

**Efectos de un campo eléctrico pulsado aplicado en bacterias *Escherichia coli*,
Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella spp.* y *Acinetobacter spp.***

Camila Castro Linares

Director: Iván Méndez

19 diciembre

**Facultad de ciencias básicas y aplicadas
Biología aplicada
Trabajo de grado**

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA

Cajicá, Cundinamarca. Diciembre de 2025

Índice	
Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Materiales y métodos	10
Obtención de las cepas bacterianas	10
Medio de crecimiento	10
Pruebas bioquímicas	10
Pruebas de susceptibilidad /Etest	11
Inóculo para la aplicación de PEF	12
Aplicación del campo eléctrico pulsado (PEF)	12
Análisis experimental	16
Análisis estadístico	16
Resultados	17
Conteo de UFC	17
<i>E. coli</i> ATCC	17
<i>E coli</i>	18
<i>P. aeruginosa.</i>	19
<i>Acinetobacter spp</i>	20
<i>Klebsiella spp.</i>	21
Pruebas bioquímicas	23
Pruebas de sensibilidad	24
Discusión	26
Conclusiones y recomendaciones	29

Efectos de un campo eléctrico pulsado aplicado en bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.* y *Acinetobacter spp.*

Resumen

La resistencia bacteriana representa una amenaza creciente para la salud pública, impulsada por el uso indiscriminado de antibióticos y la capacidad de las bacterias para adquirir genes de resistencia. En este estudio se evaluó el efecto de un campo eléctrico pulsado (PEF) de bajo voltaje (10 V, 60 Hz) sobre el crecimiento, la actividad metabólica y la susceptibilidad antibiótica de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.* y *Acinetobacter spp.* Las cepas fueron expuestas a PEF durante 2, 4 y 6 horas, analizándose el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), pruebas bioquímicas y perfiles de sensibilidad antibiótica (discos de difusión y E-test). Los resultados mostraron una inhibición temporal del crecimiento bacteriano dependiente del tiempo y de la especie: *E. coli* y *Klebsiella spp.* presentaron una disminución marcada en UFC tras 2–4 h de exposición, mientras que en *P. aeruginosa* la reducción fue significativa a las 4 h, aunque con recuperación posterior. En *Acinetobacter spp.* se evidenció una disminución a las 2 h, sin efecto sostenido en tiempos mayores. Las pruebas bioquímicas no mostraron alteraciones relevantes en la mayoría de las cepas, salvo la pérdida de producción de indol en *E. coli* ATCC, reducción de la actividad oxidasa en *P. aeruginosa* y cambios ligeros en el uso de citrato en *Acinetobacter spp.* Respecto a la susceptibilidad antibiótica, se observó un aumento de sensibilidad en *E. coli* (ciprofloxacina y piperacilina/tazobactam) y en *Acinetobacter spp.* (cambio de resistente a intermedio en TZP tras 6 h), mientras que en *P. aeruginosa* y *Klebsiella spp.* no hubo variaciones significativas. En conclusión, la aplicación de PEF a bajo voltaje generó efectos subletales que inhibieron transitoriamente el crecimiento bacteriano y, en algunos casos, modificaron la susceptibilidad antibiótica. Estos resultados sugieren que la tecnología tiene potencial como estrategia complementaria en el control de bacterias multirresistentes, aunque se requieren estudios con mayor intensidad y tiempos de exposición prolongados para inducir efectos metabólicos y letales más consistentes.

Palabras clave: resistencia bacteriana, campo eléctrico pulsado, susceptibilidad antibiótica, *E. coli*, pruebas bioquímicas.

Abstract

Bacterial resistance represents a growing threat to public health, driven by the indiscriminate use of antibiotics and the ability of bacteria to acquire resistant genes. In this study, the effect of a low voltage pulsed electric field (PEF) (10 V, 60 Hz) was evaluated on the growth, metabolic activity, and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., and *Acinetobacter* spp. The strains were exposed to PEF for 2, 4, and 6 hours, analyzing colony-forming unit (CFU) counts, biochemical tests, and antibiotic susceptibility profiles (disk diffusion and E-test). The results showed a time- and species-dependent temporary inhibition of bacterial growth: *E. coli* and *Klebsiella* spp. exhibited a marked decrease in CFU after 2–4 h of exposure, while in *P. aeruginosa* the reduction was significant at 4 h, although followed by recovery. In *Acinetobacter* spp., a decrease was observed at 2 h, but no sustained effect was detected at longer exposure times. Biochemical tests did not reveal major alterations in most strains, except for loss of indole production in *E. coli* ATCC, reduction of oxidase activity in *P. aeruginosa*, and slight changes in citrate utilization in *Acinetobacter* spp. Regarding antibiotic susceptibility, an increase in sensitivity was observed in *E. coli* (ciprofloxacin and piperacillin/tazobactam) and in *Acinetobacter* spp. (shift from resistant to intermediate to TZP after 6 h), whereas in *P. aeruginosa* and *Klebsiella* spp. no significant variations were found. In conclusion, the application of low-voltage PEF generated sublethal effects that transiently inhibited bacterial growth and, in some cases, modified antibiotic susceptibility. These findings suggest that this technology holds potential as a complementary strategy for controlling multidrug-resistant bacteria, although further studies with higher intensities and longer exposure times are required to induce more consistent metabolic and lethal effects.

Keywords: bacterial resistance, pulsed electric field, antibiotic susceptibility, *E. coli*, biochemical tests.

Introducción

El uso de antibióticos como principal tratamiento hacia las enfermedades infecciosas ha ejercido una fuerte presión selectiva sobre la genética bacteriana, contribuyendo a la aparición de bacterias multirresistentes (Cabrera *et al.*, 2007). Las especies bacterianas multirresistentes además de representar un problema de salud pública también limitan el uso de alternativas terapéuticas llevando al uso excesivo de antimicrobianos como principal tratamiento (López-Velandia *et al.*, 2016). La resistencia bacteriana entre otras se encuentra asociada a la presencia de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), cefamicinasas plasmídicas y carbapenemasas (Soliz *et al.*, 2022; Fariñas & Martínez-Martínez, 2013), adquiriendo resistencia a las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, quinolonas y aminoglucósidos. Esto se da debido a la alta plasticidad genética de los microorganismos y la capacidad de realizar transferencia horizontal de genes (THG), lo que hace que sus procesos evolutivos sean mucho más rápidos. De esta manera es posible desarrollar cambios en los genes implicados en la efectividad del fármaco y hacerlo predominar en la población bacteriana (Fernández, 2021). La THG se puede realizar mediante la transformación del material genético extracelular, transducción por bacteriófagos o conjugación por plásmidos o transposones (Lerminiaux, & Cameron, 2018). El efecto o susceptibilidad de un microorganismo a un antibiótico también puede variar a nivel de la cepa y del tamaño del inóculo como se ha documentado con *Staphylococcus aureus* y las cefalosporinas (Munita & Arias, 2016), por lo cual se ha acudido a usar técnicas alternativas con el fin de mitigar el uso indiscriminado de antibióticos.

El tratamiento de las infecciones se realiza teniendo en cuenta dos enfoques 1) el control del agente causal y 2) el manejo de los síntomas. En este último, se han usado alternativas como acupuntura y ozono como medicina alternativa, obteniendo resultados prometedores en cuanto a la disminución del dolor, y tratamiento de infecciones. Sin embargo, este tipo de tratamientos sugieren técnicas invasivas que podrían incluso promover más infecciones en el paciente (Bergogne-Bérézin, & Towner, 1996). Por otro lado, el mecanismo de acción de la ozonoterapia ha sido más estudiado ya que en países como Brasil este tratamiento alternativo ya se encuentra integrado en el sistema de salud pública (Serra *et al.*, 2023). Se han realizado estudios en los cuales se aplicaban técnicas de acupuntura y ozonoterapia en pacientes con glaucoma crónico, a partir de los cuales no hubo diferencia significativa entre dichos tratamientos manteniendo las lesiones de los pacientes. Mientras que en otro estudio se realizó la aplicación de ozonoterapia y campos magnéticos en enfermedades como retinosis pigmentaria, obteniendo notorias mejoras y estabilidad en el cuadro clínico del paciente (García *et al.*, 2010).

En el estudio realizado por García y colaboradores (2010), en pacientes con retinosis pigmentaria, se obtuvieron notables mejoras luego de la aplicación de terapia de ozono, campos magnéticos y electroestimulación. En consecuencia, hubo un aumento en el suministro de oxígeno a los tejidos y de nutrientes mejorando el trofismo del tejido ocular. Además, entre las propiedades de estas terapias se encuentran la recuperación funcional

nerviosa debido a que la síntesis de ATP aumenta proporcionando mayor energía y mejorando las funciones de los tejidos oculares (García *et al.*, 2010). También se plantea el efecto sobre la polarización y despolarización de los fotorreceptores favoreciendo la remodelación celular (Lai & Singh, 2004). Por otro lado, la aplicación de campos magnéticos sobre heridas abiertas se ha estudiado en ratones donde se evidencia un aumento en la velocidad de cicatrización durante la primera etapa del proceso disminuyendo de esta manera el tiempo de cicatrización frente a los ratones control (sin aplicación de campo magnético) (Hidalgo de Paz *et al.*, 2001). A partir de los resultados de Hidalgo de Paz (1995), se puede atribuir este efecto a un agente físico causado por las corrientes vibratorias generando vasodilatación en la zona adyacente a la herida, además de activar la división celular y la síntesis de ADN, ARN y ATP. A pesar de la diversidad de estudios clínicos que apoyan el funcionamiento de la terapia eléctrica y a otros estudios que la asocian con tener un efecto placebo (González, 2015), es necesario realizar estudios sobre un efecto directo en distintos agentes infecciosos y causantes de enfermedades y de esta manera implementarlo como tratamiento no invasivo, seguro y de bajo costo.

Los campos eléctricos pulsados (PEF) consiste en la aplicación de pulsos de corta duración con por medio de unos electrodos; esto genera la electroporación de las membranas aumentando su permeabilidad siendo así efectivo para la inactivación de bacterias (Puértolas *et al.*, 2009). El campo eléctrico puede ser aplicado de distintas maneras a través de la modulación de la frecuencia de onda e intensidad de éste como disminución en la frecuencia de forma exponencial, ondas bipolares o pulsos oscilatorios. Estos cambios en la intensidad de los campos eléctricos pueden dar lugar a obtener diversos efectos como la inactivación microbiana (15-40 kV/cm), mejora de la tasa de transferencia de masa en tejidos vegetales y animales (0,7-3,0 kV/cm); estimulación de las respuestas al estrés (0,5-1,5 kV/cm); y electroporación (0,7 kV cm) (Vivanco *et al.*, 2021). El proceso de electroporación puede ser reversible o irreversible; al alcanzar cierto potencial transmembranal ocurre la formación de poros hidrofílicos en la membrana, y a medida que aumenta la intensidad del campo (en amplitud, frecuencia o duración) la electroporación irreversible va llevando a la muerte celular (Perminaitė *et al.*, 2023; Rems *et al.*, 2013).

Esta tecnología es atractiva en procesos de desinfección de alimentos, superficies y tratamiento celulares. La electroporación reversible se usa para la administración de genes o fármacos a las células, tiene aplicaciones médicas en la electro-quimioterapia y la electroterapia génica (Golberg *et al.*, 2014). La electroporación irreversible se utiliza para la ablación directa y no térmica de tumores sólidos, un procedimiento conocido como electroporación irreversible no térmica (NT-IRE) (Golberg, 2013). La combinación de PEF con antimicrobianos permite la sensibilización de los microorganismos al tratamiento químico y también, sobre la eliminación efectiva de bacterias en la superficie de la piel y el tratamiento de heridas; sin embargo, existen factores que limitan el tratamiento de infecciones debido a que las bacterias colonizan capas profundas de la piel, además de los métodos de aplicación, inflamación del tejido y tiempo de exposición aún están poco cubiertas en la literatura (Perminaitė *et al.*, 2023). Por último, es necesario considerar aplicaciones de bajo voltaje ya que pueden presentar una ventaja evitando el aumento de temperatura sobre el tejido o material sobre el que se esté realizando la aplicación de PEF, también, disminuiría las contracciones musculares y asimismo el dolor; ya que la aplicación

de campos eléctricos de alta intensidad genera un calentamiento significativo sobre la superficie (Perminaité et al., 2023).

La aplicación de campos eléctricos ha sido usada con fines de desinfección de alimentos y aguas residuales contra *Bacillus pumilus*, *Clostridium botulinum*, entre otros (Pillet et al., (2016). Pillet et al., (2016) encontraron debilitamiento en la barrera de peptidoglicano, generando una fuga en la membrana permitiendo la presencia de ácidos nucleicos en el medio extracelular, estas modificaciones físicas reducen las propiedades invasivas de las bacterias. Como se observó en el estudio realizado por Kuang et al., (2024), donde se evidenciaron cambios a nivel morfológico en la membrana celular de *E. coli* al ser expuestas a PEF, mostrando arrugas, e irregularidades en la célula; se observaron fracturas y fugas de material citoplasmático. El efecto letal de los PEF ha demostrado una variabilidad dependiendo del alimento, microorganismo, condiciones de exposición al tratamiento y equipo (Puértolas et al., 2009; Rems et al., 2013). Mediante la aplicación de PEF se han obtenido resultados de inactivación de *E. coli* de 5; 5,35 y hasta 8.78 Log₁₀ variando la intensidad del campo eléctrico entre 29 y 80 kV y usando agentes microbianos como en el último caso mencionado; además, se ha demostrado una mayor susceptibilidad de las bacterias Gramnegativas a los PEF que las bacterias Grampositivas debido principalmente a la composición de su pared celular y asimismo a su mayor tamaño (Mosqueda-Melgar et al., 2008). Por otro lado, factores como el tiempo de exposición, voltaje y conductividad del medio han afectado el efecto letal de los PEF (Kuang et al., 2024). El material de los electrodos es un factor influyente, los electrodos de acero inoxidable han demostrado una mayor reducción de bacterias frente a electrodos de grafito (Sandvik et al., 2013).

La adaptación bacteriana a los PEF fue evaluada por Gusbeth et al., (2009) encontrando que no existen alteraciones fenotípicas, en cuanto a la tolerancia eléctrica incluso luego de 30 ciclos de tratamiento; lo anterior supone una ventaja de este tratamiento frente a los tratamientos de desinfección o eliminación de bacterias por rayos UV ya que evita el enriquecimiento de la población a una electro-tolerancia y la transmisión de esta a sus descendientes. Las bacterias son menos susceptibles a la electroporación frente a las células de mamíferos (debido al tamaño celular, pared celular, y estructura interna). Por lo cual, los parámetros de PEF para inactivación de bacterias o levaduras patógenas puedan dar como resultado la ablación del tejido tratado (Novickij et al., 2018). Por esto, el proceso de electroporación generalmente no es utilizado para el tratamiento de infecciones bacterianas; sin embargo, ha sido usado en distintas terapias con resultados eficientes en el tratamiento para cáncer, cicatrización de heridas en ratón, y la ablación cardíaca (Tirono et al., 2022). Además, se realizó el tratamiento en secciones de carne de res obteniendo disminución significativa de bacterias como *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Tirono et al., 2022). Chittams-Miles et al (2024) hallaron que los PEF sí pueden reducir la dosis efectiva de antibióticos necesarios para combatir la infección, permitiendo un tratamiento más eficiente sin aumentar la cantidad. En procedimientos para la ablación de tumores se ha demostrado ser generalmente un procedimiento seguro; sin embargo, requiere de intensidades de campo eléctrico más bajas, y un diseño para disminuir la energía usando almohadillas de contacto (Golberg et al., 2015).

Las bacterias Gramnegativas han sido objeto de estudio debido a su alta importancia en el área de la salud y el alto riesgo de contraerlas durante la estancia hospitalaria (10%), y mayor aún en salas de cuidados intensivos (40%) (Paz *et al.*, 2008). Los bacilos multirresistentes han demostrado ser un problema ya que se han visto altamente involucrados en las infecciones nosocomiales. Los más reconocidos son *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* y *Acinetobacter spp.* Además, sus infecciones son difíciles de tratar debido a la alta resistencia de estos géneros bacterianos a los principales grupos de antibióticos. Los antibióticos usados generalmente son inhibidores de betalactamasas + betalactámicos de betalactamasas, los cuales se encargan de destruir las enzimas que inhiben la actividad de determinados betalactámicos (Seija, & Vignoli. 2006). Además, las primeras opciones de tratamiento son piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, meropenem y aztreonam; sin embargo, su efectividad se está viendo comprometida por la resistencia bacteriana en entornos hospitalarios (León, E. 2025). Frente a cepas resistentes, se recurre al uso de ceftolozano/tazobactam y algunos aminoglucósidos combinados en casos de infecciones graves (Seija, & Vignoli. 2006).

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* tienen una alta relevancia clínica debido a su capacidad de generar infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos ya que puede colonizar las vías respiratorias y generar el deterioro de las funciones pulmonares. Estas tienen diferentes mecanismos de adaptación como lo son la producción de β -lactamasas, la alteración de porinas y la sobreexpresión de bombas de eflujo, lo cual favorece su prevalencia en el ambiente generando problemas sanitarios (León, E. 2025). En un estudio realizado en el Hospital General Regional 1 del IMSS en Chihuahua, México, se encontraron 7 especies bacterianas con multirresistencia, donde *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* y *P. aeruginosa* fueron las especies que presentaron el mayor grado de resistencia. Donde se encontró una alta producción de metalo- β -lactamasas y la formación de biopelículas (Chávez & Corinna, 2025). Por otro lado, tiene un alto impacto clínico debido a que hay un aumento en la estancia hospitalaria, el uso de recursos y la tasa de mortalidad (>30%) asociada a neumonías por ventilación mecánica (León, E. 2025).

En bacterias de *E. coli* se logró la inactivación de $1,13 \pm 0,01$ lg UFC/mL al ser tratado durante 60min a 0,24 kV/cm; además, la disminución se encuentra correlacionada con los tiempos de exposición, ya que con tiempos de 100min el número de *E. coli* se redujo en $3,09 \pm 0,01$ lg UFC/mL (Kuang *et al.*, 2024). Por otro lado, en tratamientos de *Acinetobacter baumannii* en infecciones de heridas por quemadura se ha obtenido la disminución en la carga bacteriana de acuerdo con la intensidad del voltio y al número de pulsos aplicados; sin embargo, es posible que ocurra una recontaminación de la zona desinfectada permitiendo la recuperación de las bacterias, por lo cual es necesario realizar la aplicación de campos eléctricos intermitentes durante periodos prolongados con el fin de conocer los tiempos de recuperación de las bacterias, evitar esta recuperación, y lograr una eliminación 100% de las bacterias causantes de infecciones (Golberg *et al.*, 2014). *P. aeruginosa* es responsable de hasta el 80% de los casos de morbilidad y mortalidad a nivel mundial en cuanto a heridas infectadas debido a la capacidad de formar biopelículas y resistencia a fármacos, esta especie es altamente resistente requiriendo un PEF superior a 15 kV/cm para lograr una alta tasa de permeabilización (Perminaitė *et al.*, 2023; Novickij *et al.*, 2018). Se encontró que en *P. aeruginosa* hubo una disminución en los microorganismos de la biopelícula tras la aplicación de corriente continua donde a medida que aumentaba el voltaje disminuye en mayor medida

los microorganismos, además, se descartó la variabilidad entre la concentración de sal (Sandvik et al., 2013).

La electricidad ha sido usada para estimular el metabolismo microbiano, en medios de oxigenación mediante fermentación, o reducción anaeróbica de contaminantes tóxicos. Mediante lo que puede ser electroporación se generan cambios metabólicos en las bacterias alterando el transporte de nutrientes, iones. En estudios previos se obtuvo que las bacterias mostraron una disminución significativa en la tasa de crecimiento bajo la aplicación de campos electromagnéticos de baja frecuencia (50 Hz) por periodos de tiempo prolongados genera disminución en la tasa de crecimiento bacteriana. Por otro lado, la capacidad fermentadora se vio en aumento y una disminución en la capacidad oxidorreductora de las bacterias (Potenza, 2004; Strašák *et al.*, 2002). Además, se han observado cambios en la actividad de las enzimas PK, SDH y ATPasa disminuyendo luego de haber aplicado el tratamiento de PEF, afectando así procesos metabólicos energéticos y en procesos de respiración, por lo cual es posible esperar que haya más cambios a nivel metabólico que contribuyan a la inhibición del crecimiento bacteriano (Kuang et al., 2024). Por último, también hay generación de productos de hidrólisis como cloro y peróxido de hidrógeno (Sandvik et al., 2013).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, es necesario seguir explorando nuevas estrategias terapéuticas que contribuyan al control de bacterias multirresistentes, ya que las opciones antibióticas se están volviendo cada vez más limitadas. A pesar de que la aplicación de campos eléctricos ha sido usada como tratamiento no convencional y funcional sobre las bacterias, existen aún vacíos de conocimiento respecto a si un voltaje bajo puede generar este mismo efecto, si existen afecciones directamente sobre aspectos fisiológicos y metabólicos. Por lo tanto, este estudio busca aportar evidencia sobre el impacto de los campos electromagnéticos sobre el crecimiento, la actividad metabólica y la susceptibilidad antibiótica de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*., *Acinetobacter spp* y *Klebsiella spp.*, contribuyendo así al desarrollo de estrategias complementarias frente a la creciente amenaza de la resistencia bacteriana.

Materiales y métodos

Obtención de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas fueron obtenidas de la Universidad Militar Nueva Granada – Sede de medicina. Se usaron cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.* y *Acinetobacter spp.* debido a su importancia en el área de la salud. El montaje experimental se realizó con cepas de aislamientos clínicos y una cepa ATCC (*E. coli* ATCC 35922) a diferentes tiempos con el fin de determinar la variabilidad del efecto causado por el tratamiento entre cepas.

Medio de crecimiento

Se usó como medio base Agar MacConkey, el cual es un medio que aísla bacterias Gramnegativas, ya que la presencia de sales biliares y cristal violeta impiden el crecimiento de organismos Grampositivos. Se prepararon 2 réplicas para cada cultivo de bacterias con el fin de observar la pureza de los cultivos.

Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas que se indican en la tabla 1. La preparación de cada uno de los medios selectivos correspondientes y la lectura de los resultados se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las pruebas bioquímicas se realizaron por duplicado para cada cepa bacteriana, se realizaron al inicio y al final de la experimentación.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas que se realizaron a cada cepa, y sus respectivos indicadores.

Prueba bioquímica	Enzima	Indicador
Fermentación de azúcares	B-Galactosidasa	Rojo fenol
	Tiosulfato reductasa, cisteína desulfurilasa	Sales de Hierro
Citratos	Citratasa	Azul de bromotinol
Motilidad	-	Turbidez
Urea	Ureasa	Rojo fenol
Sulfuros	Tiosulfato reductasa, cisteína desulfurilasa	Sales de Hierro
Indol	Triptofanasa	Indol, ácido pirúvico y amoníaco (Tinción rosa)
Oxidasa	Citocromo oxidasa	indol, ácido pirúvico y amoníaco (Coloración azul)

Fuente: Laboratorio Britania SA

Pruebas de susceptibilidad /Etest

Se realizaron pruebas de sensibilidad para cada cepa bacteriana usando los antibióticos detallados en la tabla 2. Para los antibióticos Meropenem e Imipenem se realizó la prueba de susceptibilidad usando la prueba de Epsilon (E-Test) (Fig. 2). Cada una de estas se realizó por duplicado para cada uno de los antibióticos y para cada una de las cepas bacterianas utilizadas, usando las diluciones seriadas entre 10^{-7} y 10^{-9} para realizar los inóculos.

Tabla 2. Antibióticos evaluados agrupados por familia antimicrobiana y técnica usada

Familia de antibióticos	Siglas	Antibióticos	Técnica
Penicilinas	TZP	piperacilina / tazobactam (100 µg)	Sensidiscos
Cefalosporinas	FEP	Cefepime (30 µg)	Sensidiscos
	CRO	Ceftriaxona (30 µg)	Sensidiscos
Fluoroquinolonas	CIP	Ciprofloxacina (5 µg)	Sensidiscos
Aminoglucósidos	CN	Gentamicina (10 µg)	Sensidiscos
Carbapenémicos	MER	Meropenem	E-Test
	IMI	Imipenem	E-Test

Fuente: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Las pruebas de sensibilidad se realizaron mediante siembra en placas de agar Mueller Hinton usando un isopo estéril; posteriormente, se colocaron los discos de antibiótico (Fig 1). La interpretación de resultados se realizó de acuerdo con las categorías establecidas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en función del éxito o fracaso terapéutico (CLSI, 2020) (Cantón, 2010).

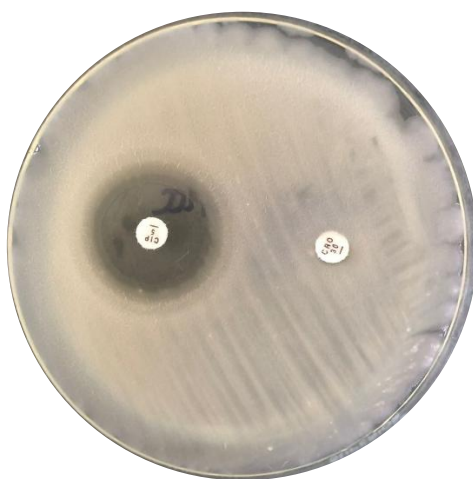


Fig. 1. Prueba de susceptibilidad usando discos de antibiótico.

Para las pruebas de E-Test se realizó la inoculación del medio en agar Mueller Hinton realizando la siembra con hisopo estéril. La tirilla portadora del antimicrobiano se ubicó con la concentración máxima cerca al borde externo de la Caja de Petri y se llevó a incubación.

La Concentración mínima inhibitoria (CIM) se considerará en el punto en el que la elipse de inhibición intercepte con la tirilla (Jaramillo, 2009) (Fig 2).

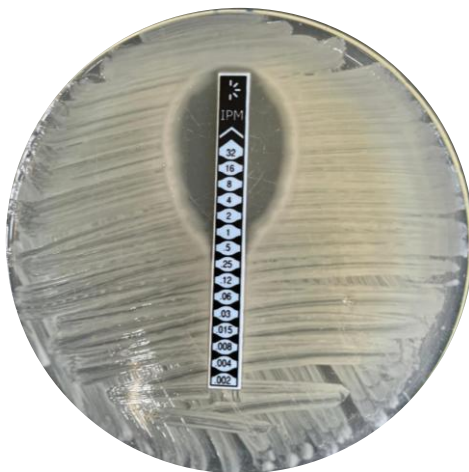


Fig. 2. Prueba de sensibilidad E-Test.

Inóculo para la aplicación de PEF

El crecimiento bacteriano se llevó a cabo tomando aislados puros de bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella spp.* y *Acinetobacter spp.* Posteriormente, cada aislado se cultivó en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de medio de caldo nutritivo (CN), y cada cultivo se llevó a incubar durante 24h.

A partir de una solución salina al 0.9%, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-9} . Para el conteo de Unidades formadoras de colonias (UFC) se usaron las diluciones entre 10^{-7} y 10^{-9} debido a la velocidad de crecimiento de cada cepa bacteriana. Posteriormente se realizó la siembra de 100 μ L en cajas de Petri con agar nutritivo y esparcidas con perlas de vidrio, esto con el fin de separar las colonias y cuantificar el número de colonias presentes. Las suspensiones celulares en CN se trataron con PEF y se compararon con cultivos control; es decir, que no se procesaron, pero se mantuvieron a la misma temperatura y durante el mismo tiempo que cada uno de los tratamientos.

Se realizó una siembra y conteo de UFC en el estado inicial y otra siembra en el estado final de cada tratamiento y control. Cada tratamiento y control se realizaron por triplicado, por último, las placas se llevaron a incubar a 37 °C y se leyeron después de 24 h (Węsierska, & Trziszka, 2007).

Aplicación del campo eléctrico pulsado (PEF)

El campo eléctrico pulsado (PEF) fue producido por un generador de ondas (Generador arbitrario de funciones rigol) y la aplicación de campo eléctrico se realizó a 10V, a una frecuencia de 60Hz (Fig. 3), se realizaron diferentes tiempos de aplicación, obteniendo tres tratamientos correspondientes a 2h, 4h y 6h de aplicación del PEF. La aplicación, se

realizó de forma indirecta conectando los electrodos a dos láminas de acero inoxidable y en contacto con la superficie del cultivo bacteriano (Fig. 4), (Fig 5).

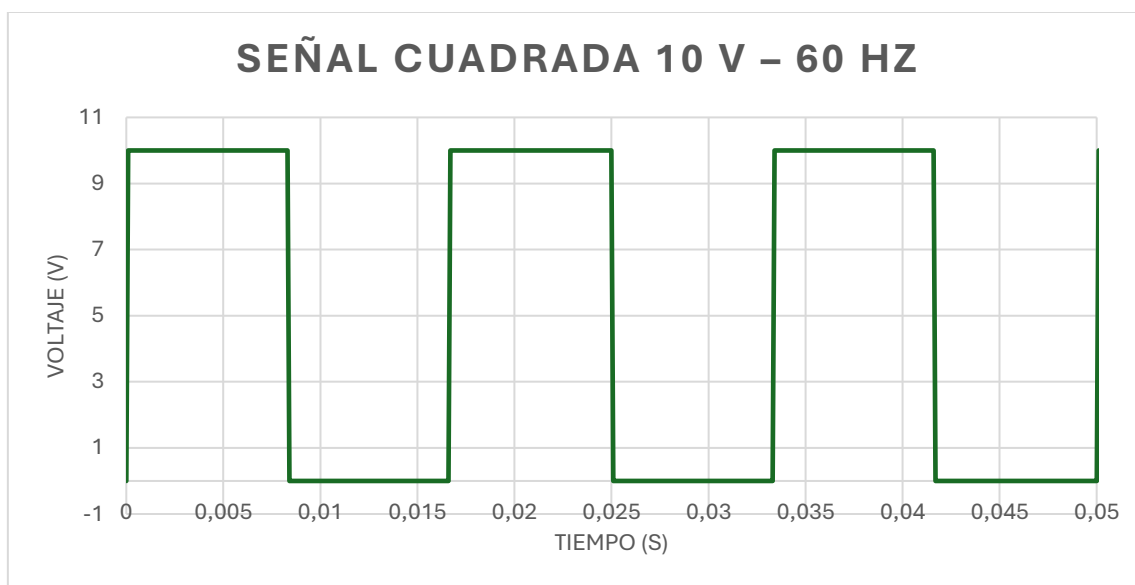


Fig 3. Representación de la señal cuadrada de 10 V a 60 Hz empleada en los experimentos.
Fuente: Elaboración propia

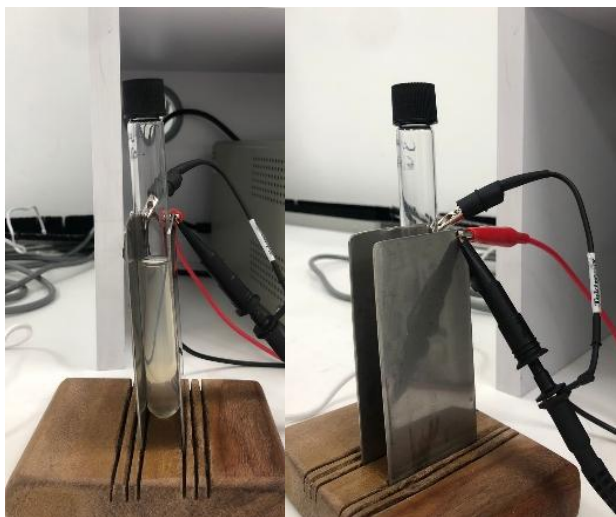


Fig 4. Montaje experimental para el tratamiento con PEF.

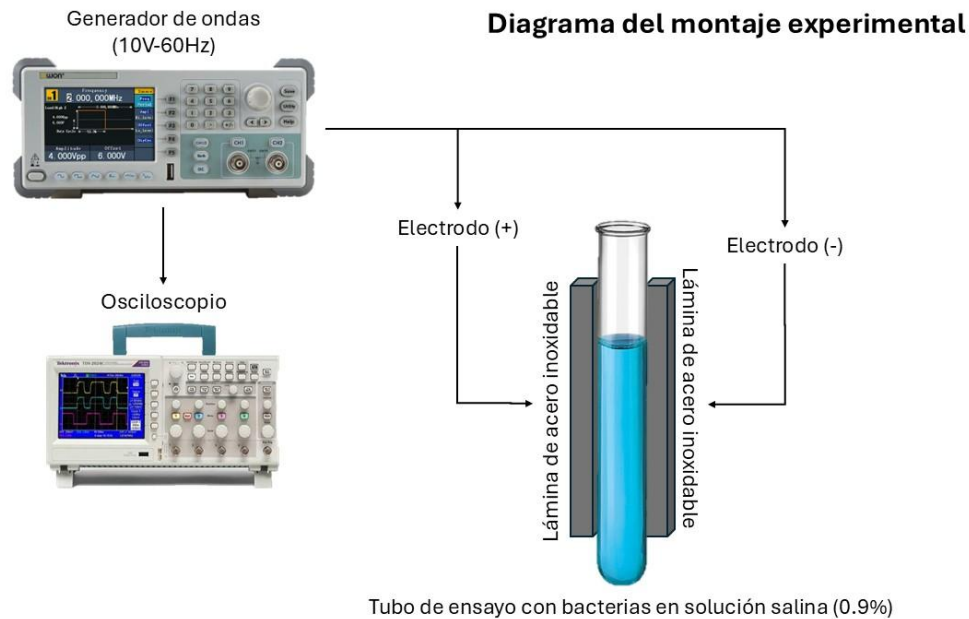


Fig 5. Diagrama del montaje experimental. Fuente: Elaboración propia.

Teniendo en cuenta que la aplicación del campo eléctrico se realizó de forma indirecta, se calculó el voltaje efectivo que incide sobre las bacterias dentro del tubo de ensayo con solución salina. Para ello se utilizó la ecuación de continuidad del desplazamiento eléctrico, la cual permite relacionar el campo eléctrico en dos materiales con diferentes permitividades dieléctricas; en este caso, la solución salina al 0,9% y el vidrio del tubo de ensayo. De esta manera, el voltaje total aplicado (10 V) se distribuye entre ambos medios, obteniéndose que el voltaje que incide directamente sobre las bacterias corresponde a **5,2 V**, mientras que en el vidrio se retiene la mayor parte de la caída de potencial (**4,8 V**). El cálculo se realizó como se muestra a continuación:

Se estableció la continuidad:

$$D_1 = D_2$$

$$D = \varepsilon \cdot E$$

$$\varepsilon = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r$$

$$D_1 = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{rm} \cdot E_m$$

$$D_2 = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{rv} \cdot E_v$$

Se obtuvo la ecuación de voltaje total aplicado, y posteriormente se despejó:

$$\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{rm} \cdot E_m = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_{rv} \cdot E_v$$

$$\epsilon_{rm} \cdot E_m = \epsilon_{rv} \cdot E_v$$

Ecuación del campo eléctrico en el medio:

$$E_m = \frac{\epsilon_{rv} \cdot E_v}{\epsilon_{rm}}$$

Sustitución por valores experimentales:

E_m = Campo electrico en el medio

E_v = Campo electrico del vidrio

d_m (Densidad del medio) = 0.016m

d_v (Densidad del vidrio) = 0.001m

ϵ_{rv} (Permitividad relativa del vidrio) = 5

ϵ_{rm} (Permitividad relativa del medio) = 74

Voltaje total = 10V

$$E_m = \frac{5}{74} \cdot E_v$$

$$E_m = 0.0676 \cdot E_v$$

$$V = E_m \cdot d_m + E_v \cdot d_v$$

$$10 = (0.0676 \cdot E_v)(0.016) + E_v(0.001)$$

Campo electrico en el vidrio:

$$E_v = \frac{10}{0.0020816} = 4800 \frac{V}{m}$$

Campo electrico en el medio:

$$E_m = 0.0676 \cdot 4800 = 325 \frac{V}{m}$$

$$\text{Voltaje del medio} = 325 \times 0.016 = 5.2 \text{ V}$$

$$\text{Voltaje del Vidrio} = 4800 \times 0.001 = 4.8 \text{ V}$$

Análisis experimental

Se tomaron las condiciones iniciales de cada cepa bacteriana previa a la aplicación del tratamiento, realizando las correspondientes pruebas bioquímicas y pruebas de susceptibilidad. Posterior a la aplicación del tratamiento se volvieron a realizar dichas pruebas con el fin de conocer si existe un cambio en sus capacidades metabólicas o su respuesta a los antibióticos.

Para el análisis del crecimiento celular se realizaron conteos de UFC antes y después de la aplicación de cada tratamiento. Esto se realizó tomando una alícuota de 100µl para realizar la siembra en placa y tener un conteo de UFC en cajas de Petri.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizará mediante un ANOVA, con el fin de comparar entre cada una de las cepas evaluadas y saber si existe una diferencia significativa entre tratamientos, y entre cada cepa con su respectivo control. En los casos en los que los datos no cumplieron los supuestos de homogeneidad y normalidad del ANOVA se realizó un análisis de comparaciones simples. Por otro lado, el análisis de pruebas bioquímicas y pruebas de susceptibilidad se realizará de forma cualitativa según lo indican las especificaciones de cada prueba.

Resultados

Conteo de UFC

A continuación, se presentan las UFC y el cambio para cada colonia en los diferentes tiempos de exposición.

E. coli ATCC

Los resultados del ANOVA muestran que no existen diferencias significativas entre el control y el tratamiento en la cepa de *E. coli* ATCC, ($Pr > 0.05$) (Fig. 6). Se realizaron pruebas de comparación simple donde se observó que el p. valor disminuía su valor a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento, siendo más cercano al umbral ($P\text{-Value} = 0.0975$) (Fig 7)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tiempo	2	14492	7246	0.298	0.747
Tratamiento	1	63013	63013	2.595	0.133
Tiempo:Tratamiento	2	33601	16801	0.692	0.520
Residuals	12	291391	24283		

Fig 6. ANOVA para la cepa de *E. coli* ATCC

```
$contrasts
Tiempo = 2h:
contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
Control - voltaje    17.7 127 12   0.139  0.8919

Tiempo = 4h:
contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
Control - voltaje   108.7 127 12   0.854  0.4098

Tiempo = 6h:
contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
Control - voltaje   228.7 127 12   1.797  0.0975
```

Fig. 7. Análisis de comparaciones simples para cada tratamiento entre los grupos control y voltaje para la cepa de *E. coli* ATCC.

En la gráfica se observa intervalos de confianza muy variables, por lo que no se muestran diferencias; sin embargo, se observa una disminución de UFC en el grupo “voltaje” frente al grupo “control”. En el tratamiento de 6h de aplicación aparenta ser una diferencia significativa; sin embargo, mediante el análisis de comparaciones simples no alcanza a ser un valor significativo, por la variabilidad de los datos (Fig 8).

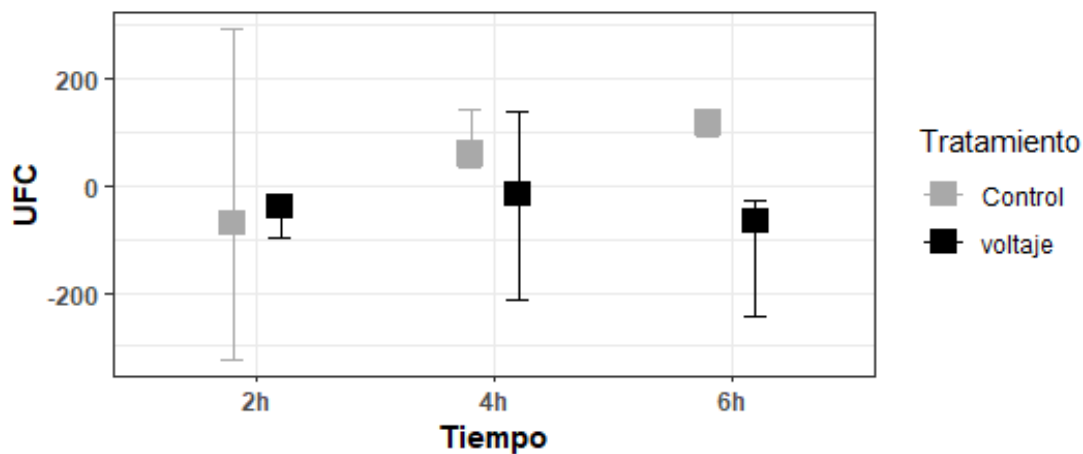


Fig. 8. Cambio en las UFC de *E. coli* ATCC. Tras los 3 tratamientos (2h, 4h y 6h), y sus respectivos controles.

E. coli

Al realizar el ANOVA para la cepa de *E. coli* los datos no cumplieron con los supuestos de homogeneidad, por lo cual se realizó un análisis de rangos alineados (ART). Tras realizar este análisis se obtuvo una diferencia significativa en el factor tiempo ($Pr=0.003$) (Fig. 9).

	Df	Df.res	F value	Pr(>F)
1 Tiempo	2	12	9.79614	0.0030033 **
2 Tratamiento	1	12	0.99641	0.3378836
3 Tiempo:Tratamiento	2	12	0.07289	0.9301119

Fig 9. Análisis de rangos alineados (ART) para la cepa de *E. coli*.

Mediante un análisis de contraste se obtuvo que la diferencia significativa se veía en los tratamientos de 2h -4h ($Pvalue=0.0257$) y en los tratamientos de 2h-6h ($P.Value=0.0027$) (Fig. 10).

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
2h - 4h	6.83	2.25	12	3.043	0.0257
2h - 6h	9.67	2.25	12	4.305	0.0027
4h - 6h	2.83	2.25	12	1.262	0.4419

Fig 10. Análisis de contraste para los tratamientos de *E. coli*.

En la gráfica no se observan diferencias significativas entre los grupos control y voltaje de cada tratamiento; sin embargo, sí se observa la disminución de las UFC con respecto al tiempo de tratamiento, siendo siempre menor el grupo “voltaje” menor al grupo control (Fig 11).

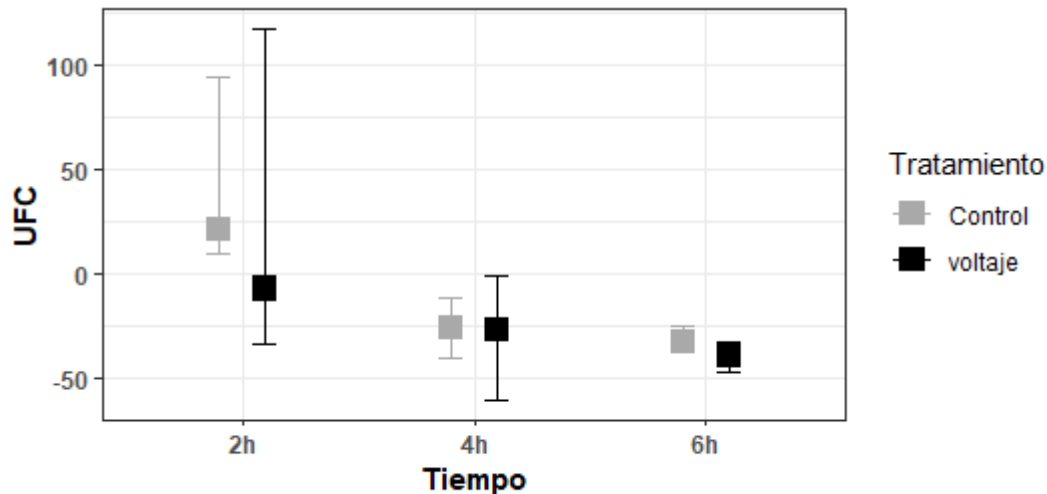


Fig 11. Cambio en las UFC de *E. coli*. Tras los 3 tratamientos (2h, 4h y 6h), y sus respectivos controles.

P. aeruginosa.

Al realizar el análisis de ANOVA con la cepa de *P. aeruginosa*. Se encontró que los datos no cumplen con los supuestos de homogeneidad y normalidad de los datos, por lo que se aplicó un análisis de rangos alineados (ART) como alternativa frente al ANOVA tradicional. Mediante el análisis de ART se obtuvo una diferencia altamente significativa en los factores de tiempo y tratamiento ($Pr=0.003$ y $Pr=0.002$, respectivamente), además, se observó una relación entre estos factores tiempo:tratamiento (Fig. 12).

	Df	Df.res	F value	Pr(>F)	
1 Tiempo	2	12	9.5828	0.0032586	**
2 Tratamiento	1	12	14.7742	0.0023366	**
3 Tiempo:Tratamiento	2	12	24.5805	5.7048e-05	***

Fig 12. Análisis de rangos alineados (ART) para la cepa de *P. aeruginosa*

Mediante un análisis de contraste se obtuvo que la diferencia significativa se veía en los tratamientos de 2h -4h ($Pvalue=0.0039$) y en los tratamientos de 4h-6h ($P.Value=0.0142$) (Fig. 13).

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
2h - 4h	9.33	2.27	12	4.104	0.0039
2h - 6h	1.67	2.27	12	0.733	0.7492
4h - 6h	-7.67	2.27	12	-3.371	0.0142

Fig. 13. Análisis de contraste para los tratamientos de *P. aeruginosa*.

Por último, al realizar la gráfica se observó que entre los datos de control y voltaje de 2h de aplicación no se encontró una diferencia significativa a pesar de que las UFC sí disminuyeron. Para los tratamientos de 4h y 6h sí hubo diferencia significativa, donde tras

4h de aplicación las UFC tuvieron una marcada disminución frente a las UFC del control, por el contrario, el tratamiento de 6h tuvo un aumento de UFC tras la aplicación del campo eléctrico generando (Fig. 14)

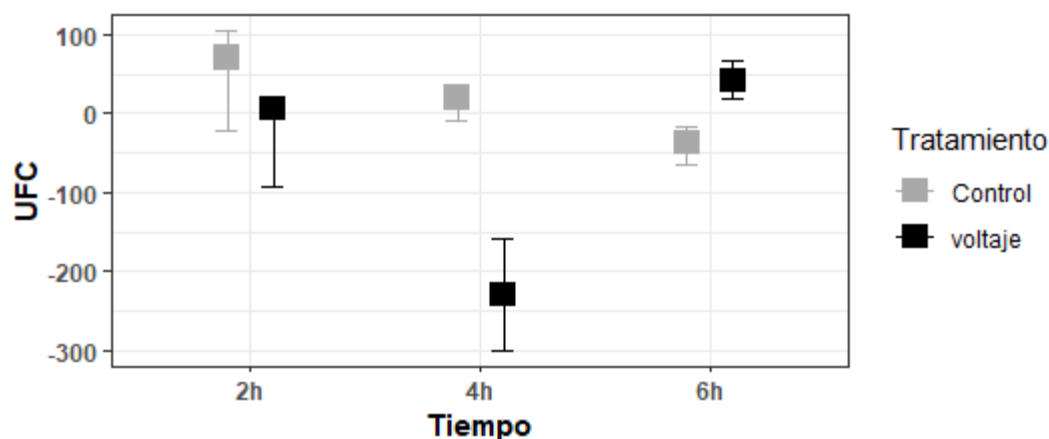


Fig. 14. Cambio en las UFC de *P. aeruginosa*. Tras los 3 tratamientos (2h, 4h y 6h), y sus respectivos controles.

Acinetobacter spp

Al realizar el de ANOVA para la cepa de *Acinetobacter spp* no se observó diferencia significativa en para el tiempo, ni para el tratamiento; sin embargo, se observó una diferencia significativa en la interacción entre tiempo y tratamiento (Pr= 0.0167) (Fig. 13A). Los análisis post-hoc tanto para el factor tiempo como para el factor tratamiento no mostraron diferencias significativas (Fig 15B y 15C).

A						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F	value	Pr(>F)
Tiempo	2	681	341	0.221	0.8047	
Tratamiento	1	1721	1721	1.118	0.3113	
Tiempo:Tratamiento	2	18072	9036	5.868	0.0167	*
Residuals	12	18479	1540			

B			UFC groups
6h	-7.00000		a
4h	-17.33333		a
2h	-21.66667		a

C			UFC groups
voltaje	-5.55556		a
Control	-25.11111		a

Fig 15. (A) ANOVA de *Acinetobacter spp* (B) Análisis post-hoc de *Acinetobacter spp*. Agrupada por tratamientos (2h, 4h y 6h). (C) Análisis post-hoc de *Acinetobacter spp* Agrupada por grupos control y voltaje.

Teniendo en cuenta lo anterior, se procedió a realizar comparaciones simples dentro de cada tiempo para evaluar el efecto específico de cada tratamiento. Mediante este análisis se observó diferencia significativa tras una aplicación de campo eléctrico de 2h (Pvalor=0.0495), los tratamientos de 4h y 6h no mostraron una disminución significativa, sin

embargo, si se obtuvo una disminución dando PValores marginales (P. value-4h= 0.0579 y P. value-6h= 0.0797). (Fig. 16)

```
$contrasts
Tiempo = 2h:
contrast      estimate SE df t.ratio p.value
Control - voltaje      70.0 32 12   2.185  0.0495

Tiempo = 4h:
contrast      estimate SE df t.ratio p.value
Control - voltaje     -67.3 32 12  -2.101  0.0574

Tiempo = 6h:
contrast      estimate SE df t.ratio p.value
Control - voltaje     -61.3 32 12  -1.914  0.0797
```

Fig. 16. Análisis de comparaciones simples para cada tratamiento entre los grupos control y voltaje.

Por último, en la gráfica se observa una diferencia bastante marcada entre el control y tratamiento de 2h de aplicación. Mientras que, en los tratamientos de 4h y 6h el valor de UFC fue mayor frente a su respectivo control. (Fig. 17).

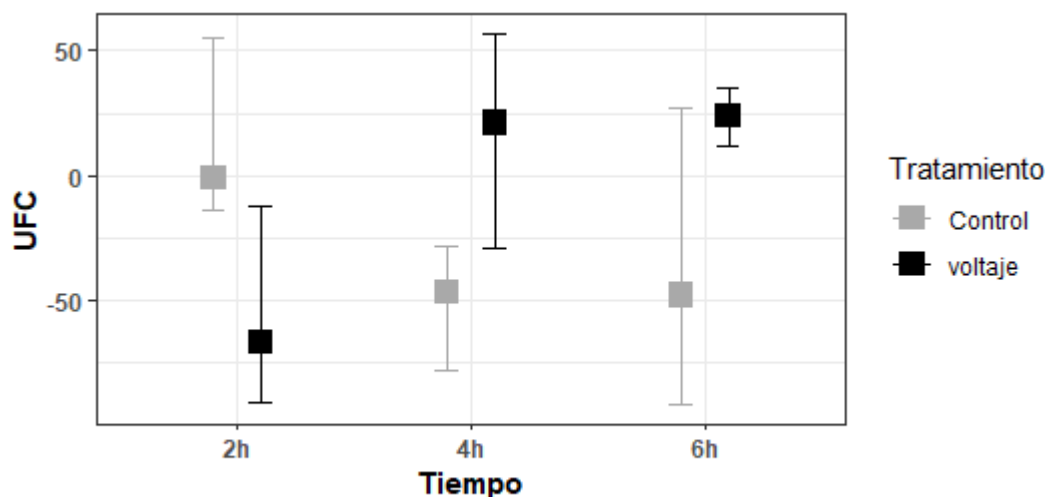


Fig 17. Cambio en las UFC de *Acinetobacter spp.* Tras los 3 tratamientos (2h, 4h y 6h), y sus respectivos controles.

Klebsiella spp.

Al realizar el ANOVA para la cepa de *Klebsiella spp.* Se obtuvo una diferencia significativa entre los diferentes tiempos y entre el control y tratamiento (Pr <0.05); sin embargo, la interacción no muestra una diferencia significativa marcada, aunque existe una tendencia a la disminución de UFC (Pr= 0.08395) (Fig. 18A). Con el fin de observar las diferencias con mayor detalle se realizaron las pruebas de comparación de Duncan y Tukkey

(Fig. 18B y 18C), donde se observó una diferencia significativa entre el tratamiento de 2h, con los tratamientos de 4h y 6h, mostrando una mayor disminución de UFC tras 2h de aplicación, mientras que en los tratamientos de 4h y 6h la disminución fue menor (Fig. 18). Por otro lado, también se realizó la comparación entre tratamientos y control, mostrando una diferencia significativa entre estos dos ya que al aplicar el campo eléctrico las UFC disminuían dejando resultados negativos, mientras que el control mantenía resultados positivos indicando un aumento en las UFC (Fig. 18C)

A		Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Tiempo		2	110354	55177	7.243	0.00865	**
Tratamiento		1	50139	50139	6.582	0.02475	*
Tiempo:Tratamiento		2	46735	23367	3.067	0.08395	.
Residuals		12	91415	7618			

B		UFC groups
4h	27.166667	a
6h	4.333333	a
2h	-149.166667	b

C		UFC groups
Control	13.55556	a
voltaje	-92.00000	b

Fig 18. (A) ANOVA *Klebsiella spp.* (B) Análisis post-hoc de *Klebsiella spp.* Agrupada por tratamientos (2h, 4h y 6h). (C) Análisis post-hoc de *Klebsiella spp.* Agrupada por grupos control y voltaje.

En la siguiente gráfica se observa la marcada disminución de UFC a las 2h del tratamiento; mientras que a las 4h y 6h, aunque sí disminuyen las UFC la diferencia no es significativa debido a la desviación de los datos (Fig 19).

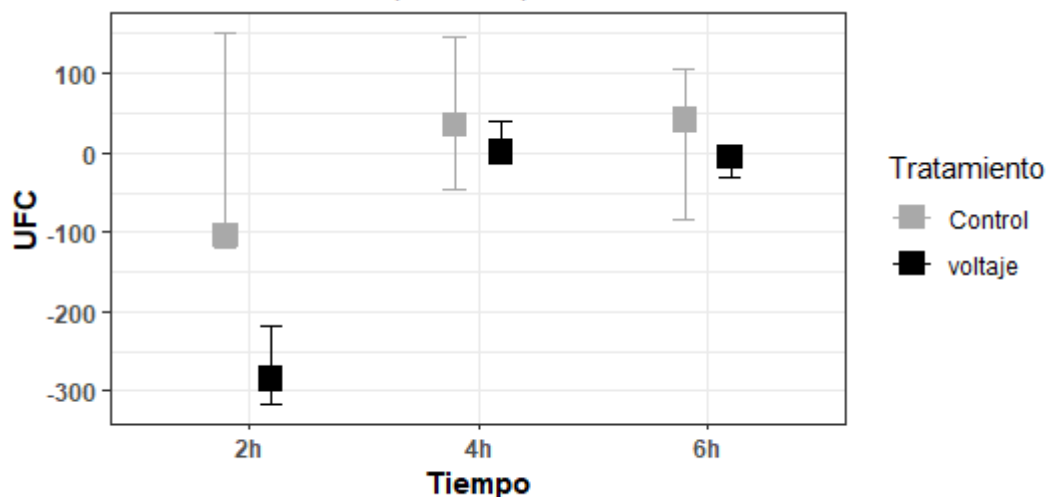


Fig. 19. Cambio en las UFC de *Klebsiella spp.* Tras los 3 tratamientos (2h, 4h y 6h), y sus respectivos controles.

Pruebas bioquímicas

Los resultados de las pruebas bioquímicas antes y después de cada tratamiento mostraron ligeras diferencias en las cepas de *E. coli* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa*., y *Acinetobacter sp* (Fig 20). Para la cepa de *E. coli* ATCC se mostró que luego del tratamiento de 6h esta pierde la capacidad de producir indol (Fig 20B). En la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. La cepa pierde la capacidad oxidativa tras el tratamiento de 2h, mientras que los tratamientos de 4h y 6h conserva la capacidad oxidativa (Fig 20C). Por último, para la cepa de *Acinetobacter spp.* Se mostró un ligero cambio en la capacidad de usar citrato tras la aplicación de 2h y 4h de tratamiento; sin embargo, esta capacidad se mantuvo en el tratamiento de 6h (Fig 20E).

<i>E. coli</i>	Control	T. 2h	T. 4h	T. 6h
TSI	pos 3	pos 3	pos 3	pos 3
CIT	neg	neg	neg	neg
Motilidad	pos	pos	pos	pos
Sulfuro	neg	neg	neg	neg
Indol	pos	pos	pos	pos
UREA	neg	neg	neg	neg
Oxidasa	neg	neg	neg	neg

A

<i>E. coli</i> ATCC	Control	T. 2h	T. 4h	T. 6h
TSI	Pos 3	Pos 3	Pos 3	Pos 3
CIT	neg	neg	neg	neg
Motilidad	Pos	Pos	Pos	pos
Sulfuro	neg	neg	neg	neg
Indol	Pos	Pos	Pos	neg
UREA	neg	neg	neg	neg
Oxidasa	neg	neg	neg	neg

B

<i>P. aeruginosa.</i>	Control	T. 2h	T. 4h	T. 6h
TSI	neg	neg	neg	neg
CIT	neg	neg	neg	neg
Motilidad	pos	pos	pos	pos
Sulfuro	neg	neg	neg	neg
Indol	neg	neg	neg	neg
UREA	neg	neg	neg	neg
Oxidasa	pos	neg	pos	pos

C

<i>Klebsiella spp.</i>	Control	T. 2h	T. 4h	T. 6h
TSI	pos 3	pos 3	pos 3	pos 3
CIT	neg	neg	neg	neg
Motilidad	pos	pos	pos	pos
Sulfuro	neg	neg	neg	neg
Indol	neg	neg	neg	neg
UREA	pos	pos	pos	pos
Oxidasa	neg	neg	neg	neg

D

<i>Acinetobacter spp.</i>	Control	T. 2h	T. 4h	T. 6h
TSI	neg	neg	neg	neg
CIT	pos	+-	+-	pos
Motilidad	neg	neg	neg	neg
Sulfuro	neg	neg	neg	neg
Indol	neg	neg	neg	neg
UREA	neg	neg	neg	neg
Oxidasa	neg	neg	neg	neg

E

Fig 20. Pruebas bioquímicas tras la aplicación de cada uno de los tratamientos (2h, 4h y 6h), y para cada cepa evaluada. (A) Pruebas bioquímicas para *E. coli*. (B) Pruebas bioquímicas para *E. coli* ATCC. (C) Pruebas bioquímicas para *P. aeruginosa*. (D) Pruebas bioquímicas para *Klebsiella spp.* (E) Pruebas bioquímicas para *Acinetobacter spp.*

Pruebas de sensibilidad

Tras la aplicación de pruebas de sensibilidad para las cepas de *E. coli* se encontró un cambio en la sensibilidad de CIP, FEP, CN, CRO y TZP tras la aplicación de tratamiento de 2h, generando una mayor resistencia de la cepa; sin embargo, la aplicación de los tratamientos de 4h y 6h la sensibilidad de la cepa se mantuvo en sensible e intermedio (Fig. 21A). Para la cepa de *E.coli* ATCC se evidenció un cambio en la sensibilidad tras la aplicación de los tratamientos de 4h y 6h donde la cepa volvió resistente para los antibióticos CIP, FEP y CN (Fig.21B). Para la cepa de *P. aeruginosa*. Presenta una resistencia basal a cefalosporinas (FEP, CRO, TZP), pero sigue sensible a carbapenémicos y algo a quinolonas. Donde inicialmente pudo establecerse un halo de inhibición; sin embargo, la bacteria creció nuevamente sobre el halo formado (Fig. 21C). Para la cepa de *Klebsiella spp.* Se encontró que la cepa es resistente para gran parte de los antibióticos, y adaptada totalmente a CRO y posible adaptación al TZP; por otro lado, para IPM se encontró una resistencia intermedia en la cepa control, mientras que tras la aplicación de los tratamientos de 2h, 4h y 6h la cepa se volvió sensible (Fig. 21D). Por último, la cepa de *Acinetobacter spp.* mostró una resistencia para varios beta-lactámicos; sin embargo, como se observa en TZP se puede observar un cambio de resistente a intermedio tras la aplicación del tratamiento de 6h (Fig. 21E).

<i>E. Coli</i>	Control	T. 2h	T. 4h	T. 6h
CIP (mm)	2,5	1	2,8	3
FEP (mm)	2	0,7	2,3	2,4
CN (mm)	2	0,5	2,1	1,9
CRO (mm)	2,5	1	3,2	3
TZP (mm)	1,4	0,5	2	2,1
IPM (CMI)	1	0,5	0,5	1
MEM (CMI)	0,094	0,008	0,094	0,064

A

<i>P. aeruginosa.</i>	Control	T. 2h	T. 4h	T. 6h
CIP (mm)	3	2,6	2,6	2,6
FEP (mm)	0	0	0	0
CN (mm)	1,8	1,6	1,8	1,6
CRO (mm)	0	0	0	0
TZP (mm)	0	0	0	0
IPM (CMI)	4	4	2	6
MEM (CMI)	0,25	0,5	0,5	0,25

C

<i>E. Coli</i> ATCC	Control	T. 2h	T. 4h	T. 6h
CIP (mm)	3,2	3,2	1,6	1,6
FEP (mm)	3	3	1,4	1,8
CN (mm)	2	1,8	1,4	1,2
CRO (mm)	2,8	2,6	2,6	2,2
TZP (mm)	2,2	2	2	1,8
IPM (CMI)	0,25	0,25	1	1
MEM (CMI)	0,015	0,015	0,015	0,03

<i>Klebsiella spp.</i>	Control	T. 2h	T. 4h	T. 6h
CIP (mm)	1,8	1,5	2	2
FEP (mm)	0	0	1,5	0
CN (mm)	1,1	1,3	1,2	1,1
CRO (mm)	0	0	0	0
TZP (mm)	0	1,6	0	0
IPM (CMI)	2	1	1	1
MEM (CMI)	0,19	0,19	0,19	0,125

D

<i>Acinetobacter spp.</i>	Control	T. 2h	T. 4h	T. 6h
CIP (mm)	1.6	1.8	1.9	2
FEP (mm)	1.5	1.5	1.9	1.9
CN (mm)	1.2	1,1	1.5	1.3
CRO (mm)	2.3	2.2	2.4	2
TZP (mm)	0	0	0	1.9
IPM (CMI)	0.5	1	0.5	1
MEM (CMI)	0.125	0.047	0.047	0.047

E

Fig 21. Pruebas de sensibilidad tras la aplicación de cada uno de los tratamientos (2h, 4h y 6h), y para cada cepa evaluada. **CRO:** Ceftriaxona (30 µg), **CN:** Gentamicina (10 µg), **FEP:** Cefepime (30 µg), **CIP:** Ciprofloxacina (5 µg), **TZP:** piperacilina / tazobactam (100 µg), **MER:** Meropenem (E-test), **IMI:** Imipenem (E-test). Sensible: Verde, Intermedio: Rosado, Resistente: Rojo. (A) Pruebas de sensibilidad para *E. coli*. (B) Pruebas de sensibilidad para *E. coli* ATCC. (C) Pruebas de sensibilidad para *P. aeruginosa*. (D) Pruebas de sensibilidad para *Klebsiella spp.* (E) Pruebas de sensibilidad para *Acinetobacter sp*

Discusión

La aplicación de campos eléctricos ha sido usada constantemente para la desinfección de superficies y alimentos; sin embargo, últimamente se han realizado estudios sobre el efecto de los campos eléctricos y electromagnéticos en el funcionamiento de las células bacterianas, en aspectos sobre su morfología, crecimiento, efectos en el ADN y susceptibilidad a antimicrobianos (Hosny et al., 2025). En el presente estudio se realizó la aplicación de campos eléctricos pulsados a 10V provocando una disminución en el crecimiento bacteriano, en la cepa de *E. coli* ATCC se observó una ligera disminución tras la aplicación de 4h y 6h, a pesar de no tener una diferencia significativa, cuando el tiempo de exposición al campo eléctrico era mayor se generaba una mayor disminución en las UFC del voltaje frente a las UFC del control (Fig 8). Similar se observó en las cepas de *E. coli* donde las UFC disminuían en mayor medida con un tiempo de exposición mayor; sin embargo, en esta cepa no se muestran valores significativos entre las UFC del control y las UFC del voltaje (Fig. 11). Los efectos eléctricos en *E. coli* pueden variar a nivel de cepa debido a los factores de ambiente en los que se hayan recolectado cada una de las cepas, además, el proceso de electroporación en esta bacteria se da a partir de 10–20 kV/cm de intensidad dentro de 10–40 pulsos de 30–500 μ s de longitud, por lo cual no es posible decir que en este caso existe una electroporación irreversible, ya que el voltaje aplicado fue en gran medida menor (Rockenbach et al., 2019).

En las cepas de *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa*. Y *Acinetobacter spp.* Se observó una diferencia significativa tras la exposición de 2h (*Klebsiella spp.* y *Acinetobacter spp.*), y 4h (*P. aeruginosa*). Debido al voltaje aplicado (10V) es posible que los efectos no persistieran por lo cual únicamente se ve una disminución marcada en estos intervalos de tiempo (2h y 4h), mientras que la aplicación de 6h no mostró un efecto, al contrario, permitió un crecimiento normal de las cepas (Fig. 19, 14 y 17, respectivamente). Para cada microorganismo es necesario una intensidad distinta dependiendo del diámetro celular, como se menciona en Rockenbach, y colaboradores (2019), donde *S. cerevisiae* tiene un diámetro aproximadamente 4 veces mayor que *E. coli*, lo cual reduce significativamente la intensidad de campo requerida, así mismo la fuerza iónica del medio en el cual se esté aplicando el campo eléctrico el tener una mayor fuerza iónica aumenta la conductividad y, por lo tanto, reduce el voltaje/intensidad de campo necesario para la electroporación irreversible. Teniendo en cuenta estos aspectos de variabilidad en el presente estudio no se alcanza a lograr una electroporación irreversible, por lo cual lo que logra es una estimulación subletal donde el crecimiento se inhibe momentáneamente (Wang et al., 2017).

El efecto subletal en una célula es el punto final de diversos eventos de señalización, donde se afectan factores de crecimiento, funcionamiento de diversas rutas metabólicas, producción de energía, además, también se pueden observar en los cambios metabólicos adaptativos generados como consecuencia de la expresión génica en las células expuestas a factores de estrés, como el tratamiento con PEF (Wang et al., 2017). En un estudio realizado por Wang, y colaboradores (2017) se observó que la proporción de células con lesiones subletales (CSI) alcanzó un máximo tras 50 pulsos a 12,0 kV/cm para *S. cerevisiae* y 16,5 kV/cm para *Dekkera bruxellensis*, Lo cual permite ver que en la electroporación es posible que ocurra una re-contaminación.

Las células bacterianas al ser expuestas a frecuencias entre 45-60Hz tienden a ser más sensibles a la permeabilización durante la fase de latencia y la fase exponencial, mientras que durante la fase estacionaria no ocurre este proceso (Loghavi et al., 2009; Loghavi et al., 2007). Al ser sometidas a este tratamiento puede ocurrir una hiperpolarización de la membrana, lo cual afecta su potencial y asimismo el sistema de transporte de iones generando un daño celular, lo cual ha logrado la disminución durante los primeros momentos de la aplicación del campo eléctrico (Hosny et al., 2025). Así mismo, las proteínas aumentan en la membrana celular conforme envejece la célula, por lo tanto, el contenido lipídico disminuye haciendo que esta pierda su fluidez y asimismo su tasa de permeabilidad, explicando así el cambio en el crecimiento celular (Loghavi et al., 2009; Loghavi et al., 2007).

Las capacidades metabólicas de las cepas evaluadas no presentaron un cambio significativo en la mayoría de las pruebas bioquímicas aplicadas. Este resultado puede interpretarse como una consecuencia de la insuficiencia en la exposición a los campos eléctricos, ya que la duración e intensidad del tratamiento aplicado en este estudio podrían no haber sido lo bastante altas para inducir un efecto metabólico evidente. En este sentido, Hosny y colaboradores (2025) reportaron que la producción de proteasa extracelular se vio significativamente afectada únicamente tras exposiciones prolongadas de 6 y 12 horas, lo que sugiere que los tratamientos más cortos, como los empleados en nuestro trabajo, pueden no alcanzar el umbral necesario para generar alteraciones medibles.

En relación con la prueba de oxidasa, los resultados obtenidos refuerzan esta interpretación. Aunque a las 2 horas de exposición se observó una reducción en la producción de la enzima, dicha variación no fue suficiente para considerarse estadísticamente significativa. Sin embargo, al extender la exposición a 4 y 6 horas se detectó un cambio hacia la positividad en la producción de oxidasa (Fig. 20C). Este comportamiento podría explicarse considerando que las enzimas, en general, suelen presentar una mayor resistencia a la inactivación mediante campos eléctricos pulsados (PEF) en comparación con las células microbianas, debido a factores como la intensidad del campo, la duración de la aplicación y la forma del pulso, tal como lo señalan Ohshima y colaboradores (2007).

Adicionalmente, debe considerarse que el comportamiento de la oxidasa no necesariamente refleja una pérdida total de actividad enzimática, sino más bien una dinámica de regulación genética. De acuerdo con lo propuesto por diversos autores, la expresión de los genes que codifican para oxidasa podría tener un carácter compensatorio, es decir, que, ante la pérdida funcional o disminución en la producción de una oxidasa específica, el microorganismo activa rutas alternativas que inducen la síntesis de otras oxidasas, de manera que el efecto neto no se traduce en un cambio significativo. Esta capacidad de compensación metabólica explicaría por qué, aun cuando se observa una tendencia inicial a la disminución, posteriormente se recupera la actividad detectable de la enzima tras tiempos de exposición más prolongados.

Por último, otro aspecto a considerar es la posible integridad de los canales encargados de la excreción de enzimas extracelulares. Es probable que la intensidad del tratamiento aplicado en este estudio no haya alcanzado el umbral necesario para producir daños estructurales en dichos canales, lo que se traduciría en una liberación enzimática sin alteraciones significativas. Esta hipótesis encuentra sustento nuevamente en lo reportado por Hosny y colaboradores (2025), quienes describieron que únicamente exposiciones de mayor

intensidad o duración provocaron alteraciones marcadas en la secreción de proteasas extracelulares. En conjunto, todos estos elementos sugieren que la combinación de factores relacionados con la intensidad del tratamiento, la capacidad de compensación genética y la resistencia intrínseca de las enzimas explican la ausencia de cambios significativos en la mayoría de las pruebas bioquímicas realizadas.

Los resultados obtenidos evidenciaron que la susceptibilidad a antibióticos frente a la exposición a campos eléctricos varió según la especie bacteriana. En *E. coli* se observó un aumento en la sensibilidad a ciprofloxacina (CIP) y piperacilina/tazobactam (TZP), alcanzando un perfil susceptible tras 6 h de exposición. Este hallazgo sugiere que los campos eléctricos pueden inducir modificaciones en la permeabilidad de la membrana bacteriana, facilitando el ingreso de moléculas antibióticas. Sin embargo, en la cepa de referencia *E. coli* ATCC se evidenció el efecto contrario, ya que los halos de inhibición disminuyeron tras 4 y 6 h de tratamiento, lo que se interpreta como la activación de un mecanismo defensivo adaptativo que limita el efecto de los antibióticos (Hosny et al., 2025). Como se menciona en Mohamed y colaboradores (2024), la diferencia entre cepas se atribuye a procesos de especialización de nicho debido a los puntos de aislamiento de cada una de las cepas, donde aquella con mayor contacto y cercanía a los antibióticos presentará una mayor resistencia a los mismos.

En *Acinetobacter spp.* se registró un cambio de resistencia a un perfil intermedio para CIP, FEP, CN y TZP. Estos resultados pueden estar relacionados con alteraciones en los canales iónicos y en la integridad de la pared celular, ya que la exposición a campos eléctricos se asocia con la generación de poros transitorios que facilitan la difusión de antibióticos hacia el interior celular (Hosny et al., 2025). Por el contrario, en *P. aeruginosa.* y *Klebsiella spp.* no se observaron variaciones significativas en la susceptibilidad bajo ninguno de los tiempos evaluados. Estos datos concuerdan con estudios previos donde exposiciones de 6 a 12 h a campos electromagnéticos no modificaron de manera notable la susceptibilidad antibiótica en *P. aeruginosa.*, atribuyéndose este comportamiento a la capacidad de reparación de la membrana y a mecanismos de defensa que permiten una respuesta adaptativa sin cambios detectables (Salmen et al., 2018; Segatore et al., 2012). Por último, la exposición de campos eléctricos de baja frecuencia genera una interacción entre la membrana con el antibiótico, en el caso de los aminoglucósidos se presenta una unión reversible, dependiente de los componentes aniónicos de la membrana, es decir, al aplicar el campo eléctrico es posible que haya una alteración de cargas modificando la velocidad de penetración y la eficacia del tratamiento. Adicionalmente, se ha reportado que los ELF-EMF afectan la agregación de proteínas intramembrana y la síntesis de mucopéptidos, lo que podría incrementar la vulnerabilidad a inhibidores de la síntesis proteica o de la pared celular (Mohamed et al., 2024; Salmen et al., 2018).

Conclusiones y recomendaciones

La aplicación de campos eléctricos pulsados a una intensidad de 10V y 60 Hz, generó efectos subletales inhibiendo temporalmente el crecimiento bacteriano. Estos efectos tuvieron una variación de respuesta siendo dependientes tanto del tiempo de exposición como de la especie bacteriana, mostrando variabilidad en la respuesta incluso entre cepas de una misma especie. En *E. coli* y *Klebsiella spp.*, se observó una disminución significativa en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) durante las primeras horas de exposición, con una tendencia a la recuperación en tiempos prolongados. En las cepas de *P. aeruginosa*, la inhibición del crecimiento fue evidente a las 4 h, aunque posteriormente la bacteria mostró capacidad de recuperación; por último, en *Acinetobacter spp.*, la inhibición inicial fue notoria a las 2 h, pero no se mantuvo en exposiciones más largas.

A nivel metabólico las pruebas bioquímicas no variaron significativamente, lo que indica que la intensidad y tiempo de exposición fueron insuficientes para inducir alteraciones metabólicas. Por último, la exposición a campos eléctricos pulsados influyó en la susceptibilidad antibiótica de forma diferenciada. En cuanto *E. coli* se evidenció un aumento en la sensibilidad frente a ciprofloxacina y piperacilina/tazobactam, así como un cambio de resistencia a intermedia en *Acinetobacter spp.* para TZP tras 6 h. En *P. aeruginosa* y *Klebsiella spp.* no se observaron modificaciones relevantes.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son particularmente significativos al ser pionero en el uso de campos eléctricos mediante el cual se evidencia el potencial de esta tecnología como estrategia complementaria a la terapéutica antimicrobiana convencional. Se propone realizar estudios con un mayor tiempo de exposición, asimismo una intensidad de exposición mayor esperando lograr una electroporación irreversible sin generar cambios de temperatura altos. Por otro lado, es necesario explorar la efectividad de los tipos de estímulo (campos eléctricos estáticos, pulsados y electromagnéticos), con el fin de observar un efecto diferencial en los tipos de estímulo. Por último, también es necesario explorar el efecto sinérgico de los antibióticos y la aplicación de campos eléctricos, con lo cual se podría reducir la dosis efectiva en las bacterias y, contribuir a disminuir la presión selectiva sobre los microorganismos. De esta forma, se espera lograr avances en esta alternativa biotecnológica innovadora con potencial impacto en la salud pública y en la búsqueda de soluciones contra las infecciones causadas por agentes bacterianos resistentes y multirresistentes.

Referencias

- Bergogne-Bérézin, E., & Towner, K. (1996). *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical microbiology reviews*, 9(2), 148–165.
- Cabrera, C., Gómez, R., & Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfecta manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2), 149-158.
- Cantón, R. (2010). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(6), 375–385.
- Chávez M. (2025) Efecto de corriente eléctrica y nanopartículas de cobre sobre *pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente. [Tesis Maestría Universidad Autónoma de Chihuahua].
- Chittams-Miles AE, Malik A, Purcell EB, Muratori C. (2024). Nanosecond pulsed electric fields increase antibiotic susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectre* 12: e02992-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02992-23>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
- Fariñas, M., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 402–409.
- Fernández, A. (2021). Revisión bibliográfica: alternativas a los antibióticos ante la aparición de la multirresistencia bacteriana. [Tesis de grado: Universidade da coruña]
- García, S., Freyre, R., Fernández, S., Dager, M., & García, I. (2010). Eficacia del uso de ozonoterapia, magnetismo y electroestimulación en pacientes con retinosis pigmentaria y glaucoma. *MEDISAN*, 14(4).
- Golberg, A.; Yarmush, M. (2013). Nonthermal Irreversible Electroporation: Fundamentals, Applications, and Challenges. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 60(3), 707–714. doi:10.1109/TBME.2013.2238672
- Golberg, A., Broelsch, G. F., Vecchio, D., Khan, S., Hamblin, M. R., Austen, W. G., Jr, Sheridan, R. L., & Yarmush, M. L. (2014). Eradication of multidrug-resistant *A. baumannii* in burn wounds by antiseptic pulsed electric field. *Technology*, 2(2), 153–160.

Golberg A, Broelsch GF, Vecchio D, Khan S, Hamblin MR, Austen WG Jr, Sheridan RL, Yarmush ML. (2015). Pulsed electric fields for burn wound disinfection in a murine model. *J Burn Care Res.* 36(1):7-13. doi: 10.1097/BCR.0000000000000157.

González, E. (2015). Biological effects of biomagnetic pair therapy. [Tesis de doctorado: Universidad de Alcalá]

Gusbeth, C., Frey, W., Volkmann, H., Schwartz, T., & Bluhm, H. (2009). Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater. *Chemosphere*, 75(2), 228–233. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11

Hidalgo de Paz, A. (1995). Reacción posquirúrgica del lecho vascular inducida por el campo magnético de ultra-alta frecuencia. *Revista Cubana de Cirugía*, 34(1)

Hidalgo de Paz, A., González, M., & Quiñonez, A. (2001). Acción del campo magnético de baja frecuencia en la cicatrización de la piel. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(3), 178-183.

Hosny, M., Elnakib, M., & Gad, A. (2025). Extremely low frequency electromagnetic field affects virulence and antibiotic susceptibility of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-6791184/v1]

Jaramillo, S. (2009). Prueba Epsilon (Etest). *CES Medicina*, 12(1), 34–41.

Kuang, J., Ying L., Li W., Zikang Y., Jinmei W., Jin D. y Zongjun L. (2024). “Efectos del PEF sobre la célula y la transcriptómica de *Escherichia coli* ” *Microorganismos* 12, no. 7: 1380. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071380>

Lai H, Singh NP. (2004). Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environ Health Perspect*, 112(6), 687-94.

León, E. (2025). *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en los sistemas de aguas hospitalarios. [Tesis de grado: Universidad de la Laguna]

Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2018). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*.

Loghavi L, Sastry SK, Yousef AE. (2009). Effect of moderate electric field frequency and growth stage on the cell membrane permeability of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnol Prog.* Jan-Feb;25(1):85-94. doi: 10.1002/btpr.84.

López-Velandia, D., Torres-Caycedo, M., & Prada-Quiroga, C. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Universidad y Salud*, 18(1), 190-202.

Mohamed, D.H., Mohammed, H., El-Gebaly, R.H. (2024). Pulsed electric field at resonance frequency combat *Klebsiella pneumonia* biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* **108**, 505. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13330-z>

Mosqueda-Melgar, J., Elez-Martínez, P., Raybaudi-Massilia, R. M., & Martín-Belloso, O. (2008). Effects of Pulsed Electric Fields on Pathogenic Microorganisms of Major Concern in Fluid Foods: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(8), 747–759. doi:10.1080/10408390701691000

Munita, J., & Arias, C. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2).

Novickij V, Zinkevičienė A, Perminaitė E, Čėsna R, Lastauskienė E, Paškevičius A, Švedienė J, Markovskaja S, Novickij J, Girkontaitė I. (2018). Non-invasive nanosecond electroporation for biocontrol of surface infections: an in vivo study. *Sci Rep*. 28;8(1):14516. doi: 10.1038/s41598-018-32783-7.

Ohshima, T., Tamura, T., & Sato, M. (2007). *Influence of pulsed electric field on various enzyme activities.* , 65(3), 156–161. doi:10.1016/j.elstat.2006.07.005

Paz, E., De León Pandolfi, D., & Ramírez, R. (2008). Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. *Acta Médica Peruana*, 25(3), 140-147.

Perminaitė E, Zinkevičienė A, Malyško-Ptašinskė V, Radzevičiūtė E, Novickij J, Girkontaitė I, Novickij V. (2023). Killing Bacteria Using Acetic Acid and Nanosecond Pulsed Electric Fields—An In Vivo Superficial Infection Model Study and Immune Response. *Applied Sciences*. 13(2):836. <https://doi.org/10.3390/app13020836>

Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H., Dague, E., & Rols, M.-P. (2016). Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep19778

Potenza, L., Cucchiaroni, L., Piatti, E., Angelini, U., & Dachà, M. (2004). Effects of high static magnetic field exposure on different DNAs. *Bioelectromagnetics*, 25(5), 352–355.

Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., & Álvarez, I. (2009). Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 130(1), 49–55. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12

Rems L, Ušaj M, Kandušer M, Reberšek M, Miklavčič D, Pucihar G. (2013). Cell electrofusion using nanosecond electric pulses. *Sci Rep*. 29;3:3382. doi: 10.1038/srep03382.

Rockenbach A, Sudarsan S, Berens J, Kosubek M, Lazar J, Demling P, Hanke R, Mennicken P, Ebert BE, Blank LM, Schnakenberg U. (2019). Microfluidic Irreversible Electroporation-

A Versatile Tool to Extract Intracellular Contents of Bacteria and Yeast. *Metabolites*. Sep 30;9(10):211. doi: 10.3390/metabo9100211.

Salmen SH, Alharbi SA, Faden AA, Wainwright M. (2018). Evaluation of effect of high frequency electromagnetic field on growth and antibiotic sensitivity of bacteria. *Saudi J Biol Sci*. Jan;25(1):105-110. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.07.006.

Sandvik EL, McLeod BR, Parker AE, Stewart PS. (2018). Direct electric current treatment under physiologic saline conditions kills *Staphylococcus epidermidis* biofilms via electrolytic generation of hypochlorous acid. *PLoS One*. 8(2): e55118. doi: 10.1371/journal.pone.0055118.

Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología médica*, 2, 631-633.

Segatore B, Setacci D, Bennato F, Cardigno R, Amicosante G, Iorio R. (2012). Evaluations of the Effects of Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields on Growth and Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Microbiol*. 587293. doi: 10.1155/2012/587293.

Serra, M., Baeza-Noci J, Mendes, C., Luisotto, M., Bertol, C. & Anzolin, A. (2023) The role of ozone treatment as integrative medicine. An evidence and gap map. *Front. Public Health* 10:1112296.

Soliz C, Calle C, Coloma E, Plaza A, Castro R. (2022). Prevalencia de gérmenes con multirresistencia antibiótica en bacteriemia asociada a neutropenia febril en pacientes oncológicos hospitalizados. Un estudio de centro único. *Rev. Oncol. Ecu*, 32(2):157-168

Strašák, L., Vetterl, V., & Smarda, J. (2002). Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectrochemistry*, 55(1-2), 161–164.

Tirono, M., Hananto, F. S., & Abtokhi, A. (2022). Pulse Voltage Electrical Stimulation for Bacterial Inactivation and Wound Healing in Mice with Diabetes. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 14(1), 95–101. <https://doi.org/10.18502/ajmb.v14i1.8175>

Vivanco, D., Ardiles, P., Castillo, D., & Puente, L. (2021). Tecnología emergente: Campo de pulsos eléctricos (PEF) para el tratamiento de alimentos y su efecto en el contenido de antioxidantes. *Revista chilena de nutrición*, 48(4), 609-619. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182021000400609>

Wang, M., Wang, L., Bekhit, A., Zhen-Ping Hou, J., Wang, Y., Qiu-ZhongDai, Xin-An Zeng. (2017). A Review of Sublethal Effects of Pulsed Electric Field on Cells in Food Processing, *Journal of Food Engineering*, doi: 10.1016 /j.jfoodeng.2017.11.035

Węsierska, E., & Trziszka, T. (2007). Evaluation of the use of pulsed electrical field as a factor with antimicrobial activity. *Journal of Food Engineering*, 78(4), 1320–1325. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.01.00

Anexos

[Anexos Trabajo de grado Camila Castro Linares](#)