



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Efectos de vibraciones ultrasónicas en incubación de bacterias

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

Autor: Murquincho Paccha, Viviana Esther

Director: Sánchez Juárez, Aramis Azuri

LOJA

2023



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2023

Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular

Loja, 05 de enero de 2023

Magister

Claudia Teresa Cruz Erazo

Director de la carrera de Bioquímica y Farmacia

Ciudad. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: Efectos de vibraciones ultrasónicas en incubación de bacterias realizado por Viviana Esther Murquincho Paccha ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director del Trabajo de Integración Curricular

Dr. Aramis Azuri Sánchez Juárez

Pasaporte: G30086537

Correo electrónico: aasanchez11@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Viviana Esther Murquincho Paccha, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Integración Curricular denominado: Efectos de vibraciones ultrasónicas en incubación de bacterias, de la carrera de Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Marco teórico, metodología, resultados y discusiones, siendo Aramis Azuri Sánchez Juárez director del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”, en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Viviana Esther Murquincho Paccha

C.I.: 1105904757

Correo electrónico: vemurquincho@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Dedico mi tesis con todo mi cariño a toda mi familia, principalmente a mis padres Lia y Máximo pues sin ellos no habría logrado todo lo que tengo hasta ahora, ya que con gran esfuerzo, paciencia y amor me brindaron una guía para perseguir este sueño. Me formaron para ser la persona que soy hoy, todos mis principios, valores y la perseverancia se los debo a ellos, todo esto inculcado con amor y sin pedir nada a cambio.

A mi hermana Andrea por creer en mí y brindarme todo su apoyo incondicional durante todos estos años, por estar en los momentos difíciles donde mi ánimo decaía y estar siempre para escucharme y consolarme.

A mis amigos por acompañarle en cada paso que di en mi búsqueda de ser mejor persona y profesional, por cuidarme como una hermana más y brindarme varias alegrías a lo largo de mi vida.

Agradecimiento

Agradezco a mis padres por ser quienes me dieron la educación que tengo, por ser el motor que impulsa todos mis sueños y esperanzas. Siempre han sido una guía en mi vida y este logro es gracias a todo su esfuerzo.

De igual manera agradezco y reconozco el esfuerzo de mi tutor de titulación Aramis Sánchez por sus palabras de aliento, por compartirme sus conocimientos; llevaré todo lo aprendido durante mi vida profesional. Gracias por su paciencia, dedicación y tolerancia durante todo este largo camino para el desarrollo y finalización de este trabajo de titulación.

Así mismo, quiero agradecer a mis amigos por su apoyo moral durante las horas difíciles, por compartir juntos todas estas horas de estudio y por brindarme su cariño.

Índice de contenido

Carátula.....	I
Aprobación del director del Trabajo de Titulación.....	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria	IV
Agradecimiento.....	V
Índice de contenido	VI
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Capitulo uno.....	5
Marco Teórico	5
1.1 El ultrasonido	5
1.1.1 Aplicaciones del ultrasonido.....	7
1.2 Equipos de generación.....	10
1.2.1 Baños de ultrasonicos	10
1.2.2 Sistemas tipo sonda.....	10
1.2.3 Equipos diseñados para la aplicación de ultrasonido de potencia.....	11
1.3 Efectos del ultrasonido en organismos biológicos	12
1.4 Cultivo Bacteriano	13
1.4.1 Agares.....	16
1.4.2 Bacterias.....	16
Escherichia coli.....	20
Stapylococcus aureus	21

Capítulo dos	24
Metodología.....	24
2.1 Preparación de agares.....	24
2.2 Equipo de Ultrasonido	25
2.3 Inoculación y adaptación en el equipo	26
2.4 Condiciones de incubación.....	28
Capítulo tres.....	29
Resultados y Discusiones.....	29
3.1 Resultados macroscópicos obtenidos de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	29
3.2 Análisis de resultados con ImageJ.....	34
Conclusiones	42
Recomendaciones	43
Referencias	44

Índice de tablas

Tabla 1 Mecanismo de acción del ultrasonido.....	6
Tabla 2 Nutrientes para el crecimiento bacteriano	14
Tabla 3 Tabla de intensidades de <i>S.aureus</i>	38

Índice de figuras

Figura 1 Equipo de baños de ultrasonido branson 1800	10
Figura 2 Sonda de sonicación de gran superficie	11
Figura 3 Homogeneizador ultrasónico	12
Figura 4 <i>Escherichia coli</i> en agar EMB.....	18
Figura 5 <i>Staphylococcus aureus</i> en agar manitol	19

Figura 6 <i>Escherichia coli</i>	20
Figura 7 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Figura 8 Burbujas microscópicas en el medio líquido.....	26
Figura 9 Cajas petri en el equipo branson MH3800.....	26
Figura 10 Cajas petri con patrón de puntos.....	27
Figura 11 Cajas petri en ultrasonido.....	28
Figura 12 <i>S.aureus</i> día cero.....	29
Figura 13 <i>S. aureus</i> día cero.....	30
Figura 14 <i>S. aureus</i> de 30 minutos.....	30
Figura 15 <i>S. aureus</i> de 60 minutos.....	31
Figura 16 <i>S. aureus</i> de 90 minutos.....	31
Figura 17 <i>E. coli</i> en tres diferentes intervalos de tiempo.....	32
Figura 18 <i>E. coli</i> de referencia.....	32
Figura 19 <i>E. coli</i> de 30 minutos.....	33
Figura 20 <i>E. coli</i> de 60 minutos.....	33
Figura 21 <i>E. coli</i> de 90 minutos.....	34
Figura 22 Zona central de <i>S. aureus</i>	35
Figura 23 Gráfica <i>S.aureus</i> referencia.....	36
Figura 24 Gráfica <i>S.aureus</i> 30 minutos.....	36
Figura 25 Gráfica <i>S.aureus</i> 60 minutos.....	37
Figura 26 Gráfica <i>S.aureus</i> 90 minutos.....	37

Resumen

El ultrasonido son ondas acústicas con una frecuencia mayor a 20 kHz; en la naturaleza es posible percibir como diferentes animales y microorganismos lo usan como mecanismo para solventar sus necesidades y poder sobrevivir, es por ello que este trabajo se ha planteado determinar los efectos que la vibración ultrasónica produce en la incubación de bacterias, empleando dos tipos de especies *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ya que una adecuada frecuencia del ultrasonido (40kHz) produce una cavitación constante lo que conduce un cambio en el estado de vida de las células llevando a una aceleración o desaceleración de su proliferación, sumándole otras condiciones como la temperatura a 37°C y una exposición en diferentes intervalos de tiempo de 30, 60 y 90 minutos. Lo cual llevó a cambios evidentes en las especies bacterianas a nivel macroscópico, realizándose un análisis de las imágenes tomadas a lo largo de tres días, las cuales se procesaron para visualizar la intensidad de la coloración de la especie bacteriana de elección.

Palabras clave: ultrasonido, cavitación, bacteria.

Abstract

Ultrasound is acoustic waves with a frequency greater than 20 kHz; In nature it is possible to perceive how different animals and microorganisms use it as a mechanism to meet their needs and to survive, which is why this work has set out to determine the effects that ultrasonic vibration produces in the incubation of bacteria, using two types of species *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* since an adequate frequency of ultrasound (40kHz) produces a constant cavitation which leads to a change in the state of life of the cells leading to an acceleration of their proliferation, adding other conditions such as temperature 37°C and an exposure in different time intervals of 30, 60 and 90 minutes. Which led to evident changes in the bacterial species at the macroscopic level, carrying out an image analysis where the images taken over three days were processed to visualize the intensity of the coloration of the bacterial species of choice.

Keywords: ultrasound, cavitation, bacteria

Introducción

A lo largo de varios años, el ultrasonido se ha encontrado presente en diversidad de industrias y ciencias. Siendo empleando en equipos biomédicos, métodos terapéuticos o incluso en ciertos procesos para mejorar la calidad de algunos alimentos. Y no solo de esta manera, sino además haciendo notar los efectos que produce en ciertos organismos biológicos como mamíferos entre ellos los murciélagos, que usan este mecanismo para poder solventar sus necesidades (Gallo et al., 2018; Najjarzadeh et al., 2020).

En vista de todo lo anteriormente mencionado en este trabajo de integración curricular se decidió aplicar este fenómeno ultrasónico en otro tipo de microorganismos como son las bacterias, donde se empleó dos tipos de especies *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* para exponerlos en un baño de ultrasonido con una frecuencia de 40 kHz en diferentes intervalos de tiempo de 30, 60 y 90 minutos, en conjunto con otras condiciones que requieren estos microorganismos para poder proliferar como lo es la temperatura (37°C). A lo largo de tres días de estudio y control se pudieron hacer evidentes los cambios que se iban produciendo, siendo los más importantes una aceleración en su crecimiento, cambios de coloración y en algunos casos como el ultrasonido afectó para que no haya ningún tipo de desarrollo en las colonias bacterianas.

Todo este trabajo contiene una breve explicación en varios capítulos que van desde una definición del ultrasonido, sus aplicaciones, equipos de generación, los efectos que produce en organismos biológicos, por otro lado, los cultivos bacterianos empleados Manitol y EMB, las especies bacterianas usadas, la metodología desarrollada y finalmente el análisis de resultados macroscópico y microscópico mediante el programa ImageJ donde se obtuvieron gráficas que muestran la intensidad de color.

Finalmente, es fundamental resaltar la importancia que tiene esta investigación en el ámbito educativo y médico, ya que se plantea como otra alternativa para el desarrollo de microorganismos que, si bien no reemplazaría a la comúnmente usada, podría servir en caso

de querer ralentizar la proliferación de estas especies bacterianas. Además de enseñar otra posible aplicación que posee el ultrasonido y como emplea sus mecanismos como la cavitación para ayudar al desarrollo de estos microorganismos.

Capítulo uno

Marco Teórico

1.1 El ultrasonido

El ultrasonido (US) se define como ondas sonoras con una alta frecuencia que sobrepasa el umbral del oído humano, es decir mayores a 20 kHz. El oído humano posee sensibilidad a frecuencias entre 20 Hz y 20 000 Hz, con una cantidad de nivel entre 0 dB y 140 dB, los sonidos que se emiten en este rango y no pueden ser percibidos por nuestro oído humano se los conoce como ultrasonidos, los cuales pueden generar frecuencias armónicas y subarmónicas dentro del rango de audición (Li et al., 2021; Moyano et al., 2022).

El US se puede dividir de acuerdo a las funciones que cumple en las sustancias de destino; esto dependiendo si posee una alta intensidad y baja frecuencia ($I=10-1000 \text{ W/cm}^2$ y $F= 20-100 \text{ kHz}$) su rango medible será en kHz empleado para generar rompimiento celular, procesamiento o estabilización de alimentos, homogenización de emulsiones, permeabilización de la membrana celular, entre otras; mientras que el ultrasonido de diagnóstico posee una baja intensidad y alta frecuencia ($I < 1 \text{ W/cm}^2$ y $F > 1 \text{ MHz}$) con un rango en MHz, bastante útil en ecografías, aplicaciones terapéuticas, control de calidad, fenómenos de relajación, etc (Carrillo et al., 2021; Delgado, 2011).

Cabe destacar que el ultrasonido como movimiento ondulatorio posee propiedades físicas similares a las ondas sonoras. Sin embargo, gracias a su alta frecuencia y longitudes de onda más cortas, este tipo de ondas ultrasónicas se difractan en menor proporción que las ondas de sonido audibles, siendo absorbidas en el aire más rápidamente; por tanto, no son capaces de transmitirse a distancias muy largas. En cuanto a su velocidad de propagación en el aire a temperatura ambiente es similar a la de los sonidos audibles, con un valor de alrededor 343 m/s, mientras que la velocidad que posee en un medio líquido como el agua es mucho mayor, aproximadamente 1500 m/s. Las ondas ultrasónicas cuando se propagan a través de un medio, transfieren energía mediante el choque entre partículas. Una porción de esa energía se pierde o reordena por medio de diferentes mecanismos como la

absorción, dispersión, pérdida de viscosidad o conducción térmica. Las ondas mecánicas de ultrasonido se propagan de manera similar a las ondas de sonido audible esto ocurre a través del desplazamiento de las moléculas que componen el medio en el que se mueven las ondas. Las ondas de ultrasonido pueden propagarse en la misma dirección que las partículas (ondas longitudinales) o transversal o perpendicularmente. Las ondas longitudinales son las más importantes para las aplicaciones médicas de ultrasonido; los efectos y los mecanismos de su generación se exponen en la Tabla 2. Por tanto, las ondas de mayor frecuencia se absorben mejor que las ondas de menor frecuencia; donde la amplitud y la intensidad de la onda se reducen con la distancia a una tasa de alrededor de 0,5 dB (Moyano et al., 2022).

En cuanto a estos mecanismos de acción concretamente a su conducción, estos se pueden clasificar principalmente en: térmicos donde involucra la generación de energía mecánica o calórica y no térmicos como la cavitación, rarefacción, formación de radicales libres, choques micro-mecánicos y fuerza de radiación, estos se detallan con mejor precisión en la Tabla 1 (Delgado, 2011).

Tabla 1

Mecanismo de Acción del Ultrasonido

Tipo	Mecanismo	Aplicación
Cavitación	Eliminación mecánica por irrupción de la bacteria, mediante burbujas localizadas expuesta a una temperatura de 5500°C y presión de 500 MPa.	Desinfección, lesión celular (lisis) e inactivación enzimática.
Formación de Radicales libres	Sonólisis del agua puede generar iones hidroxilo (OH ⁻), hidrogeno (H ⁺) y peróxido.	Inactivación enzimática.
Choques micro-mecánicos intracelulares	Rotura de las paredes celulares de microorganismos.	Efecto antimicrobiano, lisis e inactivación enzimática.
Producción de energía calórica y mecánica	Transmisión de la onda, se debilita con la distancia si es sometido a material atenuante.	Inactivación microbiana.

Fuerza de radiación	Vibración local en tejidos por radiación acústica	Análisis clínicos
Compresión y Rarefacción	Microcorriente acústica	Inactivación microbiana y enzimática

Nota. En esta tabla se observa los subtipos de mecanismos no térmicos del ultrasonido y sus aplicaciones. Adaptado de Aplicación del Ultrasonido en la Industria Alimentaria de los Alimentos (p. 143), por Delgado, 2011, Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales. Vol 6.

Cuando el ultrasonido de mayor potencia se disemina en un medio líquido en conjunto con el gas disuelto produce cambios en la presión provocando la formación de burbujas, este fenómeno es conocido como cavitación; estas burbujas se caracterizan por la dinámica de sus oscilaciones, temperaturas y el límite de presión cuando se destruyen. Durante las oscilaciones por los núcleos de gas disueltos y el vapor del solvente estos penetran por dentro y fuera de las burbujas, esto a causa de un proceso de difusión rectificada; es por ello que la cantidad de gas que se difunde es mayor durante la fase de expansión que la fase de compresión. Por lo cual, conduce al crecimiento de las burbujas hacia un rango de tamaño de resonancia, llegando hasta una proporción máxima dentro de un ciclo acústico y generando altas temperaturas dentro de las burbujas lo que lleva a su destrucción (Huang et al., 2017).

1.1.1 Aplicaciones del ultrasonido

El ultrasonido es una de las tecnologías más ampliamente estudiadas y en desarrollo, existen varias aplicaciones en ciencias e industrias como la ingeniería, medicina, química, física, biología y alimentos. A lo largo de los años, los avances científicos han permitido mejorar los métodos de tratamiento para enfermedades como Meniere y el Parkinson que mediante el US permite la destrucción del nervio vestibular y ultrasonido enfocado usado para la eliminación localizada del tejido afectado en el cerebro, respectivamente (Miller et al., 2012).

En el aspecto biomédico existen diversos métodos y equipos que poseen como fundamento el ultrasonido, ya sean en la detección de órganos, masas tumorales, defectos prenatales y posnatales, entre otras. Entre los usos más comunes se encuentra el diagnóstico por imagen y el tratamiento terapéutico, pudiendo el US crear efectos no solo mediante calentamiento de tejidos sino por mecanismo no térmicos como la cavitación ultrasónica, activación de cuerpos de gas, tensión mecánica u otros procesos no térmicos indeterminados (Huang et al., 2017).

Por lo general, el rango de frecuencia usado para diagnóstico es alrededor de 2 a 12 MHz, lo cual dependerá de la amplitud de la presión, frecuencia o longitud de propagación, en el caso de los dispositivos de ultrasonido terapéutico utilizan ráfagas cortas u ondas continuas que dispersan energía a los tejidos afectados mejorando el flujo sanguíneo, esta técnica generalmente es empleada para terapia física, ayudando a acelerar la curación de tendones, músculos y otros tejidos. Otro novedoso método aprobado por la FDA es el ultrasonido enfocado de alta intensidad HIFU que favorece en el tratamiento de fibromas uterinos, ablación cardíaca y de partes blandas viscerales e incluso el glaucoma. Por otro lado, una terapia que se fundamenta en el ultrasonido de potencia moderada y baja frecuencia con microburbujas es la sonotrombolisis directa que se encuentra recientemente aprobado para el tratamiento de enfermedades tromboticas como accidente cerebrovascular (Miller et al., 2012).

El ultrasonido ha logrado sobresalir y va en constante crecimiento debido a sus propiedades de inactivación microbiana y enzimática. En la industria alimentaria ha sido objeto de estudio particularmente para el control de calidad y además por producir cambios bioquímicos, químicos y mecánicos debido a la cavitación, lo cual ha facilitado desarrollar aplicaciones en el procesamiento de alimentos, siendo las más usadas la activación o desactivación enzimática, emulsificación, conservación, cristalización, hidrogenación, ablandamiento de carnes e incluso mejorar la extracción de principio activos de matrices alimentarias (Gallo et al., 2018; Najjarzadeh et al., 2020).

Entre los efectos químicos y/o mecánicos contribuye con procesos de homogenización, mezcla, filtración, deshidratación, fermentación y desgasificación mediante acciones antiespumantes, minimiza el tamaño de partículas, dispersión de agregados, inactivación de microorganismos y enzimas. Se ha podido comprobar que es de gran utilidad en la valoración de textura, composición y viscosidad de alimentos, al igual que para el desarrollo de métodos de análisis no invasivos y para establecer niveles de homogenización de glóbulos de grasa en productos lácteos, entre otras aportaciones. Un punto importante a considerar es que el ultrasonido influye en la destrucción de la membrana biológica de microorganismos cuando es sometida a temperaturas inferiores a las que comúnmente se emplean durante la esterilización, del mismo modo ejerce un acción coadyuvante en procesos como extracción, pasteurización, entre otras (Delgado, 2011).

El uso que se le atribuya al ultrasonido dependerá de sus propiedades, si es de baja frecuencia y alta intensidad genera fuerzas mecánicas y de cizallamiento, siendo empleado en procesos de emulsificación en la industria láctea; por otro lado, si posee una alta frecuencia y baja intensidad se utiliza ampliamente en aplicaciones en las que es necesaria una gran cantidad de radicales redox, como la oxidación de contaminantes orgánicos, pero no es muy empleado en el procesamiento de alimentos, excepto para fines de control y diagnóstico de calidad (Huang et al., 2017).

Por otra parte, una aplicación poca destacada del US es su potente acción en la limpieza de superficies, siendo bastante útil para la desinfección de instrumental quirúrgico, material de laboratorio, bisagras, cerraduras e incluso siendo empleada para la limpieza dental. Estas prácticas poseen como principio un mecanismo no térmico llamado cavitación, que mediante vibraciones ultrasónicas atraviesan la solución de limpieza y crean burbujas, que mientras estas se hagan más grandes implosionan, creando un vacío en la solución que atrae los desechos de los instrumentos hacia el fluido circundante, permitiendo de esta manera una limpieza eficaz de las partes más complejas de estos materiales (World Health Organization and Pan American Health Organization, 2016).

1.2 Equipos de generación

En la actualidad se dispone con al menos tres tipos de equipos que generan ultrasonido, permitiendo de esta manera poder desarrollar diversas actividades en el laboratorio (Delgado, 2011).

1.2.1 Baños de ultrasonicos

Los baños de ultrasonido son uno de los equipos más populares y fáciles de manejar, ya que son empleados para la limpieza de material de laboratorio porque mediante sus vibraciones y la cavitación que producen sus burbujas agiliza el proceso de extracción de desechos e impurezas de los objetos que se colocan. Este equipo está formado por transductores que se encuentran en la base, un recipiente de acero inoxidable junto a un sistema de generación de energía. Una de sus principales desventajas es su baja potencia que proporciona al medio, al igual como su inestabilidad de campo acústico dentro del baño y el poco control que se puede mantener de la temperatura (Najjarzadeh et al., 2020).

Figura 1

Equipo de Baños de Ultrasonido Branson 1800



Nota. Adaptado de *Branson Ultrasonics* [Fotografía], por Fisher Scientific, 2022, <https://n9.cl/fk0ac>.

1.2.2 Sistemas tipo sonda

Este equipo está formado por una sonda metálica la cual proporciona la vibración al medio líquido por medio de un transductor, su potencia necesita de la extensión en la punta de la sonda, la cual está dirigida por la intensidad eléctrica que suministra el equipo

amplificador. Esta sonda debe poseer buena resistencia a la erosión que produce la cavitación al final de la sonda. En el caso de sondas cilíndricas brindaran energía acústica al medio, solo si existe una disminución del diámetro por tanto se obtiene una mejor amplitud de vibración, hay que rescatar que existen ciertos sistemas de este tipo que funcionan con sondas intercambiables donde fluctúan los diámetros de superficie emisora (Delgado, 2011).

Figura 2

Sonda de sonicación de gran superficie



Nota. Adaptado de *Cascatrodo de Hielscher – Sonda de sonicación de gran superficie* [Fotografía], por *Hielscher Ultrasound Technology*, 2022, <https://n9.cl/p2evu>

1.2.3 Equipos diseñados para la aplicación de ultrasonido de potencia

En la industria alimentaria se han diseñado y modificado equipos que permitan hacer uso del ultrasonido, como, por ejemplo, secadores de convección directa con transductores ultrasónicos empleados para el secado de frutas y verduras; este secador consta de un plato donde se posicionan láminas del alimento y por acción del aire caliente en conjunto con el transductor que produce vibraciones que eliminan el agua del producto. Otro tipo de máquina que facilita la refrigeración y pasteurización de concentrados de zumos y pulpas de frutas, es un cilindro giratorio por donde pasa el fluido, además posee transductores tipo túnel los cuales originan las vibraciones, estos son muy útiles combinados con métodos térmicos para la pasteurización donde se les han acoplado sondas al final del pasteurizador. Por ello para este fin, la temperatura se complementa con una onda ultrasónica de 20 KHz de frecuencia, la

cual es apropiada para el rompimiento celular de microorganismos patógenos; solo existe una pequeña desventaja cuando es usada en zumos de frutas ya que parámetros como el pH y acidez se ven afectadas, por esta razón es indispensable disminuir el tiempo y la temperatura para evitar modificaciones en la calidad del producto (Delgado, 2011).

Figura 3

Homogeneizador Ultrasónico



Nota. Adaptado de *Homogeneizadores de Laboratorio- Potente*

Ultrasonido [Fotografía], por Kasalab, 2022, <https://n9.cl/ns520>

1.3 Efectos del ultrasonido en organismos biológicos

En la naturaleza es posible percibir como diferentes animales y microorganismos usan el ultrasonido como mecanismo para solventar sus necesidades y poder sobrevivir. Siendo así que los murciélagos, son uno de los mamíferos que usan el US para desplazarse y alimentarse, emiten ráfagas ultrasónicas que rebotan en sus presas en forma de eco, las cuales son receptadas por el cerebro y sistema de audición de sus presas, es por ello que Lazzaro Spallanzani considerado el “padre de los ultrasonidos” demostró que estos animales usan sonidos inaudibles, lo que en la actualidad se conceptualiza como ecolocación. Incluso otro ejemplo claro son algunos cetáceos que aprovechan este fenómeno para cazar o evadir obstáculos usando US por su sistema vocal (Gallo et al., 2018; Moyano et al., 2022; Rodriguez et al., 2007).

En cuanto a microorganismos es usual pensar que este fenómeno es capaz de afectar en su crecimiento, pero para que esto llegase a ocurrir existen factores de los cuales dependerá mucho su umbral de tolerancia, una de ellas es que la insonación la cual debe ser de baja intensidad ya que esto permitirá incrementar el transporte de pequeñas moléculas en la solución produciendo una cavitación constante, favoreciendo en el estado de vida de las células microbianas acelerando su proliferación y más productos del metabolismo; mientras que una mayor frecuencia e intensidad ocasionaría daños irreparables en las células debido a que genera fuertes fuerzas mecánicas y de cizallamientos lo que impide el desarrollo de estas células (Li et al., 2021).

El rango de frecuencia de los ultrasonidos es amplio y va a depender del propósito para el que es empleado, por lo cual la potencia que separa los diferentes mecanismos biológicos de impacto de los ultrasonidos en el cuerpo es de 100 KHz, donde es importante considerar los posibles riesgos en personas expuestas al US debido a estas ondas sonoras no audibles con las que trabajan diariamente, por ello sería interesante estudiar los efectos y límites que pueden tolerar antes de ocasionar daños en la salud (Moyano et al., 2022).

1.4 Cultivo Bacteriano

A partir de los avances en la microbiología y el descubrimiento de los medios de cultivo en el siglo XIX, se generó uno de los primeros métodos para analizar la microbiota humana, empleando medios artificiales para ayudar a la proliferación y aislamiento de bacterias. En sus inicios los medios eran colocados en placas de vidrio, pero gracias a Julius Richard Petri se las sustituyó por cajas de cultivo en forma circular denominadas cajas petri, permitiendo de esta manera mejorar la visualización de las colonias aisladas y evitar la contaminación (Bonnet et al., 2020).

Los cultivos han facilitado el estudio de la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos, esto con el fin de mejorar en el diagnóstico y tratamiento de pacientes que padecen patologías a causa de estos microorganismos. Además a partir de medios de

cultivos bacterianos puros, se ha podido acceder a la secuenciación del genoma de cepas y otros estudios proteómicos para distinguir proteínas específicas y examinar su antigenicidad por medio de técnicas inmunoproteómicas, que posteriormente contribuirán como antígenos para pruebas serológicas; así mismo en la manipulación de genes para investigar causas de la resistencia a antibióticos, como también el potencial invasivo de las bacterias (Lagier et al., 2015).

Hay que tener en consideración un factor primordial que influye en el crecimiento de estos microorganismos que son los nutrientes, entre ellos se incluyen: el agua, fuentes de carbono, nitrógenos y algunos factores de crecimiento; como se puede apreciar en la Tabla 2 (Poirel et al., 2018).

Tabla 2

Nutrientes para el crecimiento bacteriano

Tipo	Acción
Agua	Solubiliza nutrientes, transporta y asegura las reacciones de hidrólisis. Algunas bacterias necesitan de agua libre para su crecimiento.
Fuentes de Carbono	Esencial en la producción de moléculas de carbono, grasas, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos.
Fuentes de Nitrógeno	Permite la producción de proteínas.
Factores de crecimiento	Elementos que las bacterias no pueden sintetizar a partir de los nutrientes disponibles en el medio ambiente como: bases púricas y pirimidínicas, aminoácidos y vitaminas.

Nota. En esta tabla se visualiza los factores más importantes para la proliferación bacteriana. Adaptado de Cultivo bacteriano en condiciones selectivas y no selectivas: la evolución de los medios de cultivo en microbiología clínica (p. 3), por Bonnet, 2020, Revista Nuevos microbios y nuevas infecciones. Vol 34.

Se debe resaltar que existen diferentes medios de cultivo, los cuales han sido adaptados en su formulación con diversos nutrientes y otras condiciones que permiten la

correcta proliferación de diversas cepas bacterianas, por lo cual se detalla los tipos de medios que en la actualidad son de los más usados (Zabel & Morrell, 2020).

Medios de cultivo no selectivos

Este tipo de medio de cultivo no posee inhibidores y dan una amplia posibilidad para que se dé el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. Inicialmente poseyó una formulación empírica donde se encontraban infusiones de carnes o extractos de corazón, cerebro o incluso extractos de levadura que aún permanecen dentro de los componentes principales. Otra fuente de nutrientes que se encuentran exentos de carbohidratos son las peptonas, las cuales son productos solubles de la hidrólisis enzimática de proteínas y es usada como aditivo en los medios de cultivo no selectivos, o incluso una variedad de enzimas y sustratos como carne, caseína, soja y gelatina (Bonnet et al., 2020).

Agar sólido y suero coagulado

Con la revolución de la microbiología clínica desde la creación de las cajas petri han permitió visualizar las colonias y frenar en parte la contaminación; por consiguiente para la preparación de estos agares se implementado ingredientes de cocina como gelatinas o agar que ha permitido medios de cultivo más sólidos, cabe destacar que se pueden usar otros componentes que ayudaran a generar el mismo efecto, como huevos coagulados, como el medio Lowenstein-Jensen empleado para cultivar *Mycobacterium*, o también usar suero coagulado para realizar *Corynebacterium* (Zabel & Morrell, 2020).

Medios enriquecidos

Existen microorganismos con condiciones exigentes para su crecimiento, es por ello que han diseñado este tipo de medios de cultivo enriquecidos, teniendo dentro de sus componentes la sangre, que suministra hemina y otros nutrientes. Con frecuencia se agrega en varios medios para incrementar notablemente el crecimiento de bacterias de tipo anaerobias. Esta clase de agar surgió de manera accidental para un cultivo de *Mycobacterium*

tuberculosis, mostrando ser un método más eficaz y rápido a comparación de los medios comunes que están hechos a base de huevo (Lagier et al., 2015).

Medios de cultivo selectivos

Los medios de cultivo selectivos fueron creados específicamente para un tipo determinado de microorganismo, provocando una inhibición en el desarrollo de los demás. En su formulación posee: *componentes orgánicos e inorgánicos* en los que se incluyen ácidos desoxicólicos y sales biliares que son usados para evitar el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente; *antibióticos y antisépticos* los cuales no poseen buena especificidad ya que pueden erradicar muchos géneros o especies bacterianas, pero dentro de los más empleados están un coctel de polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetropim y azlocilina para medios de cultivo de *Mycobacterium* (Bonnet et al., 2020).

Hay que considerar otros factores de los cuales se debe mantener un control para acelerar el crecimiento bacteriano como la *temperatura, atmósfera y tiempo de incubación*. Respecto a la temperatura, la mayoría de especies necesitan de temperaturas medias de 25 a 45 °C siendo una temperatura ideal de 37 °C, es un elemento crítico para el buen desarrollo de estos microorganismos; en cuanto a la atmósfera cada especie bacteriana puede requerir condiciones aerofílicas, anaeróbicas, microaerófilas dependiendo de sus necesidades de O₂, CO₂, N₂ para su recuperación óptima; finalmente el tiempo de incubación oscila entre las 24 a 48 h y se podrá mantener los cultivos dentro de un rango de 5 días, aunque hay especies que necesitan mucho más tiempo como por ejemplo *Bartonella spp.* cuyo desarrollo es lento y requiere de 12 a 14 días cuando se usa agar sangre, y ciertos aislamientos a veces requieren períodos de incubación más largos, mayores a 45 días (Lagier et al., 2015).

1.4.1 Bacterias

Las bacterias son consideradas organismos procariotas unicelulares, con una variedad de formas celulares, entre las más comunes están las redondas (cocos), cilíndricas (bastones), forma de maza (bastones indeterminados) y helicoidales. Poseen una pared

celular compuesta de peptidoglucano que es un polímero de acetilglucosamina, ácido N-acetilmurámico y varios aminoácidos; su modo de reproducción es por fisión binaria a excepción de un grupo bacteriano que lo realiza por gemación, cabe resaltar que estas células pueden fragmentarse cada 20 minutos y abarcar elevadas concentraciones de sustratos, por lo cual pueden proliferar de manera acelerada superficies expuestas. En cuanto a sus condiciones de vida, algunas de ellas pueden soportar ambientes extremos mientras que otras son sensibles y pueden verse afectadas por otros contaminantes, es por ello que para la esterilización de los medios de cultivo se requiere temperaturas de 121 °C por 15 a 20 minutos. Aunque algunas bacterias son móviles, la gran mayoría no lo son y requieren de ciertos elementos para adaptarse como el aire, agua, superficies o incluso animales que son usados como vectores para dispersarse. Con respecto a su clasificación se las puede dividir por géneros, especies, características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas; anteriormente se las agrupaba por el resultado de la tinción de Gram (positiva o negativa), su morfología, color, flagelos o la facultad de crecer en medios específicos. Actualmente su forma de aislar y secuenciar ADN ha conmutado de raíz su proceso de identificación y ha permitido generar una amplia cantidad de datos empleados para clasificar estos microorganismos (Zabel & Morrell, 2020).

Entre las bacterias que se van a utilizar durante el desarrollo de este trabajo investigativo están *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, donde se presenta información relevante y característica de cada bacteria.

1.4.2 Agares

EMB Agar con Eosina y Azul de Metileno

Es uno de los agares principalmente empleados para el aislamiento selectivo de especies de bacterias que poseen una morfología en forma de bacilos, específicamente Gram negativos ya que poseen un desarrollo acelerado y son poco exigentes nutricionalmente; entre ellas destaca la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro de su composición existe una fusión

de las fórmulas de Holt- Harris y Teague con la de Levine, permitiendo obtener un rendimiento favorecedor, además contiene peptona lo que ayuda a su desarrollo. Los indicadores de eosina y azul de metileno, marcan una gran diferencia entre aquellos microorganismos que aprovechan de lactosa y/o sacarosa para sobrevivir de los que son incapaces de hacerlo, ya que poseen un efecto inhibitorio sobre una amplia gama de bacterias gram positivas. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas. El agar es el agente solidificante, donde muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp.* presentan un característico brillo metálico, como se observa en la Figura 4. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras. (Rossi, 2021).

Figura 4

Escherichia coli en agar EMB



Nota. Adaptado de Reactivo gel de agar EMB Agar [Fotografía], por

Medical Expo, 2022, <https://n9.cl/wh7n0>

Existen algunas restricciones que posee este agar entre las cuales no es capaz de distinguir en microorganismos fermentadores el carbohidrato que se metaboliza; de la misma forma crea un efecto inhibitorio frente a las cepas de *Enterococo* y *Candida* pudiéndose visualizar como colonias de tamaño puntiforme; además se debe considerar que algunas cepas de *Salmonella* y *Shigella* posiblemente no se desarrollen en el agar EMB. Una parte importante es que para establecer tanto el género como la especie microbiana es necesario realizar pruebas bioquímicas adicionales. Es primordial preservar el medio preparado en las

placas a una temperatura de 2 a 8 °C, especialmente protegido de la luz ya que los indicadores son fotosensibles y puede ocasionar fotosensibilidad e inhibir el crecimiento de varias especies (Rossi, 2021).

Manitol Salado Agar

Este medio de cultivo es útil para el aislamiento y diferenciación de especies de *Staphylococcus* ya que se caracteriza por su selectividad y diferenciabilidad. En su formulación se encuentra generalmente extracto de carne, peptona y tripeteína fuente fundamental de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales que fomentan el desarrollo de estos microorganismos. El rojo fenol es un indicador del potencial hidrógeno mientras que el manitol es el hidrato de carbono fermentable y es por ello que se trata de un medio sumamente selectivo por su elevada concentración de salina y debido a la facultad de ciertos microorganismos de fermentar el manitol, se lo considera diferencial. Estas bacterias producen ácidos que alteran al pH del medio y lo transforma incluso cambiando su coloración de rojo a amarillo, esto ocurre en el caso de los *staphylococcos* coagulasa positivos ya que fermentan el manitol provocando que sus colonias se vean como en la Figura 5. En el caso contrario de los que no fermentan manitol, las colonias permanecerán rojas con un halo del mismo color o púrpura. Por tanto este medio de cultivo es confiable para el aislamiento de esta especie bacteriana a partir de muestras clínicas, alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos (Gutierrez, 2021).

Figura 5

Staphylococcus aureus en agar Manitol



Nota. Adaptado de *Staphylococcus aureus* agar sal manitol

[Fotografía], por Cromosoma Científico, 2021, <https://n9.cl/y3vuk>

Algunos *enterococos* pueden desarrollarse en este medio de cultivo y fermentar de la misma forma el manitol, por ello para su diferenciación es primordial llevar a cabo pruebas de catalasa, tinción Gram para su visualización microscópica (Gutierrez, 2021).

Escherichia coli

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, cuyas dimensiones son 2,0 – 6,0 mm de largo y bacilos de 1,1 – 1,5 mm de ancho con extremos redondeados; se clasifican como cocos (células esféricas) o filamentosas. Este microorganismos no fabrica esporas y suele ser móvil gracias a sus flagelos peritricos como se visualiza en la Figura 6., es anaeróbica facultativa y productora de gas por su fermentación de carbohidratos, igualmente tiene actividad β -galactosidasa y produce indol, pero no es capaz de hidrolizar la urea ni puede desarrollarse en presencia de cianuro por lo cual no sería ideal sembrarla en caldo KCN de Moller (Percival & Williams, 2013).

Figura 6

Escherichia coli



Nota. Adaptado de *Infección por E. coli* [Fotografía], por Cleveland

Clinic, 2020, <https://n9.cl/n4b13>

E. coli es versátil y se puede adaptar fácilmente, en cuanto a la patología que puede ocasionar están infecciones graves tanto en animales como humanos, aunque se presenta de forma natural en la microbiota de algunos hospedadores. Se debe mantener cuidado por la transmisión de su parte virulenta y/o resistente a través de diversas vías ya sea por contacto directo, con excrementos de animales o por alimentos (Poirel et al., 2018).

Como se mencionaba anteriormente no todas las cepas de esta bacteria son virulentas, por ejemplo *E. coli* comensal de los grupos A y B1 son colonizadores de la microbiota gastrointestinal humana, mientras que el grupo filogenético B2 son patógenas. Entre sus factores de virulencia están toxinas, adhesinas, sideróforos y cápsulas de polisacáridos, las cuales se relacionan con su resistencia a los antimicrobianos y la generación de biopelícula que imposibilitan la eliminación de microorganismos del cuerpo humano (Kobayashi et al., 2021).

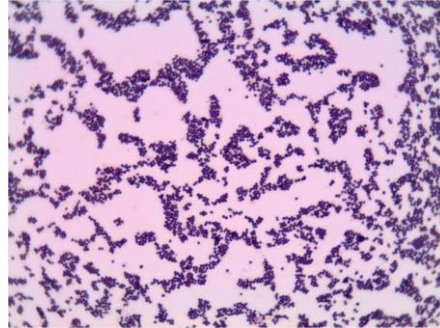
Este microorganismo puede aprovecharse cuando su huésped se encuentra inmunosuprimido o débil ya que puede romper las barreras gastrointestinales o diseminarse por todo el cuerpo y ocasionar un amplio espectro de enfermedades como: infecciones del tracto urinario, sepsis/meningitis, diarrea (Gomes et al., 2016). Por tanto para la prevención de este patógeno se pueden tomar las siguientes medidas: beber agua dulce, una alimentación adecuada, lavado de manos, almacenar de manera correcta el agua y alimentos para evitar su contaminación (Poolman, 2017).

Stapylococcus aureus

Es una bacteria Gram positiva, cuyas medidas oscilan entre 0,5 y 1,5 micras; su morfología característica en racimos de uva la hace reconocible sobre otras especies bacterianas como se observa en la Figura 7. Posee una gran facultad de adaptación y propagación, en la mayoría de los casos se transmite de humanos a animales y viceversa, así como también se puede albergar en fómites (Cervantes et al., 2014). No poseen movilidad, cápsula, ni son esporuladas y por tanto son anaerobias facultativas. La gran mayoría de estas bacterias producen catalasa lo que les facilita sintetizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre (Zendejas et al., 2014).

Figura 7

Staphylococcus aureus



Nota. Adaptado de *Staphylococcus aureus: Patrón de resistencia y factores de riesgo*. [Fotografía], por Red Latinoamericana de Pediatría y Neonatología, 2019, <https://n9.cl/rwi9z>

S. aureus puede causar intoxicaciones alimentarias por ingerir alimentos contaminados con enterotoxinas estafilocócicas, estas producen una liberación de histamina en los mastocitos intestinales lo que ocasiona estas patologías (Cheung et al., 2021). Entre las infecciones que comúnmente se dan en humanos están: abscesos cutáneos leves hasta septicemia, neumonía, osteomielitis crónica, bacteriemia y endocarditis pudiendo llegar a ser altamente mortal. Es un patógeno oportunista que produce infecciones nosocomiales, puede permanecer en una gama de espacios para colonizarse como dispositivos médicos permanentes, piel y tejidos blandos; entre los grupos más susceptibles a este microorganismo están pacientes con un estado inmunitario deficiente (personas con VIH), diabéticos y aquellos que han tenido antecedentes de la misma bacteria

Aunque puede colonizar piel y fosas nasales de personas sanas la mayoría no desarrollará una infección invasiva, mientras que pacientes a los cuales les haya afectado en su torrente sanguíneo tienen un alta tasa de mortalidad del 20 al 50% claramente dependiendo de la gravedad de la afección y aumentando su nivel de incidencia en los últimos años en países desarrollados (Kwiecinski & Horswill, 2021).

Por tanto, a partir de todo lo anteriormente expuesto dentro de este capítulo 1 se pretende enfocar la investigación en los efectos de las vibraciones ultrasónicas en el crecimiento de microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mediante el uso del equipo de ultrasonido Branson 3800, desarrollándose en los laboratorios de Física del departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Capítulo dos

Metodología

2.1 Preparación de agares

Las bacterias usadas en la parte experimental *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cuentan con acreditación American Type Culture Collection de The Global Bioresource Center, que se las obtuvo de los laboratorios de microbiología de la UTPL; estos microorganismos necesitan de medios de cultivo para poder proliferar, es por ello que se usaron los agares EMB HIMEDIA M317-100G y BBL™ Mannitol Salt Agar para cada bacteria respectivamente.

En el caso del agar EMB HIMEDIA M317-100G, contiene en su formulación: peptona 10.000 g/L, fosfato de hidrógeno dipotásico 2.000 g/L, lactosa 5.000 g/L, sacarosa 5.000 g/L, eosina 0.400 g/L, azul de metileno 0.065 g/L y agar 13.500 g/L; con un pH final de 7.4 ± 0.2 . Por otro lado, en cuanto al BBL™ Mannitol Salt Agar posee: digerido pancreático de caseína 5.0 g/L, digerido péptico de tejido animal 5.0 g/L, extracto de carne bovina 1.0 g/L, cloruro sódico 75.0 g/L, D-manitol 10.0 g/L, rojo fenol 0.02 g/L y agar 15.0 g/L; con un pH final de 7.4 ± 0.2 .

Luego de conocer la composición de cada medio de cultivo se procedió a su preparación, para ello se usaron 25 cajas petri de 60 x 15 mm, las cuales poseen una capacidad de 6 ml de agar por cada caja, es por esto que se realizaron los cálculos mediante reglas de tres para obtener las cantidades adecuadas, como se muestra a continuación. Cabe resaltar que en el caso del agar EMB HIMEDIA M317-100G se debe suspender en 35.96 g y en el BBL™ Mannitol Salt Agar se suspende a 111 g, ambos a 1000 ml de agua destilada.

$$\text{Volumen de agua destilada} = \text{ml de la caja} \times \text{número de cajas}$$

$$6 \text{ ml} \times 25 = 150 \text{ ml}$$

$$\begin{array}{r}
 \text{EMB} \\
 1000 \text{ ml} \quad 35.96 \text{ g de suspensión} \\
 150 \text{ ml} \quad \quad \quad X \\
 \text{g de agar} = \frac{150 \text{ ml} \times 35.96 \text{ g}}{1000 \text{ ml}}
 \end{array}$$

$$g \text{ de agar} = 5.39 \text{ g}$$

$$\begin{array}{r} \text{Manitol} \\ 1000 \text{ ml} \quad 111 \text{ g de suspensión} \\ 150 \text{ ml} \quad \quad \quad X \\ g \text{ de agar} = \frac{150 \text{ ml} \times 111 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \\ g \text{ de agar} = 16.65 \text{ g} \end{array}$$

Posteriormente, se procedió a mezclar suavemente en dos matraces diferentes 5.39 g de EMB y 16.65 g de Manitol con 150 ml de agua para cada agar, además se le agregó un agitador magnético que favoreció a la homogenización de las soluciones; después se las llevó a una plancha de calentamiento a una temperatura de 75 °C por 5 minutos. Seguidamente para prepararlos para su esterilización, se los envolvió en papel aluminio para llevarlos a la autoclave a 121 °C durante 30 minutos; luego de esto se dispensó en las cajas petri y finalmente se dejó enfriar para almacenarlas en refrigeración a una temperatura que oscila entre 2 a 8 °C.

Un punto importante a considerar es que todo el proceso de la elaboración hasta la dispensación se realizó cumpliendo todas las normas de bioseguridad obligatorias dentro de un laboratorio, con el uso del equipo de protección personal y en un ambiente estéril que se logró gracias a mecheros bunsen y alcohol al 70% para la limpieza del área.

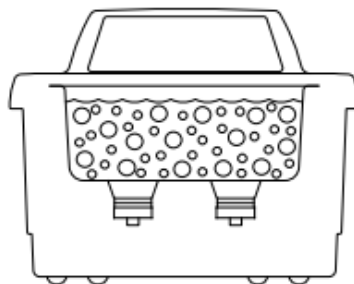
2.2 Equipo de Ultrasonido

El equipo utilizado fue el Baño Ultrasónico Branson MH 3800, este modelo posee como configuración un temporizador mecánico de hasta 60 minutos, un interruptor de calor, además de contar con transductores de 40 kHz de frecuencia los cuales suministraron la potencia adecuada para la proliferación bacteriana. En cuanto su funcionamiento se describe a continuación; los transductores van produciendo ondas de sonido que se van a propagar de forma radial en el medio líquido dentro del tanque, lo cual generará presiones en mayor y menor proporción de forma alternada. Cuando el equipo llegue a un período de baja presión se da la formación y crecimiento de millones de burbujas microscópicas, este fenómeno es conocido como cavitación produciendo pequeñas vibraciones en el medio líquido como se

muestra en la Figura 8. Luego de este período ocurre uno de alta presión que provoca en las burbujas una contracción e implosión, liberando de esta forma enormes cantidades de energía en todas las direcciones y generando vibraciones como se visualiza en la Figura 10 (Carrillo et al., 2021).

Figura 8

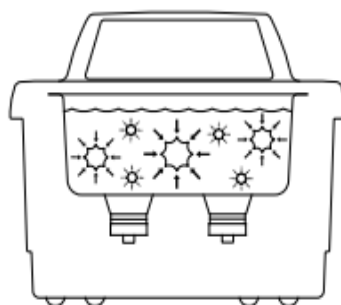
Burbujas microscópicas en el medio líquido



Nota. Adaptado de *Baños de ultrasonidos Modelos 1800, 2800, 3800, 5800, 8800.* [Fotografía], Branson, 2017, <https://n9.cl/ene96>

Figura 9

Cajas petri en el equipo Branson MH 3800



Nota. Adaptado de *Baños de ultrasonidos Modelos 1800, 2800, 3800, 5800, 8800.* [Fotografía], Branson, 2017, <https://n9.cl/ene96>

2.3 Inoculación y adaptación en el equipo

Para este proceso de inoculación de las cepas bacterianas es necesario mantener un área de trabajo estéril con el fin de evitar la contaminación por parte de cualquier

microorganismo externo, por ello se empleó mecheros bunsen los que facilitaron calentar el asa de inoculación hasta obtener un color rojo intenso esto con la finalidad de esterilizarlo, posterior se dejó enfriar el asa durante 3 a 5 segundos. Luego se recogió la muestra del cultivo bacteriano tanto de *E. coli* ATCC 25922 como de *S. aureus* ATCC 25923 con el asa, se levanta la tapa de la caja petri que se va a sembrar, para ello con el objetivo de facilitar el conteo y el análisis macroscópico de las cepas se generó un patrón de puntos, por lo cual no se realizó un estriado convencional como se observa en la figura 10, cabe resaltar que se debe sembrar cada bacteria en su respectivo medio de cultivo ya preparado anteriormente, después se hizo el etiquetado colocando el número de puntos sembrados y sellado de las cajas con parafilm.

Figura 10

Cajas petri con patrón de puntos



Nota. Caja petri inoculada con patrón de puntos [Fotografía]

Por otro lado, se dispensó 500 ml de agua destilada en el tanque del baño ultrasónico y se colocó las cajas petri inoculadas en lunas de reloj para evitar ingreso de líquido como se observa en la figura 11, se encendió y se estableció el tiempo de exposición, para esta parte se determinó tres diferentes tiempos de 30 min, 60 min y 90 min, además de una caja extra la cual sirvió como referencia y la que no fue sometida a las vibraciones; también se controló la temperatura por medio un termómetro de mercurio donde se verificó que oscilara entre los 37 a 40 °C.

Figura 11

Cajas petri en ultrasonido



Nota. Cajas petri inoculadas expuestas al baño de ultrasonido Branson

MH 3800. [Fotografía]

2.4 Condiciones de incubación

Una vez finalizado el tiempo de las bacterias en el ultrasonido, se las retiró, envolvió en papel aluminio y etiquetó con datos importantes como el tiempo de exposición, número de puntos inoculados y la fecha de la realización del experimento. Para seguidamente llevarlas a la incubadora donde permanecieron a una temperatura de 37 °C durante 24 horas,

Para un análisis preliminar del crecimiento bacteriano se realizó de forma macroscópica visualizando un cambio de coloración del medio de cultivo y microscópica mediante ImageJ con las dos especies bacterianas, en los diferentes intervalos de tiempo.

Capítulo tres

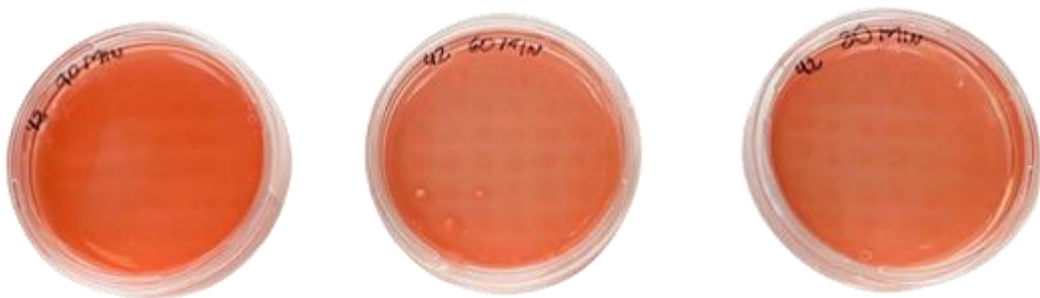
Resultados y Discusiones

3.1 Resultados macroscópicos obtenidos de *S. aureus* y *E. coli*

A partir de la inoculación de un patrón de 42 puntos y la incubación de la especie bacteriana *S. aureus* en tres rangos distintos de tiempo 30, 60 y 90 minutos de exposición al ultrasonido, se obtuvo cambios de coloración partiendo desde una tonalidad rojiza, como se puede evidenciar en la figura 12 que muestra el día cero.

Figura 12

S. aureus día cero



Nota. Cajas petri después de su exposición al ultrasonido. [Fotografía]

Un punto importante a resaltar es que el mismo día de la inoculación de las cajas, a las 12 horas después de ser incubadas ya se pudo visualizar un cambio parcial de coloración del medio y las colonias a una tonalidad amarillenta, por lo cual se puede afirmar que se produjo una fermentación del manitol, esto se pudo hacer más evidente a los dos días posteriores de la exposición.

Como anteriormente se mencionó además de las 3 cajas de petri colocadas en el ultrasonido, se complementó con una cuarta que fue la de referencia, la cual al no ser expuesta al ultrasonido mantuvo sus 42 colonias con un tono amarillo opaco, brillante y con cierta apariencia cremosa (figura 13); en cuanto a la caja expuesta a 30 minutos del día tres, las 42 colonias presentaban una tonalidad amarillenta tenue y con poca cremosidad (figura

14), generando un alto contraste con la de referencia; a los 60 minutos del mismo día se desarrollaron 42 colonias de amarillo oscuro con cierta tonalidad café (figura 15) y finalmente a los 90 minutos a simple vista se pudo visualizar las 42 colonias de un tono amarillo opaco, cremosas y de un tamaño más considerable (figura 16).

Figura 13

S. aureus día cero



Nota. Cajas petri después de su exposición al ultrasonido. [Fotografía]

Figura 14

S. aureus de 30 minutos



Nota. 42 colonias de *S. aureus* expuestas a 30 minutos de ultrasonido, en su tercer día. [Fotografía]

Figura 15

S. aureus de 60 minutos



Nota. 42 colonias de *S. aureus* expuestas a 60 minutos de ultrasonido en su tercer día, con tres colonias con puntos cafés. [Fotografía]

Figura 16

S. aureus de 90 minutos



Nota. 42 colonias de *S. aureus* expuestas a 90 minutos de ultrasonido en su tercer día. [Fotografía]

Por otra parte, se obtuvieron resultados completamente diferentes con *E. coli*, ya que a pesar de utilizar los mismos rangos de tiempo, temperatura y método de inoculación no se lograron cambios significativos en el desarrollo de las colonias debido a su delicadeza y sensibilidad ante factores externos. En la figura 17 se puede observar las 3 cajas petri luego de mantenerse en el ultrasonido con sus respectivos intervalos de tiempo.

Figura 17

E. coli en tres diferentes intervalos de tiempo



Nota. Colonias de *E. coli* con tonalidad rojiza anaranjada después de ser colocadas en el ultrasonido. [Fotografía]

Respecto a la caja de referencia se inoculó un patrón de 42 puntos como se puede visualizar en la figura 18 donde se notan sus cambios después de tres días, presentando colonias de oscuras, pero con su característico verde brillante, asegurando de esta manera que se dio la fermentación de la lactosa en el medio.

Figura 18

E. coli de referencia



Nota. Colonias de *E. coli* con 42 puntos inoculados, presenta colonias oscuras y con su brillo metálico. [Fotografía]

A pesar de no presentar un cambio notable en la coloración del medio a diferencia de *S. aureus*, se logró obtener resultados con el patrón de puntos ya que, en el caso de la caja expuesta a 30 minutos de las 42 colonias sembradas solo crecieron 41; además presentaron un verde poco brillante y 7 colonias oscuras, como se muestra en la figura 19. Mientras que

en el caso de la caja de 60 minutos solo se pudo distinguir 40 puntos visibles con colonias y medio rojizo oscuro, pero sin presencia del característico verde brillante (figura 20), por tanto, se comprueba que estas colonias no sobrevivieron al ultrasonido. Por último, la caja de 90 minutos tuvo un gran éxito a pesar de su lento crecimiento y de contar con solo 41 puntos, permaneció después de 5 días de exposición con la coloración característica de sus colonias (figura 21).

Figura 19

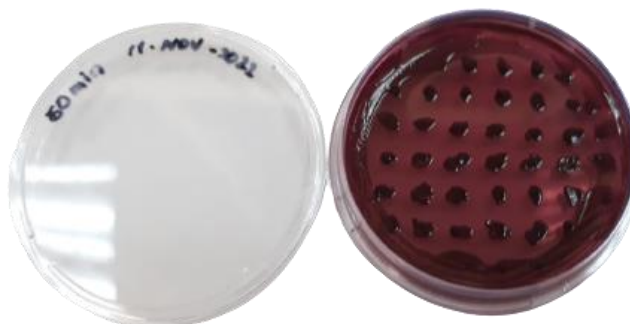
E. coli de 30 minutos



Nota. Colonias de *E. coli* con crecimiento de 41 puntos presenta colonias oscuras y con un tenue verde brillo metálico. [Fotografía]

Figura 20

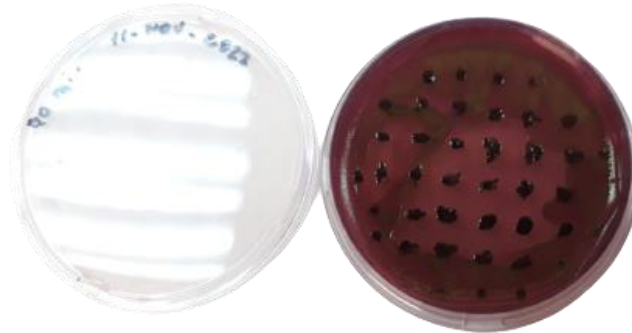
E. coli de 60 minutos



Nota. Colonias de *E. coli* con crecimiento de 40 puntos, oscuras y sin su verde brillante. [Fotografía]

Figura 21

E. coli de 90 minutos



Nota. *E. coli* con crecimiento de 41 puntos, presenta colonias oscuras y en su medio un verde brillante. [Fotografía]

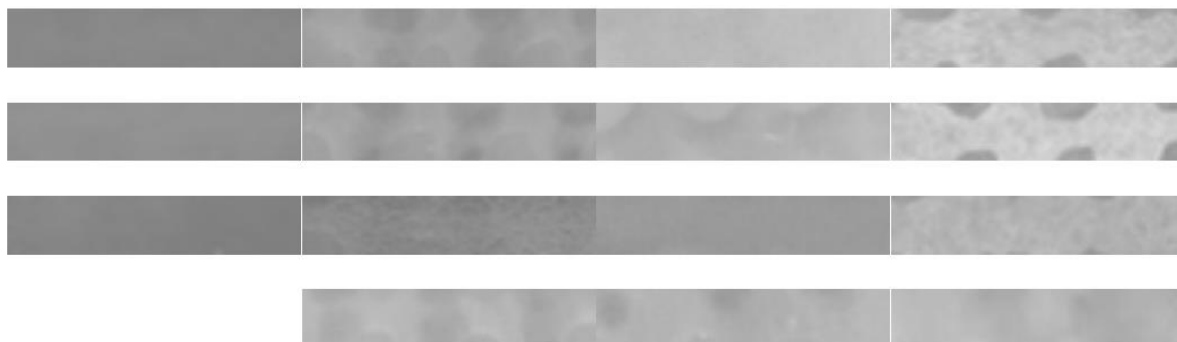
3.2 Análisis de resultados con ImageJ

Debido al crecimiento de las colonias y al cambio de coloración del medio, para este análisis microscópico se tomó únicamente a *S. aureus*, ya que sus cambios son más notables a simple vista a diferencia de *E. coli* que solo reflejan su brillo verde metálico cuando se observan con luz reflejada a un cierto ángulo.

El programa ImageJ permite realizar un procesamiento digital de las fotografías de todas las muestras de la especie bacteriana seleccionada, donde se tomó todos resultados logrados a lo largo de tres días consecutivos con los diferentes períodos de tiempos establecidos. Esto se llevó a cabo mediante la selección de la zona central de cada caja y se hizo el cambio a escala de grises para obtener una imagen donde se pudiera realizar una comparación mediante perfiles de intensidad en escala de grises. Para este análisis se tomó la caja de referencia y las tres cajas correspondientes a los tiempos de exposición a US 30, 60, 90 minutos, lo cual permitió medir la intensidad del color, como se muestra en la figura 22.

Figura 22

Zona central de S. aureus

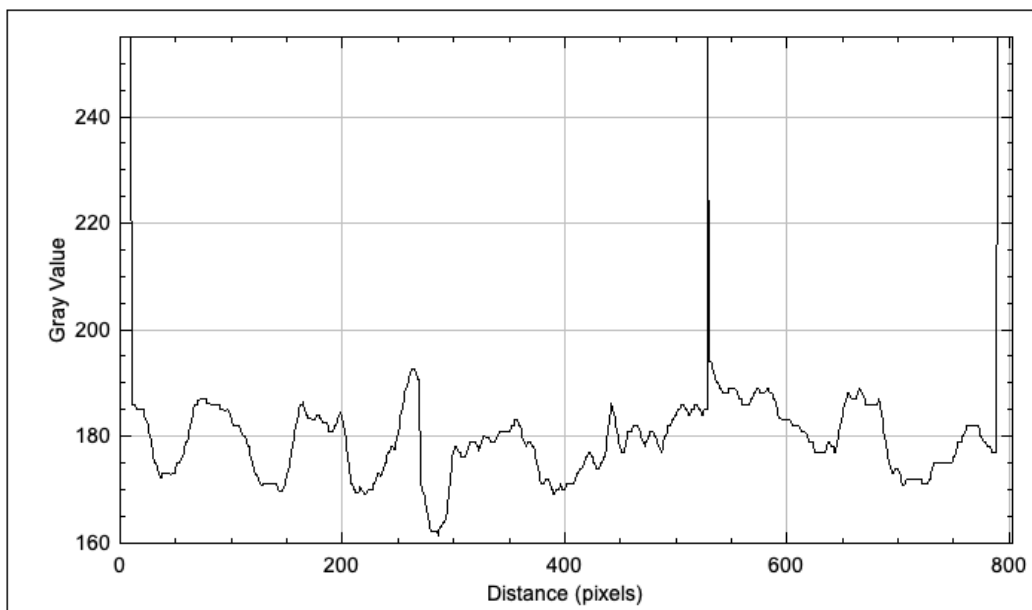


Nota. Zonas centrales de *S. aureus* de las cajas de prueba 30, 60 y 90 minutos, así como la caja de referencia, respectivamente de arriba hacia abajo [Fotografía]

Una vez efectuado este procesamiento, se pudo extraer gráficas de perfiles de intensidad de grises, donde en el *eje x* se midió la distancia en pixeles, mientras que el *eje y* estuvo en función a la escala de grises, de esta manera se generan gráficos con diferentes niveles de intensidad. En la figura 23 se muestra la caja de referencia, donde se evidencia que el gráfico permanece constante y con poca variabilidad durante los tres días de evaluación. No siendo el caso de la caja de 30 minutos (figura 24) donde se puede notar niveles más altos conforme pasan los días. En cuanto al medio de 60 minutos (figura 25) no indica un gran cambio al término del primer día, mostrando un cambio gradual a partir del segundo día. Finalmente, en la gráfica de los 90 minutos (figura 26), se expone una regularidad desde el día cero al segundo, no sobrepasando los 160 en la escala de grises y generando apenas al tercer día un cambio en el pico hasta los 180.

Figura 23

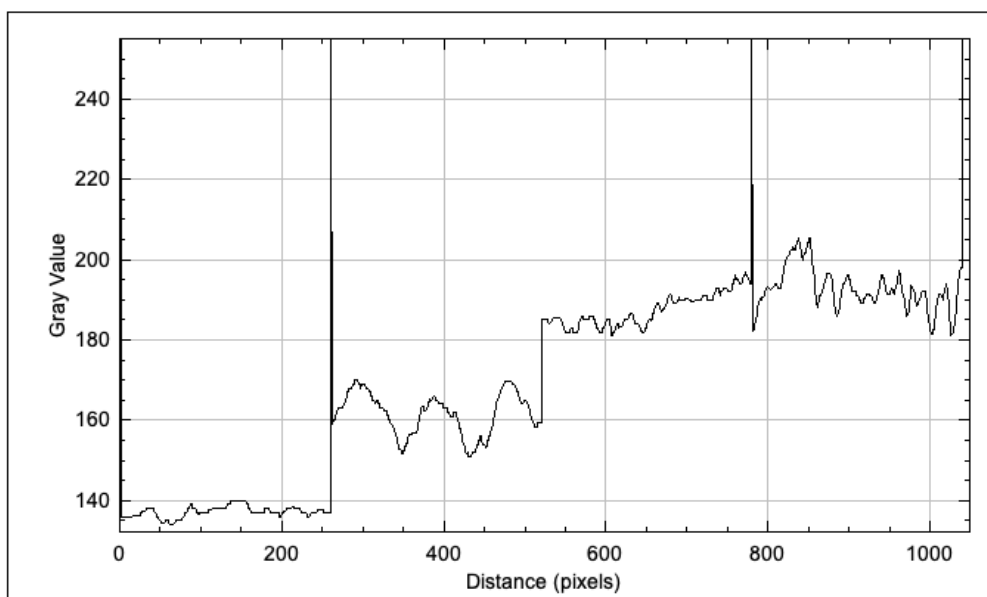
Gráfica *S. aureus* referencia



Nota. *S. aureus* durante tres días de estudio. [Fotografía]

Figura 24

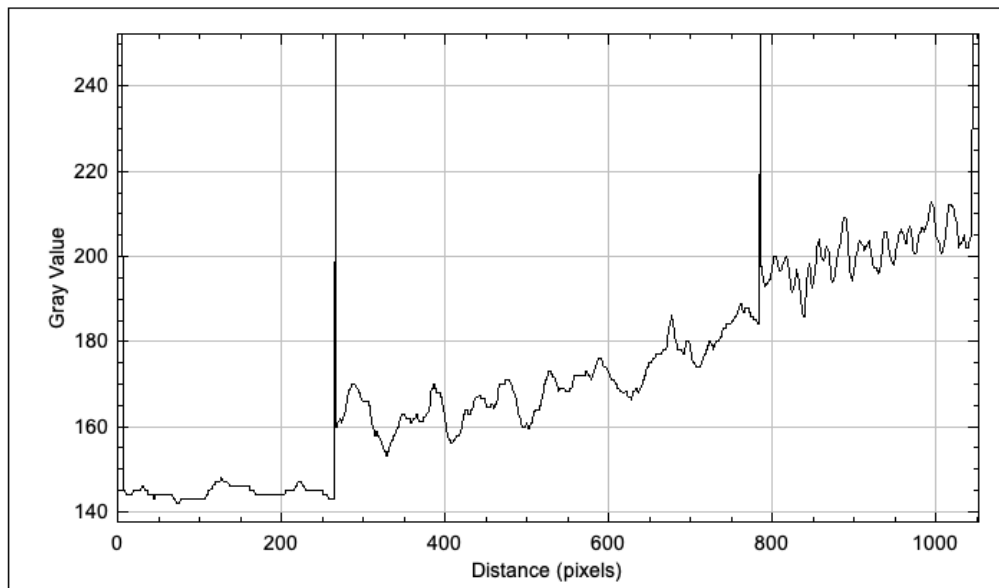
Gráfica de *S. aureus* 30 minutos



Nota. Variabilidad en los picos de *S. aureus* durante tres días consecutivos. [Fotografía]

Figura 25

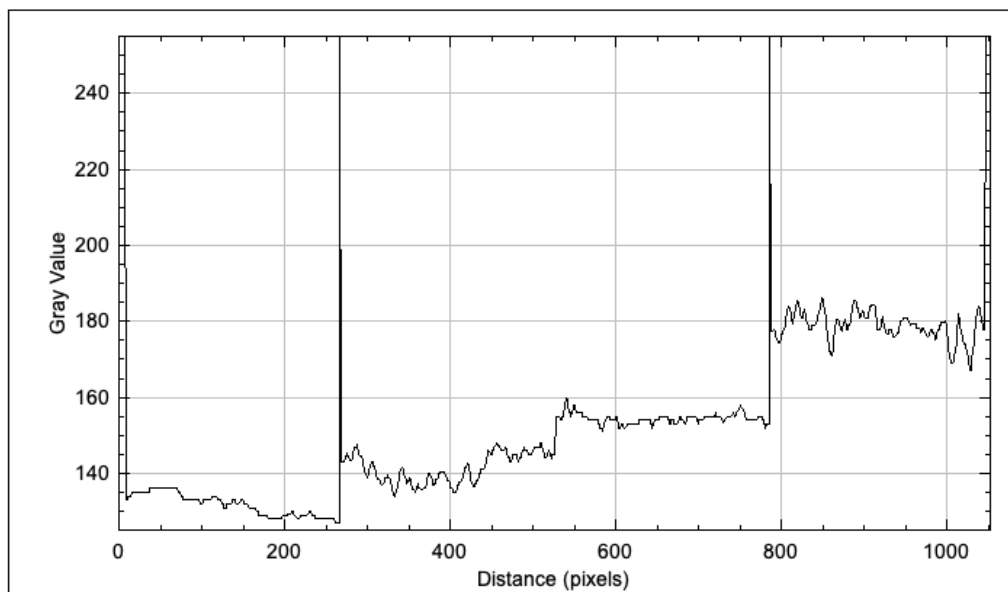
Gráfica de S. aureus 60 minutos



Nota. Crecimiento progresivo de los picos de *S. aureus* a partir del día 1 al 3. [Fotografía]

Figura 26

Gráfica de S. aureus 90 minutos



Nota. Gráfica de *S. aureus* a los 90 minutos de exposición al ultrasonido, partiendo de su referencia al día 3 de evaluación. [Fotografía]

En la tabla 3 se puede visualizar el promedio de todos los datos con los que se elaboró las gráficas anteriormente mencionadas, donde ya se puede obtener un resultado más claro para realizar una comparativa entre muestras. En este caso se están tomando los valores de la caja de referencia que no fue expuesta al ultrasonido y comparándolas con los datos de las cajas en los diferentes intervalos de tiempo de exposición al US, evidenciándose que la caja de 30 min es la más similar a la de referencia, con valores muy cercanos en cuanto a la intensidad de su coloración a lo largo de los 3 días de control, donde se pudo hacer evidente que a partir del día dos con un valor de 186,8 supera a la de referencia con 177, 27 y finalmente en el tercer día sobrepasa la intensidad de origen con 193,8.

Tabla 3

Tabla de intensidades de *S. aureus*

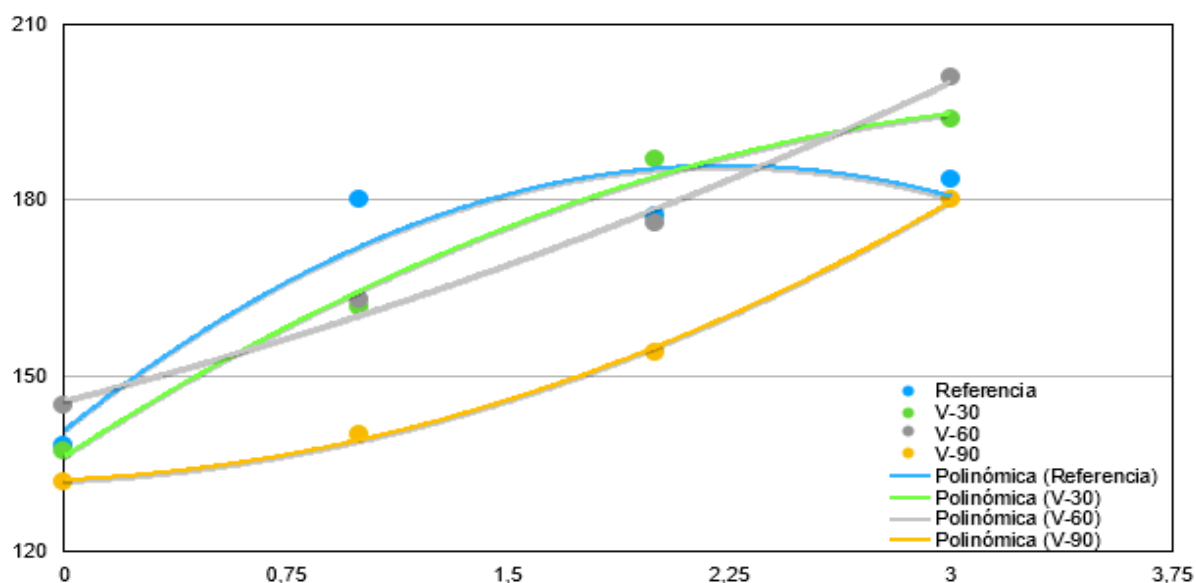
Día	Referencia	30 min	60 min	90 min
0	180	137,2	145	132
1	180,11	161,7	163	140
2	177,27	186,8	176	154
3	183,35	193,8	201	180

Nota. En esta tabla se observa los promedios obtenidos de los valores con los que se elaboraron las gráficas de intensidad de color de la cepa de S. aureus.

Además, en la figura 27 se puede apreciar que la curva azul (referencia) alcanza una tonalidad gris lo cual equivale a un tono amarillo con un valor alrededor de los 183, también es posible apreciar que la curva verde (30 minutos) presenta un comportamiento similar a la de referencia, teniendo un leve retraso en su cambio al amarillo. Por otro lado, se ve que las gráficas en gris y amarillo (60 y 90 minutos respectivamente) tardan más en alcanzar el tono de gris que presenta la referencia, por lo que se puede concluir que a los 60 y 90 minutos de exposición el ultrasonido afecta en los tiempos de incubación de esta especie bacteriana, haciéndose aún más evidente que a los 90 minutos *S. aureus* posee un desarrollo más lento a lo largo de los tres días de control.

Figura 27

Gráfica de la intensidad en amarillo de *S. aureus*



Nota. En esta gráfica se visualizan las curvas de las tres cajas expuestas al ultrasonido y la caja de referencia y los valores que obtiene durante tres días.

Estos resultados nos aseguran que una exposición a ultrasonido de 40kHz, ralentiza el desarrollo de esta cepa, esto coincide con un estudio desarrollado por Tahia et al., donde investigó los efectos del tratamiento con ultrasonido y calor sobre la viabilidad de las células de *S. aureus* en jugo de naranja, usando una frecuencia de 20 kHz con un tiempo de 60 minutos donde detectó un aumento en el número de bacterias; mientras que a 30 kHz a 55 °C durante 5,10 y 20 minutos observó una reducción e inactivación microbiana. Por tanto, las condiciones a las que se exponga *S. aureus* dependerá para que exista o no una mejor viabilidad celular.

La razón para que estas células sobrevivan al ultrasonido se debe a sus envolturas físicamente resistentes, al contenido de peptidoglicano y ácido teicoico de su pared celular y a la presencia de cápsulas. Estas cápsulas brindan protección frente a las burbujas de cavitación generadas por la sonicación evitando que colapsen cerca de la membrana plasmática y protegiendo a la célula de la ruptura. También la alta hidratación de la cápsula

resguarda a la célula ya que absorbe las fuerzas mecánicas ejercidas sobre la bacteria; además de que estas burbujas producidas por el ultrasonido son hidrofóbicas, lo que facilita su acción sobre superficies del mismo tipo, pero en el caso de la superficie de *S. aureus* es hidrófila, lo que provoca un colapso lejos de su membrana y como resultado sea un daño microbiano leve. Es por ello que altas temperaturas y durante tiempos prolongados de exposición provoca una sensibilización de estas cápsulas, debilitando así la membrana externa de las células microbianas, haciendo que las células sean menos resistentes al ultrasonido (Tahi et al., 2021)

Por otra parte *E. coli* no pudo ser analizada de manera adecuada como la otra cepa, esto debido a su coloración tanto del agar como de sus colonias, ya que en el agar EMB cuando existe un buen crecimiento de sus colonias, estas se tornaran de un color negro azulado oscuro con un brillo verde metálico que indica la fermentación de la lactosa y producción de ácido que precipita en el pigmento metálico verde (Lal & Cheeptham, 2016). Por tanto, esto le impidió que, al momento de cambiar su coloración a una tonalidad de grises se mantuvieran manchas oscuras que imposibilitaron evaluarla de mejor manera.

Además, se presentó un inconveniente con respecto al desarrollo de todos los puntos inoculados esto debido a un factor importante que es el agua; a pesar de jugar un papel fundamental en esta investigación porque el baño de ultrasonido usa este medio líquido para generar la cavitación lo que favorece a su crecimiento, esto llevo a afectar porque las cajas al momento de mantenerse dentro del equipo, el agua con el aumento de la temperatura se evaporó en el interior de los medios de cultivo. Por lo general algunas bacterias necesitan agua libre para su crecimiento, si ocurre una evaporación durante su período de incubación del agar, puede haber una pérdida de esta agua, lo que resultaría en una disminución en el tamaño de las colonias y en algunos casos la inhibición de su crecimiento, lo que explicaría porque no todos los 42 puntos se desarrollaran adecuadamente (Bonnet et al., 2020)

Pitt & Ross dentro de su investigación para aumentar la tasa de crecimiento de células bacterianas adheridas a la superficie usando células de *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* en una superficie de polietileno con ultrasonido de 70 kHz, determinaron que la sonicación favorece a la formación de biopelículas las cuales protegen a las bacterias de entornos adversos y ayudando a su supervivencia; como resultados se obtuvo mayor supervivencia de *S. epidermis* sobre *E. coli*, ya que sustentando su teoría realizaron el mismo ensayo sin ultrasonido donde se vio una disminución de las biopelículas en el orden de *S. epidermis* > *E. coli* > *P. aeruginosa*. Por ende, esto nos daría una explicación más clara de por qué las colonias de *S. aureus* sobrevivieron por encima de *E. coli* a pesar contar con las mismas condiciones de incubación, los mismos tiempos e igual frecuencia, inclusive 30 kHz menos que la del ensayo anteriormente mencionado.

Conclusiones

La cepa de *S. aureus* expuesta a 30 minutos de ultrasonido con una frecuencia de 40 kHz y una temperatura de incubación de 37 °C, presenta una ralentización en su proliferación celular, sin embargo al tercer día de estudio se observa un resultado mayor (193,8) que la caja de referencia (183), lo que indica que el agar se tornó más amarillo que la cepa de control; mientras que a tiempos de 60 y 90 minutos es más evidente el crecimiento más lento de la cepa, siendo el más lento la correspondiente a 90 minutos de exposición a US.

En el caso de la cepa de *E. coli* sus resultados macroscópicos permitieron visualizar su crecimiento, esto gracias a su coloración verde brillante metálico de sus colonias, que de igual manera que la otra cepa a los 30 minutos de sonicación existió el desarrollo de 41 colonias de 42; por otro lado, a los 60 minutos se generó la muerte celular y a los 90 minutos un lento crecimiento microbiano.

La resistencia de *S. aureus* frente al ultrasonido se debe a sus cápsulas protectoras que imposibilitan un impacto de la cavitación en la membrana celular, en el caso contrario que se desee provocar una inactivación microbiana las condiciones a las que se expone la cepa juegan un papel fundamental, considerando que una alta temperatura y tiempo prolongados de sonicación producen una sensibilización de la membrana teniendo como resultado la erradicación de la especie bacteriana.

Recomendaciones

Investigar sobre las condiciones que requiere cada especie bacteriana con la que se desea trabajar para evitar contratiempos por no contar con todas sus especificaciones.

Mantener un control tanto de la temperatura de las cajas petri con los agares para prevenir su derretimiento, como de las bacterias inoculadas para eludir que se lleguen a secar o incluso por altas temperaturas estos microorganismos mueran.

Contar con especies bacterianas certificadas y sobre todo con varias de reserva, con el objetivo de precaver un retraso en el proyecto por falta de estas. Además, al momento de inocular revisar y seguir un protocolo vigente que permita prevenir errores por falta de información.

Por otro lado, si se desea realizar un análisis microscópico con el programa ImageJ u otros similares, se debe tener en consideración cepas bacterianas donde sea fácil de percibir cambios de coloración tanto de las colonias como del medio de cultivo para un mejor estudio.

Referencias

- Bonnet, M., Lagier, J., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
- Carrillo, L. M., Garcia, I. A., Tirado, J. M., Sanchez, R., Huerta, M., & Alarcon, A. D. (2021). Recent advances in the application of ultrasound in dairy products: Effect on functional, physical, chemical, microbiological and sensory properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105467. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105467>
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28–40. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Cheung, G., Bae, J., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* ABSTRACT. *Virulence*, 12(1), 547–569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Delgado, O. J. (2011). Aplicacion del ultrasonido en la industria alimentaria. *Revista Especializada En Ingeniería de Procesos En Alimentos y Biomateriales*, 1–12. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/publicaciones-e-investigacion/article/view/1098/1264>
- Gallo, M., Ferrara, L., & Naviglio, D. (2018). Application of ultrasound in food science and technology: A perspective. *Foods*, 7(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/foods7100164>
- Gomes, T., Elias, W., Scaletsky, I., Beatriz, G., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gutierrez, J. (2021). Agar Manitol. *Britania*, 1, 1–2. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/proskauer.pdf

- Huang, G., Chen, S., Dai, C., Sun, L., Sun, W., Tang, Y., Xiong, F., He, R., & Ma, H. (2017). Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.018>
- Kobayashi, T., Ikeda, M., Okada, Y., Okugawa, S., & Moriya, K. (2021). Clinical and Microbiological Characteristics of Recurrent. *Microbiology Spectrum*, 9(December), 1–10. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01399->
- Kwieceński, J., & Horswill, A. (2021). HHS Public Access. *Curr Opin Microbiol*, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.005.Staphylococcus>
- Lagier, J. C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 208–236. <https://doi.org/10.1128/CMR.00110-14>
- Lal, A., & Cheeptham, N. (2016). Eosin-Methylene Blue Agar Plates Protocol. *American Society of Microbiology, September 2007*, 1–7. American Society for Microbiology
- Li, X., Zhang, J., Wu, C., Hong, T., Zheng, Y., Li, C., Li, B., Li, R., Wang, Y., Liu, X., Zhao, Z., Qi, Q., & Du, X. (2021). Experimental Research on the Effect of Ultrasonic Waves on the Adsorption, Desorption, and Seepage Characteristics of Shale Gas. *ACS Omega*, 6(26), 17002–17018. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02018>
- Miller, D. L., Smith, N. B., Bailey, M. R., Czarnota, G. J., Hynynen, K., & Makin, I. R. S. (2012). Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 31(4), 623–634. <https://doi.org/10.7863/jum.2012.31.4.623>
- Moyano, D. B., Paraiso, D. A., & González, R. A. (2022). Possible Effects on Health of Ultrasound Exposure , Risk Factors in the Work Environment and Occupational Safety Review. *Healthcare*, 10. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/healthcare10030423>
- Najjarzadeh, N., Krige, A., Pamidi, T. R. K., Johansson, Ö., Enman, J., Matsakas, L., Rova,

- U., & Christakopoulos, P. (2020). Numerical modeling and verification of a sonobioreactor and its application on two model microorganisms. *Plos One*, 15(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229738>
- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2013). *Escherichia coli*. In *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition* (Second Edi). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>
- Poirel, L., Madec, J., Lupo, A., Schink, A., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 1–27. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.Correspondence>
- Poolman, J. T. (2017). *Escherichia coli*. In *International Encyclopedia of Public Health* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00504-X>
- Rodriguez, J., Vitola, J., & Cantor, S. del P. (2007). Fundamentos teórico-prácticos del ultrasonido. *Tecnura*, 10, 4–18. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=257021012001>
- Rossi, A. (2021). E.M.B. Agar (con Eosina y Azul de Metileno). *Laboratorios Britania s.A*, 2–3. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e713a290e.pdf
- Tahi, A. A., Sousa, S., Madani, K., Silva, C. L. M., & Miller, F. A. (2021). Ultrasound and heat treatment effects on *Staphylococcus aureus* cell viability in orange juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 78(July). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105743>
- World Health Organization and Pan American Health Organization. (2016). Decontamination and Reprocessing of Medical Devices for Health-care Facilities. *World Health Organization*, 1–118. <https://www.who.int/infection-prevention/publications/decontamination/en/>
- Zabel, Robert, & Morrell, J. (2020). *The characteristics and classification of fungi and bacteria* (R Zabel & J. Morrell (eds.); Second Edi). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12->

819465-2.00003-6

Zendejas, G., Avalos, H., & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus* : Generalidades , patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129–143. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>