-11. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2021.2019761>



Conflictos de interés

Los autores declaran no presentar conflictos de interés.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: *Héctor Alexander Vilchez Cáceda.*

Curación de datos: *Christhian Alexander Alvia Saldarriaga, Antonella Rosario Olortegui Quispe, Willian Esteban Chu Estrada, Héctor Alexander Vilchez Cáceda.*

Análisis formal: *Héctor Alexander Vilchez Cáceda.*

Investigación: *Christhian Alexander Alvia Saldarriaga.*

Metodología: *Héctor Alexander Vilchez Cáceda.*

Administración del proyecto: *Willian Esteban Chu Estrada.*

Recursos materiales: *Willian Esteban Chu Estrada.*

Supervisión: *Héctor Alexander Vilchez Cáceda.*

Validación: *Héctor Alexander Vilchez Cáceda.*

Visualización: *Antonella Rosario Olortegui Quispe.*

Redacción – borrador original: *Christhian Alexander Alvia Saldarriaga, Willian Esteban Chu Estrada, Antonella Rosario Olortegui Quispe.*

Redacción – revisión y edición: *Christhian Alexander Alvia Saldarriaga, Antonella Rosario Olortegui Quispe, Héctor Alexander Vilchez Cáceda.*