

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



**Determinación de la efectividad de pulsos eléctricos en la  
viabilidad bacteriana**

Trabajo de graduación presentado por Luis Pedro Velásquez Galindo  
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Electrónica

Guatemala,

2018







UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



**Determinación de la efectividad de pulsos eléctricos en la  
viabilidad bacteriana**

Trabajo de graduación presentado por Luis Pedro Velásquez Galindo  
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Electrónica

Guatemala,

2018



Vo.Bo.:



(f) \_\_\_\_\_  
Dalia Lau-Bonilla, Ph.D.

Tribunal Examinador:



(f) \_\_\_\_\_  
Dalia Lau-Bonilla, Ph.D.



(f) \_\_\_\_\_  
MSc. Carlos Esquit

Robert M. Fuertez

(f) \_\_\_\_\_  
Ing. Robert Fuertez

Fecha de aprobación: Guatemala, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021.



El campo de la investigación es una vocación en la que se debe establecer una hipótesis y trabajar a partir de ella, tomando en cuenta antecedentes, teoría y conocimiento de personas versadas en el tema. Mi experiencia en la investigación ha sido algo que he llegado a percibir únicamente hasta este momento, siendo una experiencia nueva y atrapante para las personas que lo desconocen, sobre todo a personas como yo, quienes están acostumbrados al desarrollo y a la viabilidad de los proyectos, más que al poder obtener resultados y generar ideas y avanzar en base a estos.

La investigación de nuevos métodos de eliminación de amenazas para la salud humana es siempre un tema de alto interés, ya que es importante para la viabilidad humana en todo momento. Desarrollar ideas como estas que se basan en la naturaleza misma de los seres vivos es algo de vital importancia, ya que puede ser la manera de mayor posibilidad para poder combatir cualquier tipo de amenaza a la salud.



<b>Prefacio</b>	<b>v</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>x</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>xi</b>
<b>Resumen</b>	<b>xiv</b>
<b>Abstract</b>	<b>xv</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>3</b>
2.1. Radiofrecuencia . . . . .	3
<b>3. Justificación</b>	<b>9</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>11</b>
4.1. Objetivo general . . . . .	11
4.2. Objetivos específicos . . . . .	11
<b>5. Alcance</b>	<b>13</b>
<b>6. Marco teórico</b>	<b>15</b>
6.1. Generador de funciones . . . . .	15
6.1.1. Panel frontal . . . . .	16
6.2. Osciloscopio . . . . .	17
6.2.1. Controles del osciloscopio . . . . .	19
6.3. Ondas eléctricas . . . . .	20
6.3.1. Ley de Gauss . . . . .	20
6.3.2. Fundamentos de los fenómenos periódicos . . . . .	21
6.3.3. Modelos matemáticos de las ondas periódicas . . . . .	22
6.3.4. El caso especial de la onda cuadrada . . . . .	23
6.4. Las ondas electromagnéticas y la medicina . . . . .	24

6.5. Bacterias . . . . .	24
6.5.1. Ubicuidad de las bacterias y sus roles en la naturaleza . . . . .	25
6.5.2. Crecimiento bacteriano y factores que afectan o favorecen este crecimiento . . . . .	26
6.5.3. Principales bacterias patógenas y las infecciones que causan . . . . .	27
6.5.4. Bacteria <i>E. coli</i> . . . . .	29
6.5.5. Métodos de cultivo bacteriano . . . . .	30
<b>7. Metodología . . . . .</b>	<b>33</b>
7.1. Selección de bacteria . . . . .	33
7.2. Cultivo de bacterias y medios para experimentación . . . . .	33
7.2.1. Creación del caldo nutritivo . . . . .	33
7.2.2. Preparación del agar . . . . .	34
7.2.3. Preparación de agua peptonada . . . . .	34
7.3. Esterilización de los componentes . . . . .	35
7.4. Método de aplicación de pulsos . . . . .	36
<b>8. Resultados . . . . .</b>	<b>41</b>
8.1. Resultados de la primera ronda . . . . .	41
8.2. Resultados de la segunda ronda . . . . .	42
8.3. Resultados de la tercera ronda . . . . .	42
8.4. Resultados de la cuarta ronda . . . . .	43
8.5. Resultados de la quinta ronda . . . . .	43
8.6. Resultados de la sexta ronda . . . . .	43
8.7. Discusión de resultados . . . . .	44
8.7.1. Variaciones realizadas . . . . .	45
<b>9. Conclusiones . . . . .</b>	<b>49</b>
<b>10.Recomendaciones . . . . .</b>	<b>51</b>
<b>11.Bibliografía . . . . .</b>	<b>53</b>
<b>12.Anexos . . . . .</b>	<b>55</b>
12.1. Valores utilizados . . . . .	55
<b>13.Glosario . . . . .</b>	<b>73</b>

---

## Lista de figuras

---

1.	Tabla de frecuencias de bacterias . . . . .	4
2.	Resumen gráfico de su funcionamiento . . . . .	5
3.	Resultados presentados de la investigación de electro erradicación de <i>E. coli</i> usando PEF. Copyright Springer Science+Business Media Singapore 2016 . . . . .	5
4.	Generador de funciones estándar . . . . .	15
5.	Punta de generador de funciones . . . . .	16
6.	Panel frontal de un generador . . . . .	17
7.	Osciloscopio de 4 canales . . . . .	18
8.	Punta de osciloscopio . . . . .	20
9.	Cuadrada . . . . .	23
10.	Imagen de una bacteria . . . . .	25
11.	Gráfico del crecimiento bacterial . . . . .	26
12.	Imagen caldo nutritivo utilizado . . . . .	34
13.	Proceso en el que se calienta el agar . . . . .	35
14.	Agar utilizado . . . . .	36
15.	Agua peptonada utilizada . . . . .	36
16.	Agar, agua peptonada y caldo listos para utilizar . . . . .	37
17.	Contenedores para dilución . . . . .	37
18.	Caldo de cultivo con bacterias . . . . .	38
19.	Forma de colocación de los transmisores de la onda . . . . .	38
20.	Frecuencia inicial usada . . . . .	39
21.	Método de dilución . . . . .	39
22.	Esparcimiento de bacterias en agar . . . . .	40
23.	Oxidación de los catetos . . . . .	45
24.	Medio en portaobjetos . . . . .	46
25.	Método de pruebas final . . . . .	47
26.	Valores utilizados por litro del caldo . . . . .	55
27.	Valores utilizados por litro para el Agar . . . . .	56
28.	Valores utilizados por litro para el agua peptonada . . . . .	56
29.	Valores utilizados por litro para el agua peptonada . . . . .	57

30.	Imagen de los resultados de la primera ronda . . . . .	57
31.	Imagen de los resultados de la primera ronda . . . . .	58
32.	Imagen de los resultados de la primera ronda . . . . .	58
33.	Imagen de los resultados de la primera ronda . . . . .	59
34.	Imagen de los resultados de la primera ronda . . . . .	59
35.	Imagen de los resultados de la primera ronda . . . . .	60
36.	Imagen de los resultados de la primera ronda . . . . .	60
37.	Imagen de los resultados de la primera ronda . . . . .	61
38.	Imagen de los resultados de la segunda ronda . . . . .	61
39.	Imagen de los resultados de la segunda ronda . . . . .	62
40.	Imagen de los resultados de la segunda ronda . . . . .	62
41.	Imagen de los resultados de la segunda ronda . . . . .	63
42.	Imagen de los resultados de la segunda ronda . . . . .	63
43.	Imagen de los resultados de la segunda ronda . . . . .	64
44.	Imagen de los resultados de la segunda ronda . . . . .	64
45.	Imagen de los resultados de la segunda ronda . . . . .	65
46.	Imagen de los resultados de la tercera ronda . . . . .	65
47.	Imagen de los resultados de la tercera ronda . . . . .	65
48.	Imagen de los resultados de la tercera ronda . . . . .	66
49.	Imagen de los resultados de la tercera ronda . . . . .	66
50.	Imagen de los resultados de la tercera ronda . . . . .	66
51.	Imagen de los resultados de la tercera ronda . . . . .	67
52.	Imagen de los resultados de la tercera ronda . . . . .	67
53.	Imagen de los resultados de la tercera ronda . . . . .	67
54.	Imagen de las pruebas de la cuarta ronda . . . . .	68
55.	Imagen de los resultados de la quinta ronda . . . . .	68
56.	Imagen de los resultados de la quinta ronda . . . . .	68
57.	Imagen de los resultados de la sexta ronda . . . . .	69
58.	Imagen de los resultados de la sexta ronda . . . . .	69
59.	Imagen de los resultados de la sexta ronda . . . . .	70
60.	Imagen de los resultados de la sexta ronda . . . . .	70
61.	Imagen de los resultados de la sexta ronda . . . . .	71
62.	Imagen de los resultados de la sexta ronda . . . . .	71

---

Lista de cuadros

---

1.	Resultados primera ronda . . . . .	41
2.	Resultados segunda ronda . . . . .	42
3.	Resultados tercera ronda . . . . .	42
4.	Resultados cuarta ronda . . . . .	43
5.	Resultados quinta ronda . . . . .	43
6.	Resultados sexta ronda . . . . .	43



En la actualidad, las investigaciones con respecto a la eliminación de bacterias por medio de resonancia son relativamente nuevas y poco conocidas, por lo que hay bastante material para investigar en este campo. El propósito de esta investigación fue el poder comprobar la efectividad de la eliminación de bacterias por medio de pulsos eléctricos aplicados directamente.

Debido a la naturaleza teórica de esta investigación, fue necesario plantear bases viables a partir de artículos y trabajos de este tipo, la mayoría mostrando resultados por medio de radio frecuencia, la cual es utilizada para poder transmitir la onda con la frecuencia de resonancia.

Como primer objetivo se tuvo la decisión de hallar una bacteria con la que se pudiera trabajar. Esta debía ser bastante común, de bajo riesgo para evitar cualquier tipo de infección al momento de realizar el trabajo y que se hubieran realizado investigaciones previas con respecto a este microorganismo. La bacteria con la que se realizó esta investigación fue la *Escherichia Coli*, una bacteria que se mantiene comúnmente en los intestinos tanto de seres humanos, como de animales.

El primer paso fue el cultivo de la bacteria para trabajar para luego poder iniciar con los experimentos. Se realizó una amplia gama de experimentos, variando los siguientes factores:

- Tiempo
- Frecuencia
- Voltaje
- Corriente

La razón por la que se realizó esta cantidad de variaciones fue para poder observar posibles cambios que fuera notorios para el experimento.

Algunos problemas que no se tuvieron en cuenta fue la velocidad de oxidación del cobre al realizar los experimentos, por lo que se tuvo que restringir el tiempo para que se evitara

este problema en la investigación. Otro problema que se dio fue que en un momento de las experimentaciones se realizaron las pruebas y se le dio tiempo a las bacterias para que crecieran en el agar, pero debido a la poca densidad, al momento de la dilución no hubo suficiente para que estas pudieran crecer, por lo que se debió realizar nuevamente la experimentación.

Resonance is something very useful to perform a quite big number of things, but with the main objective of destroying. With that in mind, and applying practical knowledge, we can suppose that it can affect the same way to bacteria in this specific case. Doing this could prove to be beneficial to improving scientific research for further investigation in this specific field.

The research was performed in the Universidad del Valle de Guatemala, and its principal purpose was to investigate if the resonance could be applied to the bacteria in a more direct way, so it may not be necessary take account on the attenuation of the wave, like it is the case in radiofrequency. The way it was researched was by varying different factors that were inherent in a electrical wave, like voltage, current, time and frequency.



Resonancia es un evento que ocurre al momento en el que un cuerpo capaz de vibrar se somete a una fuerza externa de manera cíclica, con un tiempo que coincide con el período de vibración del cuerpo. En este trabajo se tiene como objetivo tomar ventaja de lo explicado anteriormente para poder aplicarlo a una bacteria y de esta manera poder comprobar si es posible destruirla.

Esta investigación tiene como objetivo poder observar si es posible la aplicación directa de ondas eléctricas, y con la frecuencia correcta, poder ser capaces de observar si las bacterias pueden resonar de esta manera. Además de la frecuencia de resonancia, se realizó la misma metodología con frecuencias diferentes para poder comprobar, de esa manera, posibles causas de muertes de bacterias diferentes a la frecuencia, como podría ser el voltaje mismo, o la temperatura.

Debido a anteriores investigaciones con radiofrecuencia, este trabajo está directamente dedicado a la comprobación de la misma base, pero aplicada con pulsos eléctricos para poder comprobar si es viable y en caso de ser viable, comprobar si es mejor, igual o de menos eficacia que la radiofrecuencia.

Debido a la variación que reportaba en los antecedentes, fue necesario realizar variaciones de las pruebas para poder comprobar de manera empírica resultados favorables. Se hicieron variaciones en tiempo de aplicación, voltaje máximo de la onda cuadrada, corriente y frecuencias diferentes.

La razón por la que se realizaron con frecuencias diferentes fue para poder descartar posibles eventos que no se esperaran. Los resultados presentados demuestran que las bacterias no fueron afectadas por ningún factor extra debido a que estas crecieron con normalidad.

La forma de comprobar la viabilidad de la bacteria fue por medio del crecimiento de un control, además de las muestras a las que se le aplicaron los pulsos eléctricos para de esta manera comparar su crecimiento. Además se realizaron varias iteraciones para poder obtener una media en los resultados, y de esta manera poder evitar un resultado único.



## 2.1. Radiofrecuencia

Un trabajo de este tipo, el cual ha sido poco explorado y por consiguiente no se ha dado a conocer de manera extensa a las personas depende de la información inicial que se pueda dar de pruebas realizadas anteriormente para dar una estructura a la investigación. Este campo ha sido investigado de varias maneras, con objetivos distintos y procedimientos que difieren en algunos puntos, pero la idea principal es alterar la viabilidad bacteriana por medio de impulsos que hagan que estos puedan resonar y, como consecuencia, ser destruidos. Los principales antecedentes son los que se presentan como resultados de las investigaciones del libro de la doctora Clark *The cure for all diseases* [1].

El tema de "bioelectronics", en cuyo tema se muestra la idea de que todo tipo de bacteria, virus, etc., presenta su propia frecuencia a la cual pueda resonar y dependiendo de la complejidad del organismo, este tendrá una mayor frecuencia, por lo que es posible, por medio de la generación de pulsos, llegar a interferir en los mismos.

La metodología utilizada por la doctora Clark se centra en la manera en la que se tratan las enfermedades por medio de diferentes métodos, entre ellos la idea que se presenta es el tratamiento por medio de pulsos eléctricos, aunque de una manera generalizada. La principal diferencia que se busca hacer este trabajo es la comprobación de la eliminación de bacterias por medio de la creación de un pulso eléctrico con su misma frecuencia para que estas resuenen, además de que el procedimiento no será aplicado en pacientes, sino que será comprobado por medio de la investigación con bacterias aisladas en placas de Petri con agar en un laboratorio.

En otro capítulo se nos presenta una tabla con las frecuencias conocidas de diferentes bacterias, lo que será bastante útil para la investigación ya que se facilita el saber la frecuencia requerida al momento de realizar la investigación.

Estos experimentos fueron diseñados inicialmente por el científico Royal Raymond Rife,

	Low Freq (KHz)	High Freq (KHz)	Use freq gen for 3 min @
Acetobacter aceti			
Adenovirus	393	393	393
Adenovirus (2nd range)	371.45	386.90	
Agrobacterium tumefaciens			
Alcaligenes faecalis			
Alpha streptococcus	369.75	385.4	380,375
Azobacter chroococcum			
Bacillus anthracis causes anthrax in cattle (tooth)	393.5	398.05	395,364,368
Bacillus anthracis (2nd range)	363.2	365.3	
Bacillus anthracis (3rd range)	359.4	370.5	
Bacillus anthracis spores	391.45	386.95	388
Bacillus cereus	373.65	375.85	374.5
Bacillus megaterium			
Bacillus sterothermophilus			
Bacillus subtilis spores			
Bacillus subtilis var. niger	371.85	387.1	385,380,375
Bacteria capsules (capsular strain)	416.05	418.75	417.5
Bacterial capsules	362.4	357.6	360
Bacteroides fragilis found with common roundworm Ascaris	324.3	325.0	325
Bacteroides fragilis (2nd range)	325.7	326.0	
Beta streptococcus (tooth)	380.6	387.4	385
Blepharisma	405.65	407.45	406.5
Bordetella pertussis "whooping cough" (tooth)	329.85	332.25	331
Borellia burgdorferi Lyme disease	378.95	382.0	380
Branhamella (Neisseria) catarrhalis (has hole at 398)	394.9	396.7	396
Brucella abortus			
Cabbage Black Rot			
Campylobacter fetus smear	365.3	370.6	368
Campylobacter pyloridis	352.0	357.2	355
Candida albicans (pure powder) common yeast	384.2	388.4	386
Caulobacter vibrioides			
Central spores (bacillus smear)	372.45	378.65	376
Chlamydia trachomatis	379.7	383.95	381
Clostridium acetobutylicum	382.8	391.15	389,384
Clostridium botulinum (tooth) causes food poisoning	361.0	364.55	362

Figura 1:  
Tabla de frecuencias de bacterias [1]

quien a inicios de los años 90 inició este tipo de investigaciones.

Bioelectrochemistry, Wolfgang [2] habla acerca de la electro-erradicación de la bacteria *Escherichia coli* por medio de circuitos cerrados que generan pulsos eléctricos, así como en diferentes experimentos como puede ser la investigación de Blanckaert [3]. En la Figura 2, se puede observar el planteamiento que se tiene con lo que se llama PEF, el cual se refiere a Pulse Electric Fields, como menciona Wolfgang, basándonos en la frecuencia necesaria para los PEF, estos pueden estar en el orden de los milisegundos o incluso los nanosegundos, dependiendo de la duración necesaria para afectar al organismo con el que esté experimentando.

Un PEF principalmente se define como un pulso único de alto voltaje que inhibe el crecimiento bacteriano. En la actualidad es el que es más comercialmente utilizado ya que presenta una alternativa de mantener los alimentos frescos en contraste con la pasteurización, la cual requiere altas temperaturas para ser efectiva, afectando no solamente a las bacterias

sino también a los valores nutricionales de los productos.

Ambos presentan el tratamiento de la bacteria *E. coli*, los cuales presentaron ser exitosos al realizar las pruebas sobre esta bacteria.

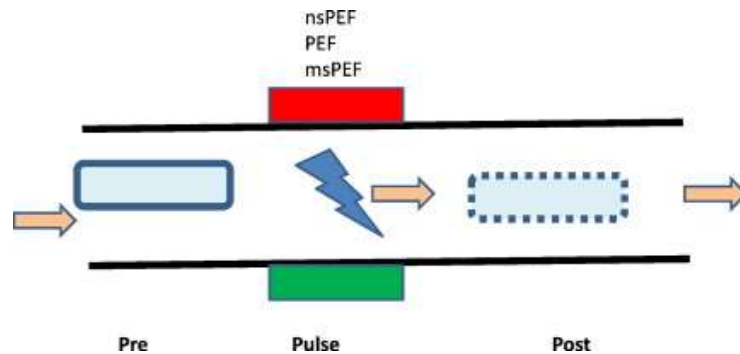


Figura 2: Resumen gráfico de su funcionamiento [2]

En la investigación se utilizaron pulsos unipolares y pseudo bipolares para comprobar la manera más eficiente de mantener el crecimiento bacteriano bajo. En el caso de esta investigación se utilizaron pulsos unipolares únicamente, pues estos son los que han probado tener más éxito con los tratamientos anteriormente mencionados.

El resultado que se mostró fue que la emisión de este campo permitió la desactivación de la bacteria *E. Coli*.

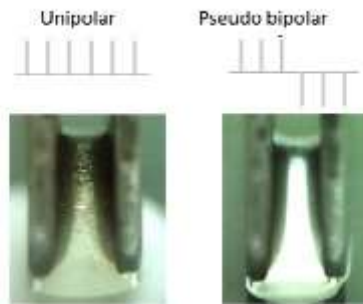


Fig.1 Interfacial reactions at the electrodes due to PEF. Under the unipolar condition, 500 successive pulses were delivered. Under the « bipolar » condition, the polarity was inverted after 250 pulses and then a new train of 250 pulses was delivered. Conditions were: conductivity 1 mS/cm, 7.5 kV/cm, 5  $\mu$ s, 1kHz. Electrochemical reactions (bubbles formation) are only detected under the unipolar condition.

Figura 3: Resultados presentados de la investigación de electro erradicación de *E. coli* usando PEF. Copyright Springer Science+Business Media Singapore 2016. [3]

En ambos casos, la principal diferencia a mostrar es el hecho de que se utiliza un campo eléctrico para la generación de pulsos, cosa que difiere de lo que se desea realizar en esta investigación y aún a pesar de eso el principio de la aplicación es el mismo pues se desea eliminar las bacterias por medio de pulsos eléctricos.

Otro ejemplo que se puede presentar puede ser el de Grahl [4] el cual nos muestra otro uso para este tipo de tecnología.

En esta investigación se plantea como problema principal el momento del almacenamiento de la comida por medio de la pasteurización o por un medio más moderno de este tipo, como lo puede ser la Ultra High Temperature, para los cuales el procedimiento consiste en la eliminación de las bacterias de diferentes alimentos, además de su almacenamiento a largo plazo por medio de un tratamiento con altas temperaturas. El problema de este tipo de proceso es principalmente la desnaturalización de las proteínas, destrucción de las vitaminas y la destrucción del sabor del producto [4], por lo que era necesario un nuevo proceso para que los alimentos mantuvieran su sabor teniendo en cuenta la seguridad de la salud de las personas al momento de consumirlas. Otro punto que se quería comprobar era poder garantizar la levadura en algunos alimentos, pues es vital que estos no se vean afectados por el tratamiento.

El proceso que se presenta en la investigación es el uso de pulsaciones de campos eléctricos para la eliminación de las bacterias mismas de los alimentos. Este proceso mostró ser altamente efectivo, pues se determinó que la pulsación necesaria para eliminar cada organismo indeseado variaba dependiendo de su tipo.

“For each cell type, a specific critical electric field strength ( $E_c$ ) and a specific critical treatment time ( $t_c$ ) were determined. Above these critical values, the fractions of surviving cells were reduced drastically” [4].

Además de que se comprobó la efectividad de la eliminación de los mismos, punto que es el que nos interesa para esta investigación, se pudo observar que no hubo pérdida por parte del sabor de los alimentos, y de las levaduras, los cuales no debían ser afectados y resultaron sin daños, por lo que se comprobó que este tratamiento resulta ser mejor que los procesos normales de pasteurización, ya que rinde los mismos resultados de reducción de carga bacteriana pero sin ser un proceso no térmico, por lo que no afecta de ninguna manera los alimentos y sus nutrientes.

“In addition to the inactivation of microorganisms, the effect of PEF on food components such as whey proteins, enzymes and vitamins, and on the taste of foodstuffs was studied. The degree of destruction of these food components by PEF was very low or negligible. Moreover, no significant deterioration of the taste of foodstuffs was detected after PEF treatment. Disintegration of cells by PEF treatment in order to harvest intracellular products was also studied. Yeast cells, suspended in buffer solution, were not disintegrated by electric pulses. Hence, PEF treatment is an excellent process for inactivation of microorganisms in acid and in thermosensitive media, but not for complete disintegration of microbial cells.” [4].

Por último, la investigación del doctor Holland, quien ha realizado experimentos con una máquina patentada por el científico Royal Raymond Rife a principios del siglo XX ha permitido la investigación de nuevos métodos para el tratamiento de células cancerígenas utilizando la resonancia. La forma en la que esto funciona es por medio de la creación de pulsos electromagnéticos utilizando un generador de frecuencia conectado a un tubo con un gas noble en el. Lo que sucede cuando hay una diferencia de voltaje es que en el gas se empezará a formar plasma, el cual actúa como conductor para la electricidad, y derivado del mismo es la creación de un campo electromagnético, el cual se utilizó para transmitir la

frecuencia de resonancia de las células. [5]

Como se puede observar, varios experimentos han sido realizados, la principal diferencia es la metodología, pues estos usaban campos eléctricos, los cuales, como se mencionó anteriormente son un pulso único de alto voltaje con un determinado tiempo. Además de otros antecedentes como puede ser la investigación de la doctora Clark [1] y del científico Raymond Rife. A partir de esto podemos decir que es posible la comprobación de esta teoría, pues de lo que se depende principalmente es de la frecuencia emitida por parte de los pulsos eléctricos, siendo este el punto principal a tratar, se puede deducir que la investigación y la capacidad de obtener resultados positivos en esta investigación es alta.



Conforme el ser humano se ha desarrollado, se han encontrado diferentes maneras para tratar las enfermedades. Unas técnicas eran más eficaces que otras, pero lo que siempre prevalecía era la comprobación empírica para observar el desarrollo de los pacientes conforme el tiempo pasaba. Cuando el ser humano logró dedicarse más tiempo a la investigación de las enfermedades, este logró darse cuenta de que muchas de estas dolencias eran causadas por microorganismos invisibles al ojo humano, pero letales una vez dentro del mismo, y desde entonces ha sido una constante batalla para poder desarrollar mejores técnicas y tratamientos para el ser humano basándose en su condición actual.

El objetivo de la medicina siempre ha sido mejorar la forma de tratar dolencias humanas y su principal causa. A partir de ello y por medio de la investigación, el ser humano ha sido capaz de desarrollar nuevas ramas de investigación para cada tipo de problema. Una de estas ramas es la microbiología, la cual es encargada principalmente del análisis y comprensión de la manera de reproducción, desarrollo y alimentación de diferentes microorganismos, siendo una parte vital para la comprensión de los mismos y poder obtener nuevas formas de tratar con ellos.

El propósito de esta investigación es el poder expandir un campo que no es altamente conocido, pero que puede ser parte integral en el tratamiento de las personas cuando estas tengan una dolencia causada por un microorganismo. A partir de esa idea, es necesario poder comprobar de manera científica los mejores métodos de tratamiento con esta nueva técnica, por lo que también es necesario comprobar su viabilidad de una manera más directa y más económica.



#### 4.1. Objetivo general

Realizar pruebas que nos permitan confirmar si el aplicar pulsos eléctricos a las bacterias puede afectar su viabilidad.

#### 4.2. Objetivos específicos

- Seleccionar una bacteria con la cual trabajar, de bajo nivel de peligrosidad, que pueda sobrevivir en un ambiente controlado para su observación y tratamiento.
- Lograr crear un ambiente en un medio líquido, el cual posea poca resistividad para que la onda eléctrica sea aplicable y que se pueda comprobar la cantidad de bacterias real.
- Confirmar que, al aplicar un pulso con la frecuencia de resonancia del organismo, este es destruido.



El objetivo de este trabajo fue el de poder confirmar de la mejor manera si el aplicar los pulsos de manera directa resulta en una mejora en este tipo de tratamiento contra bacterias, además de observar cual es la mejor forma de aplicarlo. Principalmente este trabajo busca obtener la mayor cantidad de datos posible para que futuras investigaciones puedan ser realizadas con un antecedente como puede ser este.

El alcance de este trabajo es el de observar el crecimiento de las bacterias con respecto a la aplicación de los pulsos en contraste al control, variando diferentes parámetros de los pulsos, los cuales se presentan a continuación.

Se realizaron diferentes variaciones de este experimento, como:

- Tiempo
- Frecuencia
- Voltaje

Esto fue para observar si alguna de estas variables afectaba visiblemente el crecimiento bacteriano.

Lo primero que se hizo fue decidir la especie de bacteria con la que se trabajaría. En esta parte del trabajo fue necesario tomar en cuenta diferentes factores, como puede ser la viabilidad de la bacteria en un entorno observable, es decir, que la bacteria fuera capaz de poder reproducirse en los medios de control que se tenían. Otro punto importante fue el de elegir una bacteria que fuera lo suficientemente común para que esta no fuera difícil de encontrar o de tratar. Además de lo anterior, también fue necesario pensar en una bacteria con la que no fuera demasiado peligroso trabajar.

Basándonos en todos los puntos anteriores, se optó por la investigación con la *Escherichia coli*, una bacteria que habita en el intestino tanto de seres humanos, como de animales.

El siguiente paso fue el de realizar las pruebas correspondientes. El alcance de este trabajo consta principalmente en la aplicación de los pulsos con la frecuencia correcta para poder observar el comportamiento de las bacterias. Como parte de esta investigación, también fue necesario tener muestras de control con las que fuera posible comparar al momento de observar los resultados de cada prueba.

## 6.1. Generador de funciones

Un generador de funciones es un dispositivo que permite la creación de cualquier tipo de onda eléctrica. Las ondas que es capaz de generar son sinusoidales, cuadradas y ondas triangulares. En estas ondas, existe una onda que puede ser nombrada adicionalmente, a pesar de ser una variación de la triangular, la cual es la onda de diente de sierra. Este puede tener un rango de frecuencias generadas desde 0.2 Hz, hasta un máximo de 10 Megahertz, dependiendo del modelo.[6]

Además de esto, tiene algunas funciones extras que pueden ayudar a controlar de una mejor manera estas ondas, las cuales pueden ser el aumento o decremento de la posición en el eje y de la onda por medio de un offset, el cual al estar activado permite la adición de un valor de una constante a la fórmula de la onda, causando un desfase en el eje. Este eje está representado físicamente con una constante en el valor de corriente directa de la misma. Este valor no puede ser menor a cero.

Además, algunos modelos de generadores de funciones más nuevos son capaces de realizar modulación de ondas, lo cual resulta altamente útil para trabajar con radiofrecuencias y entender su funcionamiento.



Figura 4:  
Generador de funciones estándar [6]

Con respecto a los generadores, existen diferentes modelos, algunos pueden ser análogos, como se muestra en la Figura 4 o pueden ser digitales. En todos los generadores viene incluida al menos una punta con puntas lagarto modelo CC-21 como se muestra en la Figura 5, por la cual se puede generar la onda y simplemente realizar la conexión necesaria para lo que se usará.



Figura 5:  
Punta de generador de funciones

Un defecto evidente de los generadores de funciones es que estos no son capaces de proveer una alta corriente, ya que estos están diseñados principalmente a proveer la función deseada. Otro problema, es que estos a altas frecuencias tienden a variar, esto se debe principalmente a que en altas frecuencias los controles, al ser mecánicos se vuelven altamente sensibles, por lo que cualquier tipo de movimiento les afecta.

### 6.1.1. Panel frontal

El panel frontal de un generador de funciones consta de una pantalla ubicada en la parte izquierda, como se muestra en la Figura 6. Esta muestra la frecuencia actual y gracias a los leds que posee en la parte izquierda de la pantalla, se puede observar también si este valor se encuentra en el orden de los hertz o kilohertz.

Además de la pantalla, este posee diferentes botones. El principal de estos es el de poder, con el cual se puede encender y apagar el generador. Justo a la derecha del botón de poder, se encuentran los botones con los que se puede elegir el orden de la frecuencia. Esto se hace



Figura 6:  
Panel frontal de un generador [6]

para que pueda ser más precisa la frecuencia en caso de que sea una frecuencia baja. Estos pueden ser colocados para que se pueda trabajar desde menos de 1 Hz, hasta un máximo de 10 MHz, dependiendo del modelo.

Debajo de los botones de frecuencias, se encuentran otros botones con los que se puede activar el DC offset, que es el valor de corriente directa que se comentó anteriormente que puede ser agregado. Este valor puede ser activado o desactivado, dependiendo de las necesidades de la persona al presionar el primer botón de la segunda fila, de izquierda a derecha. Además del offset, se puede colocar el ciclo de trabajo de la onda, el cual es útil principalmente para ondas cuadradas, cuando no se desea que esta posea la mitad de período positivo y la otra mitad negativo.

En la parte derecha del panel se pueden encontrar tres botones más, los cuales, dependiendo de cual esté presionado, la onda variará en su forma, como se comentó anteriormente, las tres posibles ondas que se pueden generar pueden ser cuadradas, triangulares o sinusoidales.

Además de estos botones, posee controles que permiten la selección de la frecuencia mejor. Existen dos de estos controles, y se encuentran en la parte de abajo de la pantalla con el nombre de fine y coarse. Coarse es el control que permite colocar la frecuencia más rápidamente, mientras que fine permite un control preciso cuando se encuentra cercano a la frecuencia deseada.

Otro control que se puede encontrar en el generador es el que tiene el nombre de output level. Este control sirve para manipular la amplitud de la onda. En términos eléctricos, se refiere al voltaje máximo y mínimo que tendrá la onda.

El generador de funciones posee además tres diferentes salidas, las cuales dependen de un cable para que pueda transmitir la onda o para recibir una señal externa, principalmente utilizado para poder realizar modulaciones de ondas. La salida referida es la que posee el nombre de output.

## 6.2. Osciloscopio

Un osciloscopio es un aparato utilizado principalmente para poder observar los cambios en las ondas eléctricas conforme al tiempo. Este aparato es imprescindible, pues permite

observar el comportamiento de cualquier onda en diferentes puntos en base a una referencia. Otros aparatos, como pueden ser los multímetros, únicamente permiten la lectura de una forma que se puede analizar si es constante. Si la lectura requiere el análisis en forma que se pueda analizar varias etapas el comportamiento de la onda, es necesario tener un instrumento como el osciloscopio.

La manera en la que el osciloscopio presenta las lecturas es por medio de una función con el eje x representado como el tiempo, mientras que el eje y presenta normalmente el voltaje actual de la onda en ese momento, por lo que es mucho más fácil poder observar su comportamiento de esa manera. Dependiendo del tipo, los osciloscopios son capaces de graficar desde dos a 4 funciones, dependiendo de la capacidad de canales. El ancho de banda que puede analizar un osciloscopio es de 200 MHz, pero puede variar en el modelo, marca, año, etc.

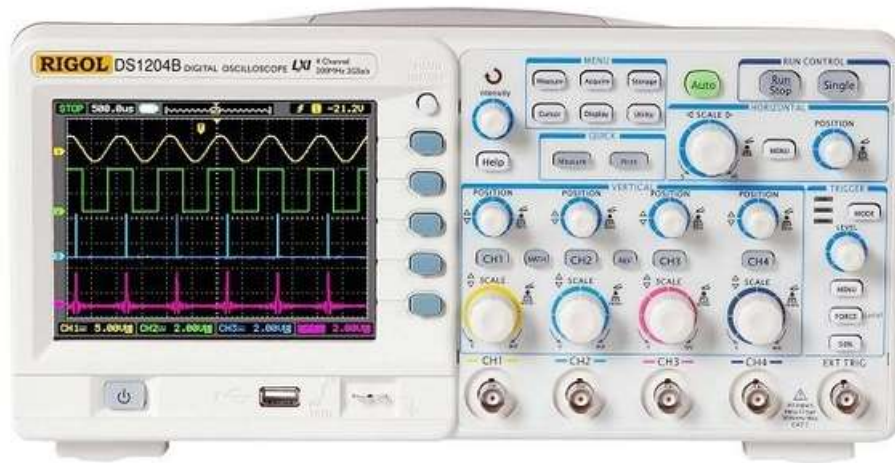


Figura 7:  
Osciloscopio de 4 canales [7]

Otras funcionalidades de un osciloscopio incluyen la ampliación de los ejes tanto el eje x como el eje y, para de esa manera poder observar de mejor manera señales de poca amplitud. Otra funcionalidad que se presenta es el poder obtener diferentes señales al mismo tiempo y, dependiendo de si estas tienen una referencia común, se pueden realizar comparaciones si es lo que se desea. Muchos osciloscopios poseen la capacidad de realizar barridos de frecuencias, para de esa manera analizar diferentes elementos de ciertas ondas; esto resulta especialmente útil cuando se desean analizar armónicos en las frecuencias, ya que este presenta una manera visible de poder entenderlos.

Los osciloscopios también son usualmente utilizados para diferentes tipos de investigaciones, además de desarrollo de diferentes proyectos que incluyan algún tipo de circuitería, pues es vital la información que se pueden obtener de los diferentes puntos del mismo que se pueden obtener gracias al osciloscopio. También es usualmente utilizado para la correcta calibración de los generadores de funciones analógicas, pues estos no poseen ningún tipo de indicador aparte de la frecuencia en la que se encuentra.

Además de la gráfica a tiempo real de la función, el osciloscopio es capaz de mostrar diferentes datos de las frecuencias, dependiendo de lo que la persona desee. Estos valores, entre otros pueden ser:

- Voltaje mínimo
- Voltaje máximo
- Voltaje medio
- Frecuencia
- Voltaje pico-pico
- Duty cycle
- Voltaje rms

Entre otros.

### 6.2.1. Controles del osciloscopio

Entre los principales controles, se encuentra el botón de encendido y apagado, el cual dependiendo del tipo de osciloscopio, este puede encontrarse en la parte superior del mismo, o al frente como se muestra en la Figura 7. Como se mencionó anteriormente, dependiendo del tipo de osciloscopio, este puede tener de 2 a 4 canales. Un canal es lo que se encarga de tomar la medición específica de cierta señal. No es posible colocar más de una señal eléctrica en un canal, además de que se debe tener una referencia a tierra, ya que estos al ser específicamente para medición, estos no tienen una referencia con la cual se pueda medir. Esto nos favorece, ya que nos permite tomar datos de otras señales en base a ondas que no sean cero.

Cada control tiene sus propios controles, para administrar mejor cada canal. Ya que es posible el manejo individual de cada canal, podemos elegir cuáles canales estarán en uso y cuáles no, lo cual es útil cuando no se desea saturar la pantalla con datos que no importan en ese momento. Cada canal puede modificar independientemente la amplitud con la que se observa la onda en la pantalla. Se debe tener en cuenta que estos valores de la onda son modificados únicamente de manera de análisis, la onda seguirá siendo de los mismos valores. Además de la modificación de su amplitud, el osciloscopio tiene la capacidad de modificar la cantidad de tiempo que se estará analizando, pero este factor modifica a todos los canales, a diferencia de la amplitud individual. Una última cosa que se puede modificar en cada canal es la posición en el eje y en el que se mostrará la onda para observar de manera separada cada onda, como se muestra en la Figura 7.

Además de los canales, el osciloscopio posee la capacidad de mostrar en la pantalla diferentes valores de las ondas que están siendo analizadas. La posición en la que se muestren dependerá del modelo del oscilo.

Una función especial del osciloscopio es que este es capaz de captar las gráficas y guardarlas como imágenes, lo cual es conveniente ya que para varios reportes e investigaciones es necesario mostrar los resultados obtenidos del mismo.

Otra función del osciloscopio, dependiendo del tipo, es que puede colocar la onda que está siendo analizada de la mejor forma para que sea observable, esta función es llamada auto-adjust.

Los canales de osciloscopio utilizan puntas de osciloscopio especiales para funcionar como entradas para cada canal. Estos normalmente constan de una punta de lagarto que se coloca en la referencia a la que se trabaje y de un pico, el cual puede colocarse en una salida con un gancho donde se desee medir o con la punta misma.

Estas puntas son capaces de medir un ancho de banda de 250 MHz, además de tener una atenuación de X1 y X10, dependiendo de la onda que se desea analizar. Es necesario tener cuidado con esto ya que si no se tienen los mismos valores en el osciloscopio y en la punta, puede ser que la onda no se vea.



Figura 8:  
Punta de osciloscopio [8]

## 6.3. Ondas eléctricas

### 6.3.1. Ley de Gauss

El flujo eléctrico que pasa a través de cualquier superficie cerrada es igual a la carga total encerrada por esa superficie [9].

Suponiendo que se posee una distribución de cargas puntuales rodeada por una superficie cerrada de cualquier tipo de forma. Si la carga total es  $Q$ , por lo que pasarán  $Q$  coulombs

de flujo a través de la superficie cerrada. En todos los puntos de la superficie se tendrá un vector de flujo eléctrico  $D$  con valor  $D_s$ , el cual variará en magnitud y dirección, dependiendo del punto de la superficie en la cual se mida.

Considerando un punto pequeño de la superficie  $\Delta S$ , se puede llegar a aproximar a una superficie plana si se da el tamaño correcto, que es lo que estamos suponiendo. A esta pequeña porción se le debe dar un carácter vectorial, pues este varía según la parte de la superficie del que se obtenga. Por supuesto, visto desde ese punto, en el plano se puede considerar como normal la salida perpendicular de la superficie.

Por supuesto,  $\Delta S$  debe poseer un valor vectorial, y la única que se le puede asociar es en base a la normal de la tangente de la superficie en la que esta se encuentra. A partir de un punto  $P$  que se encuentra en la superficie  $\Delta S$ , se puede generar un ángulo  $\theta$  para que el flujo  $D$  que recorra ese punto es el producto de la componente normal de  $D_s$  y  $\Delta S$ :

$$\Delta\psi = \text{flujo que atraviesa } \Delta S = D_s * \Delta S$$

Luego, el flujo total se puede obtener de la sumatoria de todas las superficies del objeto.

$$\Psi = \int d\Psi = \oint D_s * dS [9]$$

### 6.3.2. Fundamentos de los fenómenos periódicos

Alrededor nuestro existen un sinnúmero de fenómenos que se repiten de una manera constante. Aparentan ser parte integral del universo en que vivimos, el Universo Físico. El cual consiste de cinco elementos: Materia, Energía, Espacio, Tiempo y Longitud de Onda. De sus siglas, de los primeros cuatro elementos, en inglés: MEST y la letra griega lambda ( $\lambda$ ) para la longitud de onda. De esta última, como situación intrínseca se tiene la frecuencia:

- $f = c/\lambda$  en donde
- $f$  está en Hertz (revoluciones por segundo)
- $c$  es la velocidad de la luz.  $3 \times 10^8$  metros/segundo y
- $\lambda$  está en metros, y
- $\omega = 2\pi f$   $\omega$ : velocidad angular en radianes por segundo

Estos cinco elementos son los que definen a cualquier objeto dentro del universo físico. Desde un punto de vista puramente físico los cuerpos de los seres vivos también se les puede identificar por estos elementos.

Aproximadamente en la década de los años 20 del siglo pasado se comenzó a hacer estudios respecto a las frecuencias características de algunas especies de gusanos, hongos, bacterias y virus con el fin de encontrar elementos comunes que nos pudieran llevar a alguna comprensión de este tema y así ver si se podía hacer algo al respecto.

En otros campos, ajenos al campo médico como el de la construcción, este tema permaneció sin mucho interés hasta que en el año 1943, en la ciudad de Takoma, Estado de

Washington, EE.UU., un puente entonces recién construido, durante una ventisca, el puente comenzó a balancearse cada vez más hasta que se destruyó. [10] Con el conocimiento de estructuras que se tenía al tiempo, la situación no era explicable. Al hacer un estudio más profundo se encontró, primero, que todas las estructuras tienen una frecuencia intrínseca que se le puede calcular a partir de los parámetros de construcción; segundo, que las ventiscas también tiene su propia frecuencia de vibración; y, tercero, que si estas frecuencias coinciden se produce un fenómeno que se llama sintonía. Este fenómeno hizo que el puente cada vez vibrara más ampliamente hasta que su estructura cedió y se derrumbó. Hoy día, como parte del diseño de las estructuras de construcción, se tiene que encontrar la frecuencia de las mismas y evitar en lo posible y práctico que estas coincidan con las frecuencias de los vientos y de los terremotos comunes en el área en que se construya.

Otro ejemplo común que hemos tenido en nuestros alrededores respecto a la sintonía es el uso de la radio. La estación transmisora tiene una frecuencia asignada y el receptor tiene un generador de onda interno al que se le puede ajustar la frecuencia. Cuando estas dos frecuencias coinciden se sintoniza la estación de radio que nosotros queremos oír. Además, en el cuadrante de cualquier radio existen una buena cantidad de emisoras distintas a las cuales las identificamos por su respectiva frecuencia.

Otra ventaja de este fenómeno es que la onda solo funciona, o ataca, en el caso médico, al objeto que esté en sintonía —en la misma frecuencia— y no le hace nada a ninguna otra cosa que tenga frecuencia distinta.

### 6.3.3. Modelos matemáticos de las ondas periódicas

Dentro de la física y la ingeniería a las ondas periódicas se les suele representar mediante funciones senoidales y similares. Esto debido a que toda onda periódica tiene que cumplir con que  $f(t) = f(t + T)$  en donde  $T$ : período dado en segundos.

Esto en lenguaje normal es que el valor de la función tiene que ser igual al valor de la función un período después, y así sucesivamente.

Tanto la onda senoidal como cualquier otra de las ondas que se deriven de las funciones trigonométricas básicas, todas cumplen con el requisito anterior, de que el valor de la función vuelve a ser el mismo luego de que haya pasado un periodo. También, como la función seno es la más usual quizás por ser la primera en la lista de las funciones ésta es la que se tiende a usar con mayor frecuencia. La función es la siguiente:

$f(t) = V \text{sen}(\omega t + \theta)$  en donde  $V$  = es el voltaje máximo, al que se le llama amplitud, en voltios  $\theta$  es el ángulo de fase (el corrimiento respecto al eje  $x$  en el gráfico).

Por otro lado, el matemático y físico francés Jean Baptiste Fourier (1758-1830), mientras estudiaba los fenómenos de transferencia de calor (en 1822 las aplicaciones eléctricas eran muy escasas), demostró que las funciones periódicas arbitrarias se les podía representar mediante series infinitas de sinusoides con frecuencias relacionadas de manera armónica. Armónico en este caso quiere decir que sus frecuencias son:

Si  $\omega$  (omega minúscula) es la frecuencia básica (en radianes por segundo), entonces las armónicas son:  $2\omega, 3\omega, 4\omega$  y así sucesivamente. A esto en música se les llama octavas

superiores; porque también es cierto si decimos  $\omega/2, \omega/3, \omega/4$  etcétera, que son la armónicas u octavas inferiores. De otra manera, si tenemos la serie: DO, RE, MI, FA, SOL, LA, SI, DO, el último DO está una armónica u octava arriba que el primer DO, a la inversa, el primer DO es una armónica u octava inferior al segundo DO. Lo mismo es válido con cualquiera de las otras notas.

Otro de los descubrimientos de Fourier fue que las ondas para que funcionen bien entre sí, tienen que ser armónicas; de otra manera, se destruyen entre sí. Esto resulta muy útil en el campo de la música. Una nota que no sea armónica al resto de ondas en un grado mayor o menor destruye el cuadro completo.

### 6.3.4. El caso especial de la onda cuadrada

Nos resulta conveniente el estudio de esta onda debido a que es la que comúnmente se le ha utilizado más, entre otras razones, porque es la que resulta más fácil de generar, ya que en casi cualquier venta de electrónicos está a disposición el integrado 555 con el que se puede armar generadores de onda cuadrada a un precio muy asequible. O que cualquier generador de onda normal también la puede producir. El modelo matemático de la onda cuadrada, debido a que ya es una onda compleja (que no es simplemente senoidal), se le tiene que dar en términos de la siguiente serie de Fourier:  $v(t) = 4V/\pi(\cos\omega t - 1/3\cos3\omega t + 1/5\cos5\omega t - 1/7\cos7\omega t + \dots)$  que tiene la siguiente gráfica :

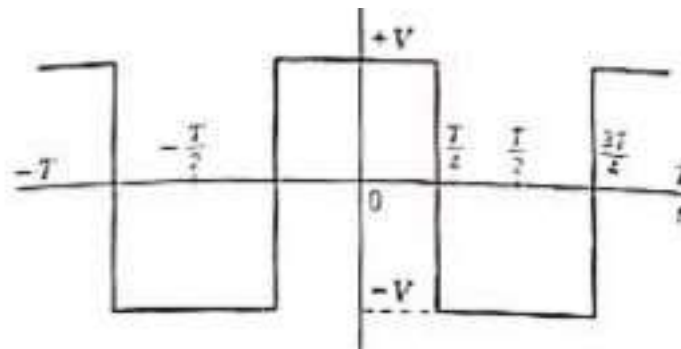


Fig. 15-5. A square or rectangular wave of amplitude  $V$  and period  $T = 2\pi/\omega_p$ .

Figura 9:

Imagen de una gráfica cuadrada obtenida del libro Network Analysis, publicado en 1964 [11]

La utilidad del modelo anterior es que nos demuestra que esta onda, adicionalmente a la onda de frecuencia básica ( $\omega$ ) se tienen armónicas superiores ( $3\omega, 5\omega, 7\omega$ , etc., que en este caso son las armónicas impares) que también funcionan para una mejor destrucción del parásito.

## 6.4. Las ondas electromagnéticas y la medicina

En el campo médico no ha sido sino hasta las postrimerías del siglo recién pasado que el fenómeno anterior se le encontró utilidad. En todos los microorganismos citados se encontró que tenían frecuencias específicas para cada una de las especies. Luego, se les aplicó ondas electromagnéticas respectivas de esas frecuencias y el resultado fue que en su frecuencia particular el microorganismo moría. En otras palabras, la bacteria y el generador de ondas entraban en sintonía; la célula bacteriana comienza a oscilar cada vez más hasta que se le destruye. Más adelante, especialmente en Europa, ha habido investigadores que han estudiado y encontrado las frecuencias, de los microorganismos más comunes en el campo de la medicina y los han publicado para que con este conocimiento se pueda atacar y erradicar a estos agentes contrarios a la vida de seres vivos como nosotros, los seres humanos.

Este sistema de manejo de seres vivos contrarios a la supervivencia humana es muy distinto a los sistemas que en la actualidad se les está utilizando, como es el caso de los antibióticos. Estos últimos, en la actualidad, ya es muy evidente que tienen sus restricciones, siendo la principal que las bacterias se han comenzado a volver resistentes a los antibióticos. La solución práctica momentánea que se asumido es crear antibióticos cada vez más potentes, pero ya se está llegando al límite y ya se tiene en el horizonte la amenaza de llegar a un punto en que se cree más de alguna bacteria para el cual ya no haya antibiótico que funcione.

El sistema de ondas electromagnéticas, en apariencia, no tiene el problema de que las bacterias puedan crear resistencia, o que, el peor de los casos, tarden más tiempo en crearla. Hasta el momento, con lo que se sabe de los fenómenos electromagnéticos periódicos, que por ser la frecuencia un parámetro intrínseco, ésta tiende a ser un parámetro que le permanece a la bacteria durante toda su vida. Y, hasta el momento, no se ha encontrado el fenómeno de corrimiento de frecuencia (o de su respectiva longitud de onda) en los seres vivos. Además, si en caso sí llegara a existir el corrimiento de frecuencia, sería muy fácil de detectarlo y de encontrar la nueva frecuencia para ahí atacar. Para esto se podrían construir aparatos que hicieran este seguimiento y corrección en tiempos muy cortos, posiblemente en orden de los microsegundos o algo así.

## 6.5. Bacterias

Las bacterias son microorganismos que presentan diferentes tipos de formas, como pueden ser los cocos, bacilos, etc. Las bacterias son células procariotas, lo que significa que estas no poseen un núcleo, ni organelos delimitados por membranas como pasa con las eucariotas. Una célula procariota normalmente posee ADN libre en el citoplasma, a diferencia de las eucariotas, las cuales poseen el ADN en un núcleo. Las bacterias utilizan diversos mecanismos para moverse, entre ellos, los flagelos son estructuras de las que depende el movimiento de varias especies.

Las bacterias son de los organismos de mayor diversidad, además de presentar gran cantidad en comparación con otros seres. Estas pueden crecer en diferentes tipos de ambientes, los cuales pueden llegar a ser de los más extremos y esto es lo que ha logrado crear tal diversidad entre estas.

Muchas de estas no han sido documentadas, debido a que, a pesar de ser altamente resistentes a algunos ambientes, es poco probable que estas puedan ser cultivadas en laboratorios, por lo que gran parte de estas es aún desconocida.

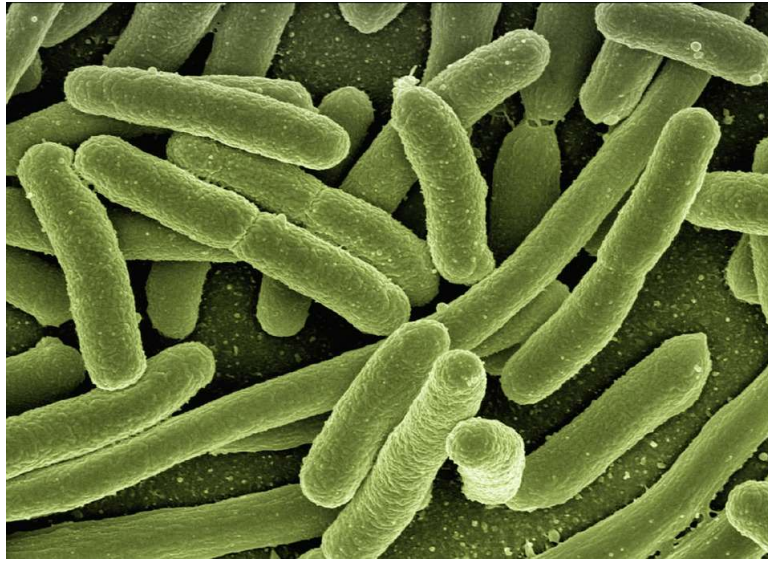


Figura 10:  
Imagen de una bacteria

Se sabe que en el cuerpo humano existe una relación de 10 a 1 de bacterias comparadas con células bacterianas de las cuales muchas de estas resultan inofensivas para el cuerpo. Otras de estas bacterias son capaces de perjudicar el cuerpo humano de diferentes maneras, dependiendo del lugar donde se encuentra y el método de reproducción de la misma.

### 6.5.1. Ubicuidad de las bacterias y sus roles en la naturaleza

La definición oficial de ubicuidad es el hecho de encontrarse en todos lados, o en este caso, de ser bastante común. Como su definición lo explica, las bacterias se pueden encontrar en cualquier lugar de nuestra vida diaria, debido a que estos organismos se pueden reproducir rápidamente y los métodos que estas poseen para propagarse les permite desarrollarse en diferentes lugares. Uno de esos medios de transporte es el ser humano mismo, además de que este posee un ambiente en el cual bastantes tipos de bacterias pueden prosperar, por lo que es propenso a que las bacterias se puedan reproducir en su interior. Algunas veces este aumento de bacterias no afecta de manera directa al ser humano, otras veces pueden crear una relación simbiótica, y el último caso es que la bacteria sea dañina para el ser vivo que habita.

El ciclo de crecimiento de las bacterias, como se mencionó anteriormente, depende principalmente de la cantidad de recursos que la bacteria pueda tener para que sea viable su reproducción, ya que los recursos que estas necesitan son recursos que pueden ser encontrados en diferentes lugares, además de que los métodos de transporte de las mismas son variados, les permite un desarrollo de las bacterias en cualquier sitio.

Un perfecto ejemplo de estas es la *E. coli*. Esta bacteria normalmente vive en el intestino

del ganado vacuno, pero es capaz de propagarse por medio de las heces de estos animales, lo cual normalmente no afectaría al ser humano, pero hay casos en los que las vacas se convierten en alimento para el ser humano y puede ser que en algunas partes de la carne vacuna aún se conserven cepas de esa bacteria, la cual al no ser cocinada correctamente, alguna de sus variantes patógenas puede entrar al intestino humano e infectarlo. Además de la carne, esta bacteria puede hallarse en verduras, debido a que las heces normalmente se pueden utilizar como abono, por lo que también es necesaria su correcta preparación.

No es únicamente esta bacteria, sino muchas otras las que pueden causar daños al ser humano y otros seres vivos y debido a eso, esta y otras formas de infección es lo que hacen que las bacterias sean realmente peligrosas, pues pueden ser halladas en lugares poco comunes.

### 6.5.2. Crecimiento bacteriano y factores que afectan o favorecen este crecimiento

El crecimiento bacteriano está definido por el proceso de fisión binaria, la cual es la manera en la que las bacterias se dividen para formar dos copias exactamente iguales. Este proceso se define por los siguientes pasos.

Inicialmente, cuando la bacteria entra en un nuevo ambiente, esta entra en la fase de adaptación, en la cual la mayoría de las bacterias no son aptas para la reproducción. Adicionalmente, estas deben, como su nombre lo dice adaptarse a sus condiciones de crecimiento en el ambiente en el que se encuentran.

La siguiente fase es el crecimiento exponencial, en el cual las bacterias ya se adaptaron a su ambiente e inician su reproducción. Esta etapa es la de mayor crecimiento y se le conoce como crecimiento exponencial debido a que la cantidad de bacterias nuevas será dependiente del número actual de bacterias, duplicándose infinitamente o hasta que los nutrientes ya no puedan sostener el crecimiento de las mismas. Como un dato, en la gráfica de la Figura 11, se muestra un crecimiento lineal, esto no se debe a que sea así, sino que se gráfica de manera logarítmica, y debido a que es un crecimiento exponencial, esta se representará como una línea.

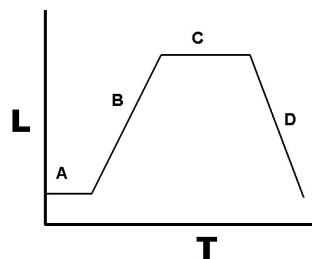


Figura 11:  
Gráfico del crecimiento bacteriano

Cuando la cantidad de nutrientes no es suficiente para mantener vivas a todas las bacterias, estas entran en la tercera fase, fase estacionaria, la cual es conocida porque la cantidad de bacterias se mantiene constante. Esto se debe a que la tasa de muerte de las bacterias igualó al del crecimiento de nuevas bacterias, mostrando de esta manera que el ciclo final está por llegar.

La última fase es en la que debido a la ausencia de alimento, las bacterias existentes empiezan a morir, lo cual en la gráfica se ve representado por una caída lineal constante.

El tiempo de vida de las bacterias depende completamente de la cantidad de nutrientes que estas puedan obtener, mientras mayor sea, mayor será el tiempo que estas puedan seguir multiplicándose. Como se mencionó anteriormente, la única razón por la que las bacterias pueden seguir reproduciéndose es debido a que algunas de estas lograron desplazarse a una nueva locación, donde el ciclo inicia nuevamente. Cuando una bacteria es erradicada, se puede decir que sus métodos de transmisión no fueron útiles para la misma y su entorno.

### 6.5.3. Principales bacterias patógenas y las infecciones que causan

Debido a la basta variedad de tipos de bacterias existentes, además de que algunas pueden ser inofensivas para el ser humano y otras incluso útiles para el mismo, algunas otras, aunque no sean demasiadas, pueden perjudicar al ser humano de diferentes maneras, ya sea segregando sustancias que resultan tóxicas para el cuerpo o por diferentes formas de interacción de la bacteria misma con el cuerpo.

Unos ejemplos de las mismas pueden ser las variantes patógenas de la *E. coli*, la cual, como se comentó anteriormente, puede ser la principal causante de problemas estomacales, diarrea, etc. Otra bacteria bastante conocida es *Mycobacterium tuberculosis*, la cual, como su nombre lo indica es la causante de la tuberculosis en los seres humanos, una enfermedad respiratoria que puede causar incluso la muerte del paciente.

Las anteriores bacterias, además de otras como se comentó se consideran infecciosas junto con las que a continuación se mostrarán.

- *Campylobacter*
- *Clostridium*
- *Legionella*
- *Listeria*
- *Salmonella*
- *Staphylococcus*
- *STEC* o *E. coli productora de toxina Shiga*, *VTEC* o *E. coli productora verotoxina*, *EHEC* o *E. coli enterohemorrágica*
- *Vibrio*

#### *Campylobacter*

Es conocida por ser la causa de varios problemas causantes de diarrea, además de problemas más serios como por ejemplo la enteritis, la cual es una inflamación del intestino delgado. Originalmente este tipo de bacterias era encontrada únicamente en animales, pero

logró su avance a los seres humanos como huéspedes por medio de los animales domésticos y de granja. Como cualquier bacteria, debido a su alta capacidad de adaptación, estas bacterias no necesitan más de 500 en el cuerpo del ser humano para que estas logren infectarlo. Unos casos comunes de esta especie es *C. coli* y *C. jejuni*. [12]

### ***Clostridium***

Este género se compone de bacterias Gram positivo y se caracterizan por la generación de esporas, por lo que es posible que se encuentren en casi cualquier lugar. Normalmente tienden a contaminar a los alimentos que no se conservan en ambientes lo suficientemente fríos, además de que es capaz de soportar altas temperaturas, por lo que es difícil eliminarlos de comidas, incluso si estas han sido previamente calentadas. [12]

### ***Legionella***

*Legionella*, a diferencia de *Clostridium*, es una bacteria Gram negativo y se caracteriza por poseer forma de bacilos. Normalmente se pueden encontrar en fuentes de agua y es conocida por causar la enfermedad del legionario, una enfermedad que es un tipo de neumonía. [12]

### ***Listeria***

Normalmente este tipo de bacterias también puede ser encontrado en diferentes tipos de alimentos. Tiene forma de bacilo y es bastante resistente a diferentes entornos, por lo que su capacidad de infección de diferentes seres humanos es bastante alta.

### ***Salmonella***

La *Salmonella* es la principal causante de la mayoría de casos de intoxicación alimentaria en todo el mundo. Normalmente se puede encontrar en alimentos de origen animal crudos, como puede ser el ejemplo de la leche, carnes huevos y productos derivados de la leche. Esta es otra bacteria que posee alta mortalidad. [12]

### ***Staphylococcus***

Estas bacterias, como su nombre lo indica, poseen forma de cocos, y a diferencia de los anteriores, estas bacterias normalmente se encuentran en la piel y fosas nasales de los seres humanos y en un ser humano con suficientes defensas no representa ningún problema, el problema es cuando esta logra infectar a seres humanos con inmunodeficiencia o en algunos casos que se infecten con cepas patógenas. En estos últimos casos, las bacterias son capaces de crear enfermedades mortales como lo es la neumonía.

Debido a que esta bacteria se encuentra normalmente en los seres humanos, su única forma de contagio es por medio del contacto de la persona infectada a alimentos o por

medio de un estornudo. [12]

### ***E. coli productora de toxina Shiga, E. coli productora verotoxina y E. coli enterohemorrágica***

Estas bacterias son cepas patógenas de la *E. coli*, la cual normalmente se encuentra en la microbiota intestinal. Estas cepas son infecciosas y pueden causar infecciones estomacales graves.

Estas cepas normalmente se pueden encontrar en productos lácteos caducados o no pasteurizados o en carne cruda. [12]

### ***Vibrio***

Este tipo de bacterias necesita concentraciones elevadas de sal para sobrevivir. Normalmente se encuentra en fuentes de agua, principalmente mares, y su forma de transmisión al ser humano es por medio de la ingesta de productos marinos, tales como los mariscos.

Una de las principales enfermedades que puede causar es la diarrea. [12]

#### **6.5.4. Bacteria *E. coli***

Como se comentó anteriormente, *E. coli* es una bacteria que normalmente se encuentra en la microbiota bacteriana de los cuerpos humanos, pero algunas cepas de la misma son patógenas para el cuerpo. Algunas de estas cepas puede causar síntomas como por ejemplo vómitos, cólicos e incluso diarrea con sangre.

Normalmente, estas cepas pueden introducirse al cuerpo humano por medio de la ingesta de alimentos contaminados, por lo que es necesario procesar correctamente la comida. Además de los productos animales crudos, como se mencionó antes, debido al estiércol, es muy probable que en algunos vegetales, donde este se utilizó como abono, estos puedan venir infectados de las cepas.

En los casos de infección por alguna de las cepas, es probable que los niños y ancianos puedan presentar mayores complicaciones en comparación con los jóvenes y adultos de mediana edad. [13]

En el caso de las cepas, se pueden encontrar diferentes tipos, cada uno causante de una enfermedad distintiva, algunos ejemplos pueden ser la *Escherichia coli* entropatogénica, la cual no produce ningún tipo de toxina pero se le conoce por adherirse al tracto intestinal de los seres humanos, causando grandes daños y lesiones. Otro ejemplo puede ser la *Escherichia coli* enterotoxigénica. Este tipo de bacteria produce dos tipos de toxinas, resistente al calor y otra termolábil.

### 6.5.5. Métodos de cultivo bacteriano

Para hablar de los métodos de cultivo, es imprescindible comentar los factores que le afectan a las bacterias para su reproducción, estas son:

- temperatura
- pH
- concentración de oxígeno

#### Temperatura

Toda célula posee un rango de temperatura, en el cual este puede reproducirse sin ningún problema, en casos de que la temperatura no sea idónea, el ciclo de reproducción cambiará, por lo cual se verá una disminución de la actividad celular. Es necesario tomar en cuenta el rango en el que las bacterias pueden reproducirse a su total capacidad al momento del cultivo, ya que normalmente se desea que se reproduzcan hasta cierto punto, ya que de permitirles continuar, estas seguirán hasta que no hayan más alimentos.

En el caso en el que ya no se desee continuar con el crecimiento de las mismas, estas son colocadas en temperaturas altamente bajas en los laboratorios, inhibiendo de esta manera el crecimiento de las mismas hasta que las pruebas se hayan realizado y analizado.

#### pH

Un pH correcto es crucial al momento del cultivo bacteriano, pues estas son altamente susceptibles a estos cambios. El pH correcto depende de cada bacteria, y de variar demasiado, la bacteria no será capaz de iniciar su proceso.

#### Concentración de oxígeno

Normalmente, este es el único caso en el que no se debe variar demasiado dependiendo de la bacteria, pero si es necesario que exista una alta concentración del mismo si se desea que las bacterias puedan adaptarse al mismo.

Para el cultivo, existen principalmente dos técnicas diferentes, dependiendo de la elección para el cultivo, es la manera en la que las cepas crecerán. El objetivo final del mismo es que las bacterias se puedan dispersar correctamente en toda la placa de Petri o sitio en el que se estará experimentando y lo que variará mayormente es la concentración de las mismas.

El primer método es el de la siembra de estría en placa, un método en el cual se introduce una punta metálica previamente desinfectada al líquido donde se encuentran las bacterias. Seguidamente, se prosigue a rastrillar el agar con la punta metálica, esto permite que algunas de las bacterias queden atrapadas en la superficie. Se deben asegurar de que los patrones sean variados y que cubran la mayoría de la superficie.

El segundo método es el de vertido y extensión en placa. Básicamente, se vierte el líquido con las bacterias en el mismo, para luego con una paleta desechable se pueda esparcir en la placa, para que de esta manera toda la superficie quede cubierta del líquido.



### 7.1. Selección de bacteria

Para la selección de la bacteria, se tomaron en cuenta varios criterios, entre ellos que fuera fácil de obtener, que no se demasiado peligrosa y que fuera común. Se eligió *Escherichia coli* debido a que es bastante común en países con pocos niveles de higiene con respecto a la comida, su crecimiento es veloz, es una enfermedad que puede ser transmitida únicamente por ingestión y es utilizada ampliamente en los laboratorios de la Universidad del Valle, por lo que fue mucho más fácil trabajar con esta.

### 7.2. Cultivo de bacterias y medios para experimentación

En esta sección se comentarán los valores utilizados para cada una de las soluciones utilizadas. Se nombrarán tres soluciones indispensables que fueron parte del trabajo en todo momento. Uno de estos es el caldo de cultivo, necesario para el crecimiento inicial de la bacteria antes de iniciar pruebas. El siguiente fue el agua peptonada, la cual tiene la función de un caldo de cultivo y por último el agar, que es el medio en el que terminarán de crecer luego de haber realizado las pruebas correspondientes.

#### 7.2.1. Creación del caldo nutritivo

La manera de cultivo en este trabajo fue por medio de cultivo en un medio líquido, lo que significa que fue necesario crear un ambiente para que las bacterias pudieran reproducirse correctamente. Este proceso se realiza para poder tener bacterias para futuros experimen-

tos. Este procedimiento debía ser realizado constantemente ya que conforme al tiempo, las bacterias consumen todos los nutrientes y se inicia su proceso final en el que estas mueren en caso de no alcanzar un ambiente nuevo con nutrientes suficientes.

Para este fin, se preparó un caldo nutritivo del cual se usó 8 gramos por litro. En nuestro caso, que se utilizó 1.5 litros, fueron necesarios 12 gramos. Usualmente los caldos de cultivo están compuestos de pluripectona, la cual es una combinación de peptona de carne y caseína, la cual contiene gran cantidad de fosfato y de extracto de carne como fuente de carbono y nitrógeno.

El tipo de agua utilizada, fue agua desmineralizada, ya que todo lo que se necesitaría para el crecimiento de las bacterias estaba presente en el caldo.

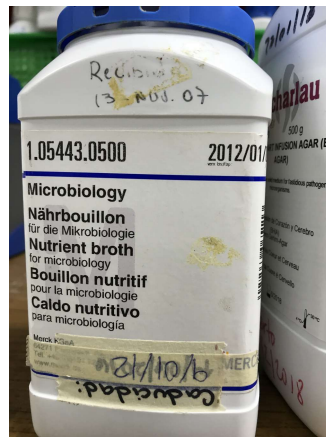


Figura 12:  
Imagen caldo nutritivo utilizado

### 7.2.2. Preparación del agar

Para la preparación del agar, se realizó el mismo procedimiento, luego fue necesario calentarlo para que iniciara el proceso de disolución en el agua desmineralizada. Luego, se debe pasar por el proceso de esterilización por autoclaveado, para luego pasar al último paso, el cual es la colocación en placa de Petri

El agar utilizado es el agar BHI, comúnmente conocido como agar Brain Heart Infusión, el cual permite el crecimiento no selectivo de cualquier bacteria. El agar es el medio colocado en placas de Petri en donde las bacterias reiniciarán su proceso de multiplicación luego de su fase estática causada por el cambio de lugar del medio líquido al agar. En este punto se dejarán a las bacterias crecer durante un tiempo definido.

### 7.2.3. Preparación de agua peptonada

El agua peptonada fue necesaria específicamente para realizar las diluciones de la bacteria luego de realizar las pruebas. La principal diferencia con el agua común es la gran cantidad de nutrientes que el agua peptonada posee. Una dilución es el proceso utilizado para reducir

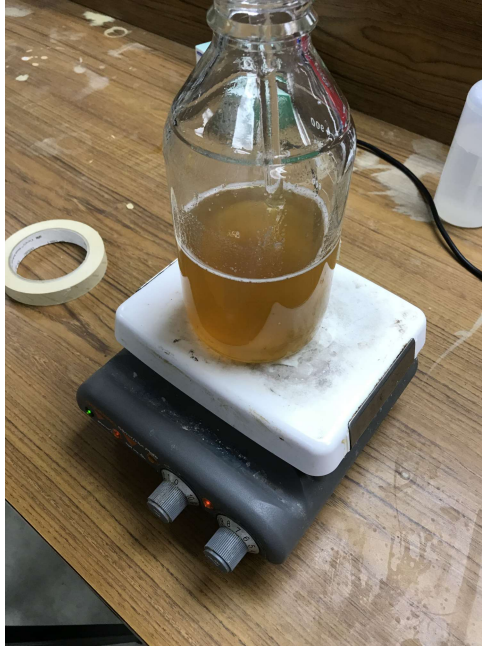


Figura 13:  
Proceso en el que se calienta el agar

la cuenta de bacterias en cierto ambiente, esto se hace para poder ser capaces de observar y contar las colonias luego de cultivarlas en el agar, ya que de no realizarse este procedimiento, sería imposible observar la cantidad de bacterias en el medio de cultivo.

### 7.3. Esterilización de los componentes

Para este tipo de experimentaciones, es necesario que todos los materiales sean primero esterilizados para de esta manera se pueda evitar cualquier tipo de contaminación por parte de bacterias que se encuentren previamente en los instrumentos. Este es un paso importante, pues cualquier tipo de interferencia externa, puede causar un sesgo en los resultados de las experimentaciones.

El primer paso para la esterilización fue el de mantener las bacterias en un medio sellado el cual era únicamente abierto para el momento en el que era necesario utilizar las bacterias. El método de uso era el de pasar la parte por donde se vierte encima del mechero para eliminar cualquier contaminación, luego obtener la cantidad deseada y, por último, volver a pasarlo por el mechero antes de sellarlo nuevamente.

Otros componentes que debían estar esterilizados eran los microtubos de 1.5 ml en lo que se realizaban las diluciones. Estos se esterilizaban juntos, para luego ser utilizados.

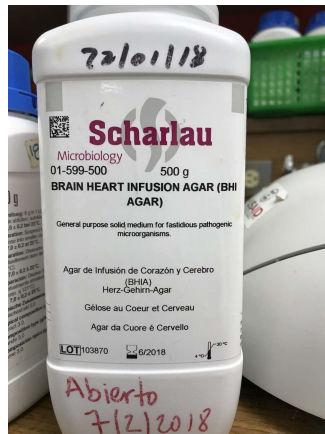


Figura 14:  
Agar BHI utilizado

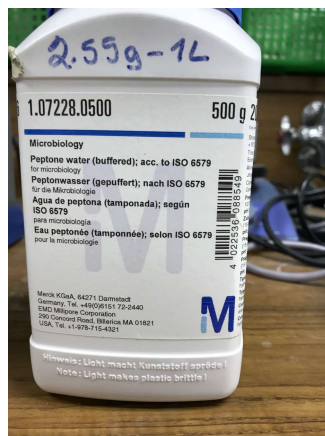


Figura 15:  
Agua peptonada utilizada

## 7.4. Método de aplicación de pulsos

Se inició obteniendo las bacterias del cultivo creado a partir del caldo de cultivo previamente preparado como se muestra en la Figura 18, de este se obtuvieron mil mililitros para cada prueba, los cuales fueron colocados en pequeños tubos en los cuales se realizaron las pruebas.

Para poder realizar los experimentos, fue necesario hacerlos de la manera más rápida posible, ya que el tiempo de duplicación de la bacteria es de veinte minutos, por lo cual el procedimiento debía ser realizado antes de ese tiempo. Esta primera restricción hizo cambios en la metodología inicial, donde se planeaba realizar las pruebas constantemente durante cinco, quince y treinta minutos, por lo que se cambió a únicamente cinco, diez y quince minutos.

La forma de aplicación de los pulsos fue por la colocación de un ánodo y un cátodo en el medio, para luego iniciar el proceso de dilución y terminar colocando las bacterias restantes



Figura 16:  
Agar, agua peptonada y caldo listos para utilizar



Figura 17:  
Microtubos de 1.5 ml para dilución

en el agar.

Basándonos en el marco teórico, la frecuencia necesaria para eliminar *E. coli* es de 393 Khz, y ya que no se hace mención específica de la corriente necesaria, al realizarse las pruebas se utilizó para el circuito únicamente una resistencia de 50 ohms. La corriente resultante fue de alrededor de 200 miliamperios. Más tarde se utilizará un barrido de frecuencia en el que se utilizaron 0.5 amperios, además, el tipo de onda usada en las pruebas fue de onda cuadrada.

Inicialmente se usó una frecuencia incorrecta para poder comprobar la viabilidad de las bacterias, es decir, poder observar que estas no se vieran afectadas por una causa que no sea la de la resonancia, como pudo haber sido la temperatura.

La frecuencia inicial se muestra en la Figura 20

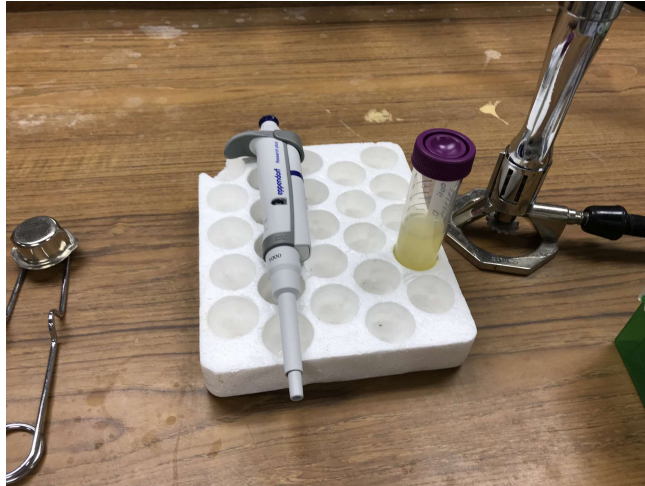


Figura 18:  
Caldo de cultivo con bacterias

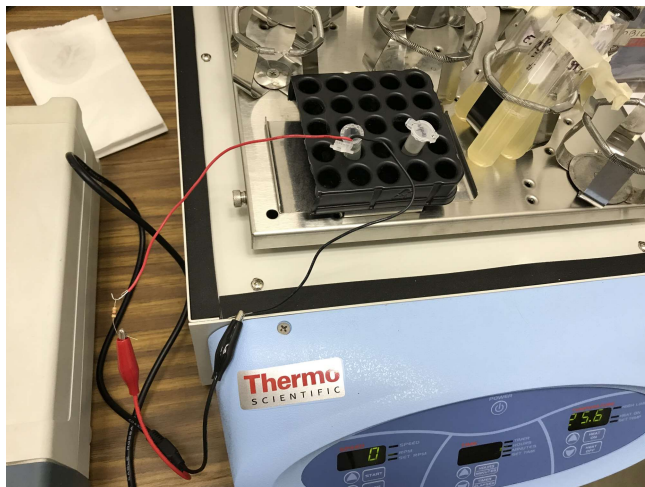


Figura 19:  
Forma de colocación de los transmisores de la onda

Luego de la aplicación de los pulsos, fue necesario realizar un proceso de dilución para que sea posible realizar un conteo de las bacterias mismas antes de ser colocadas en el agar, para que de esta manera estas puedan ser contadas luego de que se les permita crecer en el agar. El proceso consta de extraer una décima parte de la muestra inicial a la que se le aplicaron los pulsos, para que esta sea transferida a un recipiente con agua peptonada, la cual, como se mencionó anteriormente funciona únicamente como un ambiente en el que las bacterias pueden sobrevivir, pero no un tiempo prolongado debido a que este no posee los nutrientes necesarios.

Luego de realizar la primera transferencia, se sabe que se tiene una décima parte de las bacterias en este nuevo recipiente, por lo que la nueva mezcla está con una relación 1 a 10 de bacterias a comparación a como se encontraba la anterior. Esto significa que se hizo una dilución de  $10^{-1}$ .



Figura 20:  
Frecuencia inicial usada

Se realizaron seis diluciones para que de esta manera la concentración de bacterias no sea demasiado alta y se pueda hacer un conteo. Luego de que se llevaron a cabo las seis diluciones con la muestra a la que se le aplicaron los pulsos, se realizó el mismo procedimiento con una muestra a la que no se le haya hecho ninguna aplicación de pulsos, para que de esta manera se pueda tener un control con la misma cantidad de bacterias, y de esta manera evitar un sesgo en los resultados.



Figura 21:  
Método de dilución

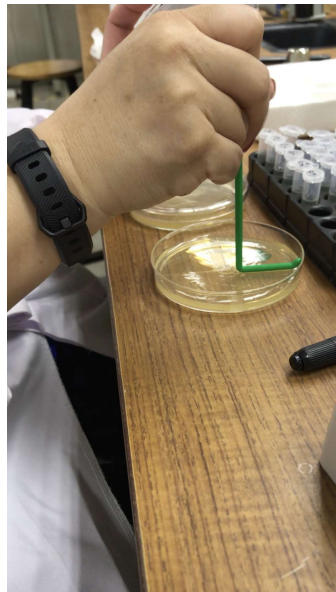


Figura 22:  
Esparcimiento de bacterias en agar

Para que una prueba sea considerada válida, es necesario realizar repeticiones de la misma para de esta forma poder tener una media de los resultados y que además no sea un resultado aislado.

Inicialmente, como se menciona anteriormente, se planteó la variación de diferentes parámetros, dando prioridad al tiempo y la frecuencia, pues era necesario poder comprobar que las bacterias eran eliminadas únicamente por la frecuencia y no por ninguna otra cosa. Debido a lo anterior, y ya que la cantidad de pruebas que se deseaban realizar era bastante amplia, se decidió iniciar con variaciones únicamente al tiempo e inicialmente utilizar la frecuencia de 20 para observar si había un cambio notorio en la cantidad de las bacterias. Dicho esto, a continuación se presentan los primeros resultados obtenidos de las pruebas en la siguiente tabla.

### 8.1. Resultados de la primera ronda

	5 minutos	10 minutos	15 minutos
356Khz	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios

Cuadro 1: Resultados de la primera ronda de experimentación. Resultados de observación de la cantidad de bacterias al ser comparadas con el control.

Como se puede observar en el Cuadro 1, debido a que los resultados obtenidos no presentaron una variación sustancial podemos indicar que no hubo ningún cambio en el crecimiento de las bacterias.

## 8.2. Resultados de la segunda ronda

En la siguiente ronda, como se menciona en los cambios realizados, se removieron los 15 minutos, y se quedó únicamente con 5 y 10 minutos, además se agregó el cambio a la amplitud de la onda, siendo de amplitud 5, 7 y 9 voltios pico a pico.

A continuación se presentan los resultados de la siguiente ronda, siempre con los 356 Khz.

	5 minutos	10 minutos	15 minutos
5 V pk-pk	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
7 V pk-pk	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
9 V pk-pk	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios

Cuadro 2: Resultados de la segunda ronda de experimentación. Resultados de observación de la cantidad de bacterias al ser comparadas con el control.

Como se puede observar, nuevamente no se notaron cambios significativos al comparar las muestras que habían sido sometidas a los pulsos con las muestras de control, esto nos indica que no ha habido influencia en la reproducción de las bacterias, incluso al recibir pulsos eléctricos.

## 8.3. Resultados de la tercera ronda

Una vez probado de que no había ningún cambio sustancial en la reproducción de las bacterias al aplicarle un pulso eléctrico, fue momento de iniciar nuevamente las pruebas con la frecuencia que, según los antecedentes era la correcta.

Inicialmente, como fue realizado anteriormente con la primera ronda, se llevaron a cabo las pruebas de la misma manera, únicamente variando el tiempo que se empleaba para cada caso.

A continuación se presentan los resultados.

	5 minutos	10 minutos	15 minutos
393Khz	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios

Cuadro 3: Resultados de la tercera ronda de experimentación. Resultados de observación de la cantidad de bacterias al ser comparadas con el control.

Nuevamente, los cambios observados fueron mínimos, por lo que no fue posible probar que los pulsos crearon un cambio sustancial en el crecimiento de las bacterias. Debido a estos resultados, se decidió continuar esta vez variando nuevamente la amplitud, como se realizó en la segunda ronda.

## 8.4. Resultados de la cuarta ronda

A continuación se presentan los datos respectivos de esta ronda.

	5 minutos	10 minutos	15 minutos
5 V pk-pk	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
7 V pk-pk	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
9 V pk-pk	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios

Cuadro 4: Resultados de la cuarta ronda de experimentación. Resultados de observación de la cantidad de bacterias al ser comparadas con el control.

## 8.5. Resultados de la quinta ronda

Resultados de la ronda.

	5 minutos	10 minutos	15 minutos
	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios

Cuadro 5: Resultados de la quinta ronda de experimentación. Resultados de observación de la cantidad de bacterias al ser comparadas con el control.

Nuevamente, no hubo cambios que sean interesantes en esta ronda.

## 8.6. Resultados de la sexta ronda

Nuevamente se presentan los datos respectivos de esta ronda, en este caso únicamente se varió la frecuencia usada, en la ronda anterior se usó los 356 KHz, mientras que en esta se utilizaron los 393 KHz.

	5 minutos	10 minutos	15 minutos
	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios

Cuadro 6: Resultados de la quinta ronda de experimentación. Resultados de observación de la cantidad de bacterias al ser comparadas con el control.

Una vez más, no se pudo observar un cambio aparente en el crecimiento de las bacterias.

El último experimento que se realizó, fue el de realizar un barrido de frecuencia desde 300 Khz hasta 400 Khz usando un microcontrolador. La forma en la que se programó fue que este estaría aumentando la frecuencia que está aplicando por 10 KHz cada minuto, para aplicar al final los 400 Khz y su corriente media sería de 0.5 A.

Los resultados de este último experimento es que no hubo cambios significativos en la comparación del crecimiento.

## 8.7. Discusión de resultados

Primero, cabe mencionar que, de ser posible, se debió haber reducido el número de variables por la parte electrónica para evitar la cantidad de pruebas que fueron necesarias ya que el tiempo necesario para realizar todas las pruebas fue demasiado.

En la ronda cuatro, como se comentó anteriormente, hubo algunos cambios en la manera en la que se realizaban los experimentos, principalmente debido a que se deseaba que el sistema fuera lo más homogéneo posible. En este momento, fue cuando se cambió al modelo de 100 mililitros, como se puede observar en la Figura 25.

Para este momento, debido a que se cambió el modelo en el que se aplicaban los pulsos se decidió realizar nuevamente las pruebas, iniciando nuevamente con únicamente los cambios a los tiempos.

Es necesario remarcar que debido al tiempo y la cantidad de pruebas que fue necesaria, solo se realizaron cambios al tiempo, no a los voltajes.

El último modelo con el que se realizaron los experimentos fue el más efectivo con respecto al tiempo que tomaba realizar los experimentos por lo que se recomienda permanecer con el mismo, solo tomar en cuenta que es necesario esparcir las bacterias luego de que los pulsos fueron aplicados.

El objetivo principal de esta investigación fue el de comprobar la viabilidad bacteriana al ser expuestas a pulsos eléctricos, y este objetivo se deriva del planteamiento inicial de observar si esta metodología, contrastada con las otras tecnologías como pueden ser los resultados de experimentos con PEF [3] o incluso la investigación del doctor Anthony Holland [5], el cual también es mencionado en la sección de antecedentes, era más viable o incluso más efectiva que las anteriores. Debido a los resultados, podemos afirmar que esta metodología planteada no es la correcta para este tipo de aplicación de pulsos en las bacterias, por lo que se recomienda para futuras investigaciones plantear el uso de radiofrecuencia, el cual ha probado tener mejores resultados en este tipo de investigaciones, esto puede ser debido a que la propagación de la onda que posee la frecuencia de resonancia es mucho más uniforme en un campo electromagnético que en un pulso eléctrico.

Con respecto a las limitantes de esta investigación, como se mencionó anteriormente, uno de los principales limitantes fue el tiempo, causando un cambio en el total de pruebas realizadas.

Por el lado de futuras investigaciones, se puede considerar recomendable encontrar una forma de hallar de manera independiente las frecuencias detectables de las bacterias que se están investigando, para de esta manera poder no depender de investigaciones pasadas, sino completamente de sus propios resultados.

Un cambio que podría ser de utilidad sería cambiar el tipo de conductor utilizado, para

de esa manera poder realizar más tiempo la experimentación o realizar los cambios sin tener que estar cambiando constantemente los cables. En caso de que se cambie, se debe tomar en cuenta que estos deben ser desechados, por lo que deberían ser de un bajo precio. Otro punto que se debe resaltar es que el cobre es anti-bacteriano, por lo que no puede albergar ningún tipo de contaminación externa, lo cual lo hacía perfecto para esta prueba.

### 8.7.1. Variaciones realizadas

Las diferentes pruebas realizadas fueron hechas con la base primordial de la metodología, pero con algunas variaciones que resultaron como producto de lo que aparecía en los resultados de los cultivos, por lo que en esta parte se discutirán estas variaciones y el razonamiento realizado para estos.

La primera variación realizada es conforme al tiempo. La razón de esta primera variación fue debido a que la oxidación de los catodos luego de los diez minutos era demasiado rápida, por lo que se debieron variar los tiempos. Inicialmente se tenían tiempos de 5, 15 y 30 minutos para poder observar si el tiempo realizaba algún tipo de cambio. Debido a lo anteriormente mencionado, fue necesario cambiar a tiempos de 5, 10 y 15 minutos para evitar esto.



Figura 23:  
Oxidación de los catodos

Como se puede observar en la Figura 23, el medio líquido se tornaba de un color azul, y esto se debía a la oxidación generada por el cobre.

La siguiente variación realizada fue el cambio en donde se realizaban los pulsos, debido a que inicialmente era demasiado difícil la colocación de los cables en el medio. Otra razón por la que se cambió era por la posibilidad de que el medio no sea completamente homogéneo, por lo que no se podía concluir que la electricidad se comportara de igual manera en todo el medio. La forma en la que se realizó el cambio fue variando la cantidad volumétrica del medio al que se le aplicaba la onda, razón por la que se cambió de un contenedor con 1000 mililitros del medio a 100 mililitros colocados en la superficie de un portaobjetos, previamente esterilizado por supuesto para evitar cualquier tipo de contaminación externa en la muestra.

Lo que se hizo luego de la aplicación de los pulsos en la muestra, fue la colocación de la misma en medios con agua peptonada, como se realizó anteriormente, para continuar con el mismo proceso anterior.



Figura 24:  
Medio en portaobjetos

En este caso, al ser demasiado difícil poder obtener completamente las bacterias del portaobjetos fue necesario realizar cambios en este sistema.

El siguiente cambio realizado fue hecho nuevamente según lo sucedido en la prueba anterior. El nuevo cambio consistió en la colocación de 100 mililitros de la sustancia con las bacterias, pero esta vez realizar este paso luego de realizar la dilución y colocarlo en la placa petri con el agar, para de esta forma esparcir inmediatamente el medio en el agar como se muestra en la Figura 25. Este fue el procedimiento con el que se trabajaron las pruebas finales.

Además del sitio, se realizó un último cambio al tiempo, pues debido a la cantidad de pruebas necesarias y la oxidación que seguía siendo problema en los quince minutos este tiempo fue removido para terminar con únicamente cinco y diez minutos.

Un cambio final que se presentó, fue la de realizar pruebas adicionales en el offset de la onda, según el libro de la doctora Hulda Clark [1], los pulsos aplicados a las bacterias deben oscilar en un rango positivo constantemente, por lo que los experimentos iniciales fueron hechos de esa manera, pero para observar si esto afectaba de alguna manera, se removió el offset de las ondas al final para realizar una última ronda de experimentos.

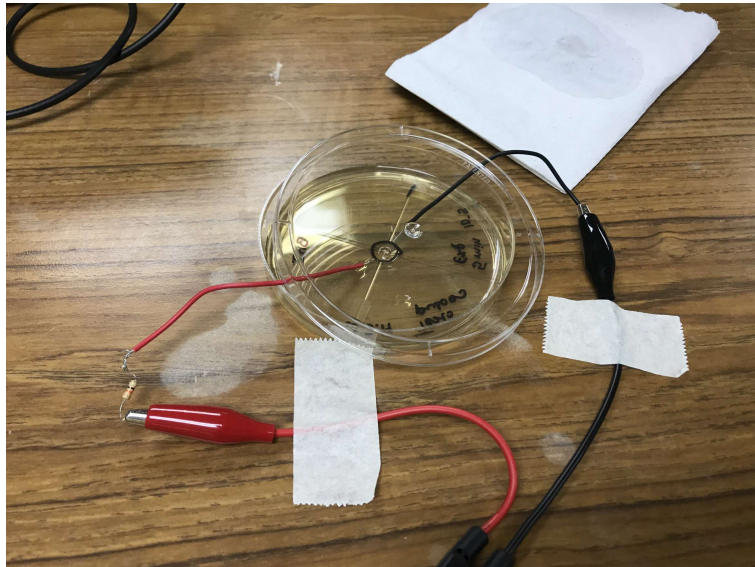


Figura 25:  
Método de pruebas final



---

### Conclusiones

---

Luego de las pruebas realizadas, se obtuvieron las siguientes conclusiones basados en los resultados de las mismas.

- Debido a que no se notó ningún cambio sustancial en los resultados podemos afirmar que las bacterias no se vieron afectadas por los pulsos eléctricos, por lo que se puede decir que la metodología utilizada no es funcional para eliminar bacterias, ya sea porque la frecuencia aplicada no fue la correcta o no fue lo suficientemente exacta o debido a que el método de pulsos eléctricos no es el correcto para que fuera efectiva la resonancia en las bacterias.

-El tipo de bacteria elegida resultó ser la correcta ya que fue posible realizar las pruebas sin ningún tipo de atraso causado por problemas con la misma.

- Para este tipo de experimentos es necesario realizar varias series de pruebas, cada una con su respectivo control para asegurar que los resultados no se debieron a algún error o problema externo.

- La seguridad y limpieza de todo el equipo fue un factor importante debido a que se estaba experimentando con bacterias, por lo que es completamente necesario tener en cuenta en todo momento al realizar este tipo de experimentos la seguridad personal y la limpieza del ambiente en el que se está trabajando.

- A pesar de haber realizado un barrido de frecuencia, no fue posible encontrar un cambio significativo, por lo que es posible que las frecuencias requeridas sean más exactas de lo que se esperaba.

-Este mecanismo puede ser utilizado también como un método de limpieza y no solo de tratamiento para personas, cosa que se puede tomar en cuenta para futuras investigaciones.



---

### Recomendaciones

---

Según la metodología, los resultados y la experimentación en general, hay varias recomendaciones que se presentarán a continuación.

De ser posible, se debe desarrollar un método en el que se pueda detectar las frecuencias a las que resuenan las bacterias, ya sea por la detección del cambio en la amplitud de la onda al entrar en resonancia mientras se realiza el barrido, o algún otro método. La razón por la que se recomienda crear esto primeramente es debido a que de esta manera se puede asegurar que se está utilizando la frecuencia correcta, luego de ello se puede iniciar las pruebas nuevamente. Por supuesto, esto en sí puede ser tomado como una investigación completamente independiente de esta, pero en caso de poder diseñar dicho dispositivo se podrá realizar esta investigación no solamente con una bacteria en específico, sino con la que se desee experimentar.

Se recomienda, como se había mencionado en la discusión de los resultados poder disminuir los factores que se estarán variando, ya que mientras más factores entren en juego, mayor será el tiempo de investigación, por lo que se debe tomar en cuenta al momento de establecer el tiempo que se le asignará a las pruebas.

Otro tema a que deberá ser considerado para futuras ocasiones será el de tener en cuenta el conteo inicial de las bacterias, ya que en este caso se consideró que estas eran demasiadas incluso al inicio de la prueba.

De ser posible en siguientes pruebas considerar la microscopía electrónica para poder observar directamente el comportamiento de las bacterias al estar siendo afectadas por los pulsos eléctricos.



- 
- [1] H. R. Clark, *The Cure for All Diseases With Many Exclusive Case Histories*. New Century Press, 2016, ISBN: 1890035017.
  - [2] “Editorial Board”, *Bioelectrochemistry*, vol. 103, IFC, 2015, BIOELECTRICS 2013, ISSN: 1567-5394. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(15\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(15)00010-9). dirección: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539415000109>.
  - [3] V. Blanckaert, A. Salles, M. Thomas y J. Teissié, “Electroeradication of Escherichia Coli is Under the Control of the Conductance of the Pulsing Buffer”, *Springer, Singapore*, vol. vol 53. 2016. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-287-817-5\\_81](https://doi.org/10.1007/978-981-287-817-5_81).
  - [4] T. Grahl y H. Märkl, “Killing of microorganisms by pulsed electric fields”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530050663>.
  - [5] A. Holland. (2009). New Cancer Research Angle from a Surprising Source, Thomas Jefferson University, dirección: <https://jdc.jefferson.edu/jss/vol14/iss2/7>.
  - [6] (2019). B and K Precision 4017A Generador de Funciones de 10 MHz con Función de Barrido, Generador de Señales Analógico con Indicadores LEDs, Final test, dirección: <https://www.finaltest.com.mx/B-K-Precision-4017A-p/4017a.htm>. (accessed: 26.08.2019).
  - [7] (2019). Osciloscopio DS1204B, AD instruments, dirección: <http://www.adinstruments.es/Osciloscopio-DS1204B>. (accessed: 26.08.2019).
  - [8] (2019). B and K Precision PR250B Punta de prueba para Osciloscopio, 250 MHz 10x, Final test, dirección: <https://www.finaltest.com.mx/B-K-Precision-PR250B-p/pr250b.htm>. (accessed: 27.08.2019).
  - [9] W. Hayt Jr, *Teoría electromagnética*. McGraw-Hill, 2012, ISBN: 978-607-15-0783-9.
  - [10] B. Pathé. (2013). Tacoma bridge, dirección: [https://www.youtube.com/watch?v=XggxeuFDaDU&ab\\_channel=BritishPath%C3%A9](https://www.youtube.com/watch?v=XggxeuFDaDU&ab_channel=BritishPath%C3%A9). (accessed: 20.09.2020).
  - [11] M. V. Valkenburg, *Network Analysis*. Prentice Hall, 1964.
  - [12] (2020). Bacterias patógenas, r-biopharm, dirección: <https://food.r-biopharm.com/es/analitos/microbiologia/bacterias-patogenas/>. (accessed: 15.09.2020).

- [13] (2020). E. Coli, Mayo Clinic, Mayo Clinic, dirección: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058>. (accessed: 12.07.2020).

12.1. Valores utilizados

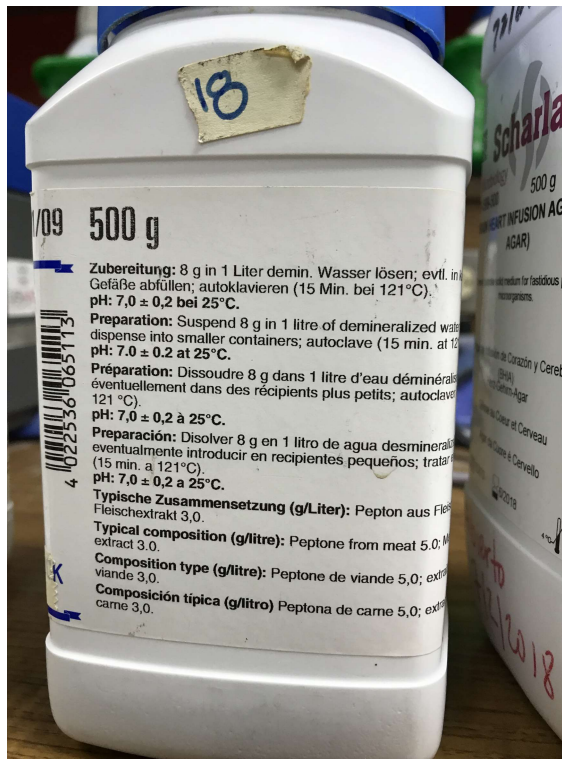


Figura 26:  
Valores utilizados por litro del caldo

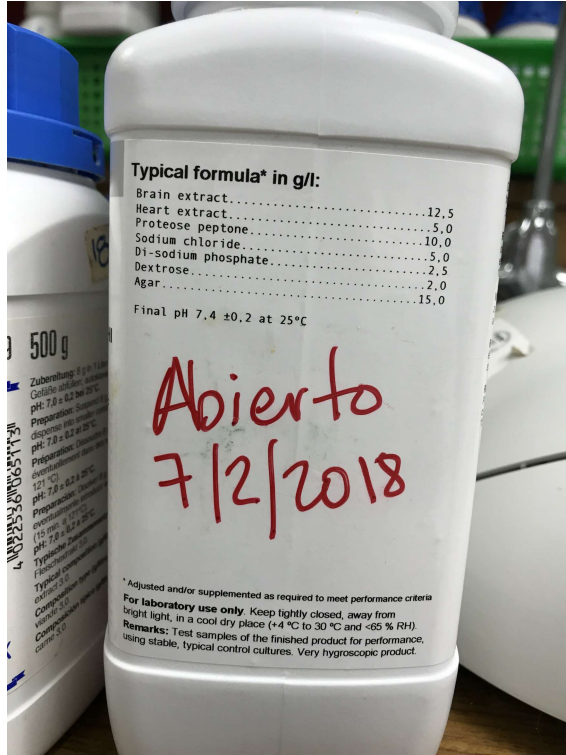


Figura 27:  
Valores utilizados por litro para el Agar

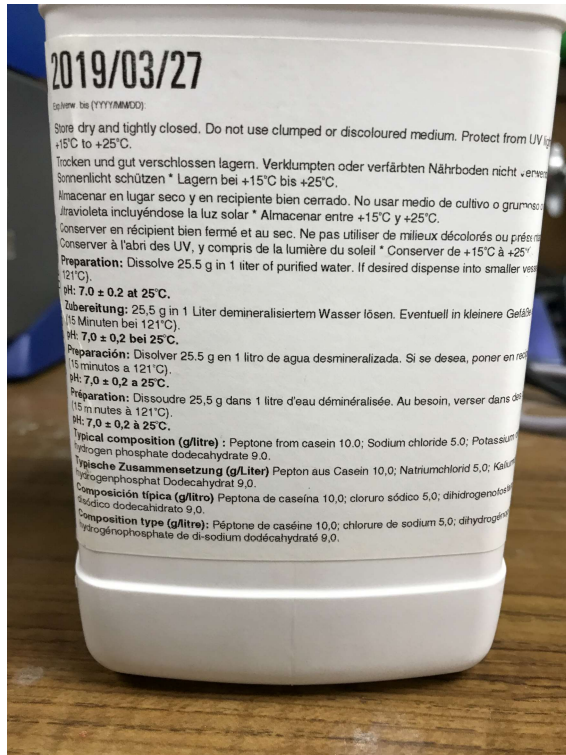


Figura 28:  
Valores utilizados por litro para el Agua peptonada

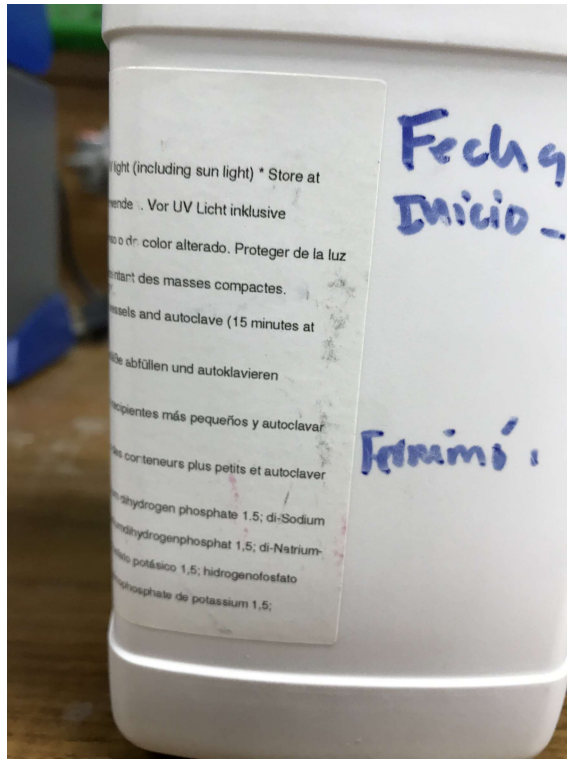


Figura 29:  
Valores utilizados por litro para el agua peptonada



Figura 30:  
Imágenes de los resultados de la primera ronda



Figura 31:  
Imágenes de los resultados de la primera ronda control con el que se comparaba



Figura 32:  
Imágenes de los resultados de la primera ronda



Figura 33:  
Imágenes de los resultados de la primera ronda



Figura 34:  
Imágenes de los resultados de la primera ronda



Figura 35:  
Imágenes de los resultados de la primera ronda



Figura 36:  
Imágenes de los resultados de la primera ronda



Figura 37:  
Imágenes de los resultados de la primera ronda



Figura 38:  
Imágenes de los resultados de la segunda ronda

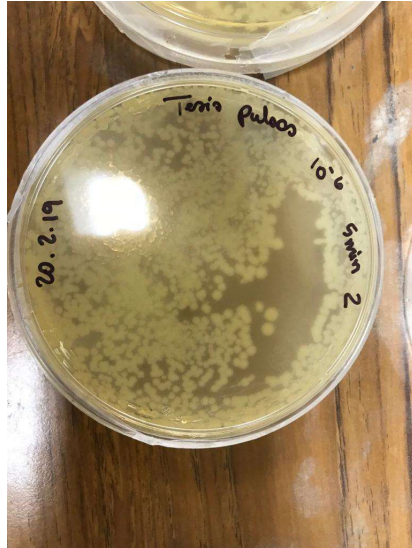


Figura 39:  
Imágenes de los resultados de la segunda ronda



Figura 40:  
Imágenes de los resultados de la segunda ronda

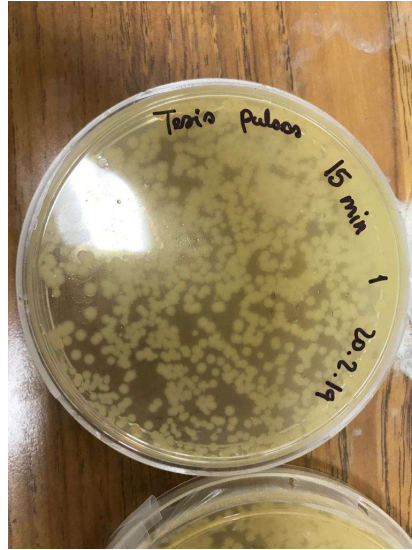


Figura 41:  
Imágenes de los resultados de la segunda ronda

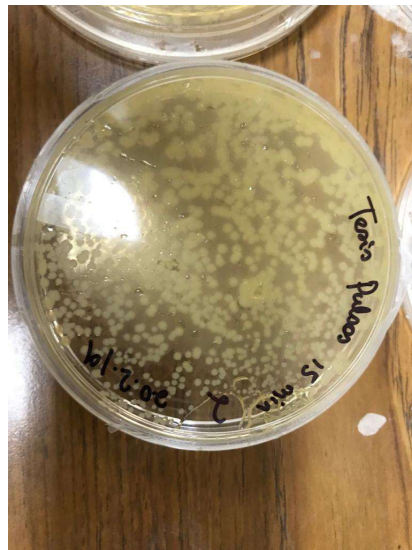


Figura 42:  
Imágenes de los resultados de la segunda ronda

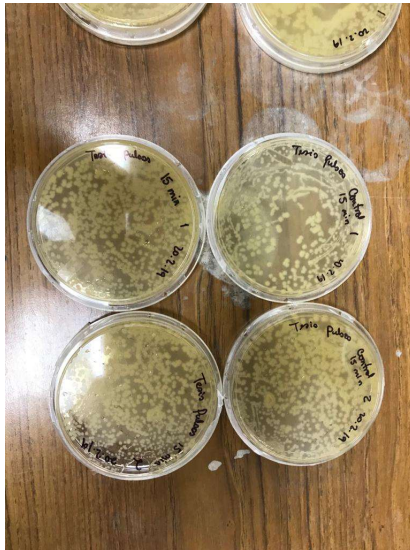


Figura 43:  
Imágenes de los resultados de la segunda ronda

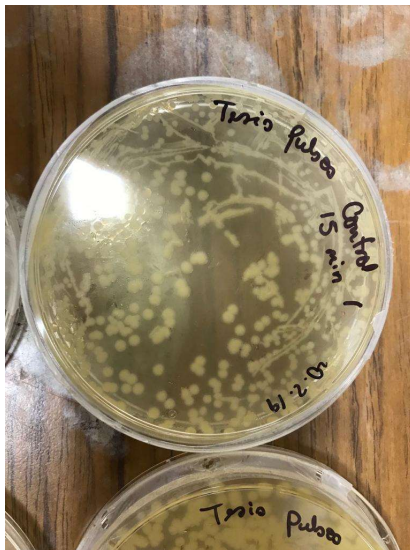


Figura 44:  
Imágenes de los resultados de la segunda ronda

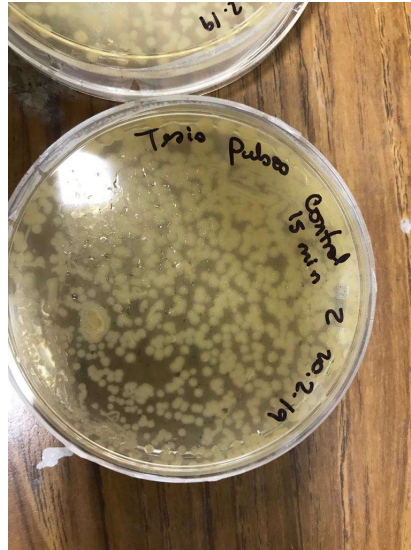


Figura 45:  
Imágenes de los resultados de la segunda ronda

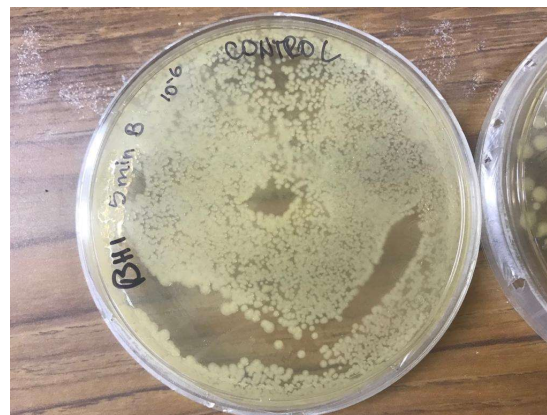


Figura 46:  
Imágenes de los resultados de la tercera ronda



Figura 47:  
Imágenes de los resultados de la tercera ronda

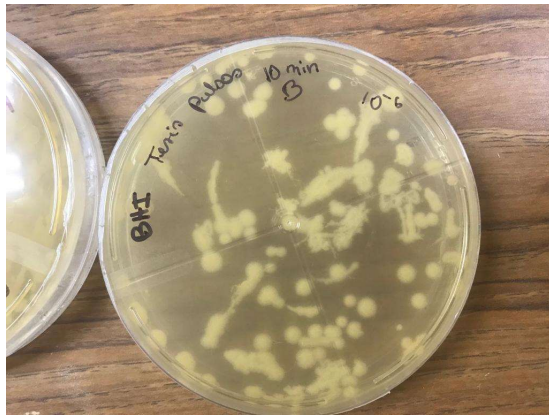


Figura 48:  
Imágenes de los resultados de la tercera ronda

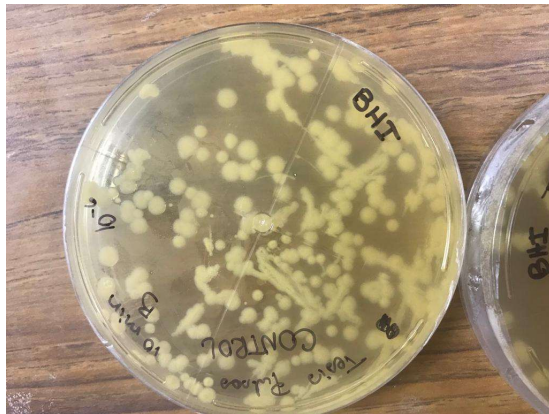


Figura 49:  
Imágenes de los resultados de la tercera ronda



Figura 50:  
Imágenes de los resultados de la tercera ronda



Figura 51:  
Imágenes de los resultados de la tercera ronda



Figura 52:  
Imágenes de los resultados de la tercera ronda

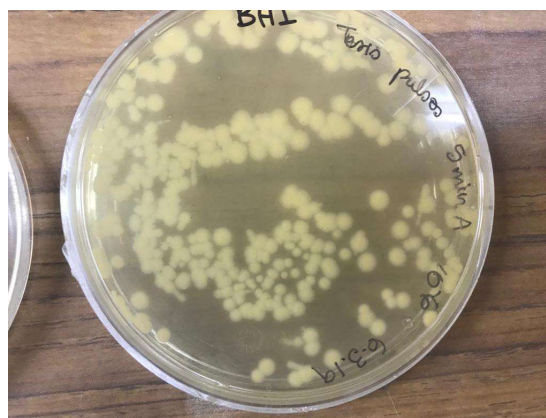


Figura 53:  
Imágenes de los resultados de la tercera ronda

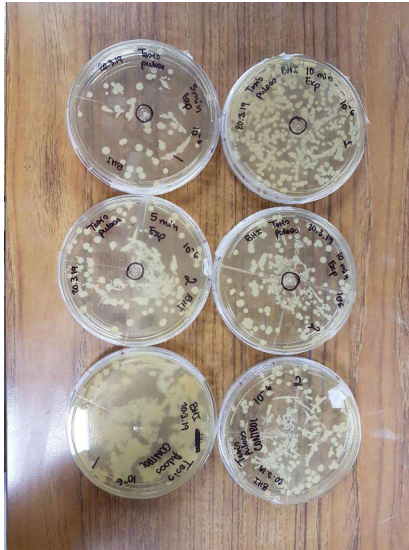


Figura 54:  
Imágenes de las pruebas de la cuarta ronda



Figura 55:  
Imágenes de los resultados de la quinta ronda



Figura 56:  
Imágenes de los resultados de la quinta ronda

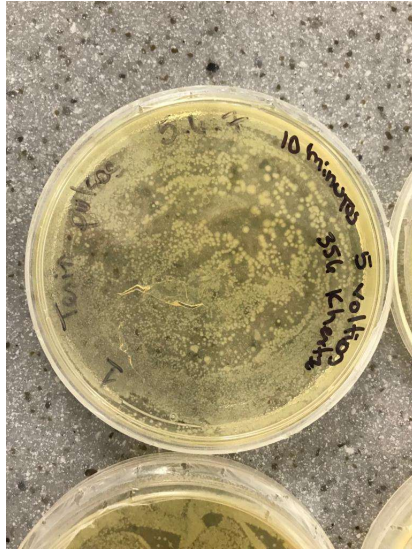


Figura 57:  
Imágenes de los resultados de la sexta ronda



Figura 58:  
Imágenes de los resultados de la sexta ronda



Figura 59:  
Imágenes de los resultados de la sexta ronda



Figura 60:  
Imágenes de los resultados de la sexta ronda



Figura 61:  
Imágenes de los resultados de la sexta ronda

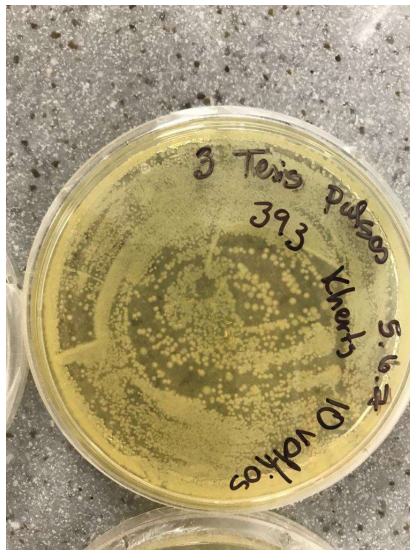


Figura 62:  
Imágenes de los resultados de la sexta ronda



## CAPÍTULO 13

---

### Glosario

---

**D** Vector de densidad de flujo. 21

**Ds** Vector de densidad de flujo en un punto de la superficie usada para demostrar la ley de Gauss. 21

**Q** Carga eléctrica total de un sistema hipotético usado para describir y desarrollar la ley de Gauss. 20