



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

***Diseño De Un Estimulador Acústico De Rango Audible
Para La Evaluación De Su Efecto En La Formación De
Biofilms En Cultivos De Pseudomonas Aeruginosa***

Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Biomédico

que presenta:

Diana Naomi Guevara Mendoza

Asesor(es):

Dr. Daniel Guerra Giraldez
Dr. Richard Alberto Rivera Campos

Lima, 2025

Jurado calificador

Presidente: Dr. Ruth Liliana Cristobal Delgado

Vocal: Mg. Guillermo Alex Yaya Castañeda

Secretario: Dr. Paulo Camilo Alberto Vela Anton



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

*Diseño De Un Estimulador Acústico De Rango Audible
Para La Evaluación De Su Efecto En La Formación De
Biofilms En Cultivos De Pseudomonas Aeruginosa*

Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Biomédico
que presenta:

Diana Naomi Guevara Mendoza

Asesor(es):

*Dr. Daniel Guerra Giraldez
Dr. Richard Alberto Rivera Campos*

Lima, 2025



Informe estándar

Informe en inglés no disponible Más información

16% Similitud

Filtros

estándar

4 Exclusiones

Fuentes

Mostrar las fuentes solepadas

1 Internet
journals.plos.org <1%
6 bloques de texto 100 palabra que coinciden

2 Trabajos del estudiante
University of Birmingham <1%
2 bloques de texto 72 palabra que coinciden

3 Trabajos del estudiante
University of College Cork <1%
1 bloques de bloques 49 palabra que coinciden

DEDICATORIA:

Dedico este trabajo a mis padres por haberme dado la oportunidad de cumplir mis metas. A mi hermano, por siempre creer en mí, espero algún día lograr ser la persona que admiras

AGRADECIMIENTOS:

El camino que cada uno recorre es el resultado de sus decisiones influenciadas por sus experiencias y la crianza que ha recibido. El mío ha sido gracias al infinito apoyo y la educación proporcionada por mis padres, Rosario y Jossephy. Desde el momento en que nací, dedicaron esfuerzos inmensurables para guiarme hacia el éxito y formarme como una mejor persona a lo largo de los años. Como ellos decían: “Queremos que llegues más lejos que nosotros”, en verdad espero no decepcionarlos.

Expreso mi profundo agradecimiento a mi Tía Teresa y mi primo Andy, quienes siempre estuvieron allí para socorrerme en cada situación que los necesitaba, brindándome un apoyo incondicional.

El reconocimiento se extiende al Dr. Daniel Guerra y el Dr. Richard Rivera, cuya guía y la oportunidad brindada fueron fundamentales para llevar a cabo este proyecto. También, quiero agradecer a Frank, cuya colaboración fue esencial para el desarrollo exitoso de una parte significativa de este trabajo. Además, agradecer al Ing. Richard por su asesoramiento en el campo acústico, el cual resulta esencial para el trabajo desarrollado.

No puedo pasar por alto el agradecimiento a mis distinguidos profesores durante mi carrera: Stefano Romero, el Dr. Benjamin Castañeda y la Dra. Fanny Casado. Su contribución marcó el inicio de mi incursión en la investigación durante mis estudios de pregrado.

Cada uno de ustedes ha sido una pieza fundamental en mi camino, y sus influencias han dejado una marca imborrable en mi formación y crecimiento personal y académico.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen.....	1
Abstract.....	2
I. Introducción.....	3
1.1. Mecanosensación celular.....	3
1.2. <i>Biofilms</i>	3
1.2.1. Formación de <i>biofilms</i>	4
1.2.2. Problemáticas asociadas a <i>biofilm</i>	5
1.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.3. Métodos de vibración.....	6
1.3.1. Estimulación por medio de ondas acústicas.....	6
1.3.2. Estimulación por medio de piezo-eléctricos.....	8
1.3.3. Otros métodos de estimulación.....	11
1.4. Simulación por elementos finitos.....	14
II. Hipótesis/Pregunta de investigación y objetivos.....	17
2.1. Pregunta.....	17
2.2. Hipótesis.....	17
2.3. Objetivos.....	17
2.3.1. Objetivo General.....	17
2.3.2. Objetivos Específicos.....	17
III. Materiales y métodos.....	18
3.1. Diseño del sistema de vibración.....	18
3.2. Caracterización del sistema de vibración.....	22
3.2.1. Preprocesamiento de los datos.....	24
3.2.2. Medición de la amplitud.....	25
3.3. Simulación del sistema de vibración.....	26

3.3.1.	Modelo de la estructura 3D.....	27
3.3.2.	Simulación del comportamiento por elementos finitos	30
3.4.	Protocolo para la evaluación del efecto de la vibración sobre la <i>Pseudomona aeruginosa</i>	30
3.4.1.	Cultivo de <i>P. aeruginosa</i>	30
3.4.2.	Medición del <i>biofilm</i> resultante	31
IV.	Resultados.....	32
4.1.	Caracterización del sistema de vibración.....	32
4.1.1.	Amplitud de la vibración de la placa Petri.....	33
4.1.2.	Efecto de la tapa y del fluido sobre la vibración de la placa Petri de poliestireno.....	34
4.2.	Distribución de la vibración en la superficie de la placa Petri.....	35
4.3.	<i>Biofilm</i> formado en los cultivos de <i>P. aeruginosa</i>	43
V.	Discusión	46
VI.	Conclusiones.....	49
VII.	Referencias bibliográficas.....	50
Anexos	57
	Anexo A: Placas de las mediciones realizadas para PAO1 en medio LB	57

Resumen

Diversos estudios demuestran la influencia de los estímulos mecánicos sobre las funciones celulares. En sistemas bacterianos estos estudios son incipientes y no existen dispositivos estandarizados para experimentar con el efecto de las vibraciones sobre cultivos. El objetivo de este proyecto fue el diseño e implementación de un sistema de estimulación acústica asequible, aplicable a experimentos biológicos que interroguen los efectos de vibraciones sobre cultivos bacterianos.

La caracterización del sistema se llevó a cabo utilizando un transductor de velocidad láser, y la simulación de elementos finitos. Estos métodos permitieron evaluar el desplazamiento generado durante la estimulación en un rango de frecuencia de 1000 a 2000 Hz. Con el fin de evaluar la funcionalidad del sistema en experimentos biológicos, se llevaron a cabo cultivos de dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC10145 y PAO1) en diferentes medios y periodos, lo que permitió medir las cantidades de *biofilm* formado en condiciones estimuladas y no estimuladas.

Los resultados obtenidos indican que es posible realizar un movimiento perceptible por la bacteria utilizando parlantes de motor magnético. Es esencial destacar que las vibraciones del sistema son altamente dependientes del material de la superficie utilizado, por lo que se recomienda realizar una caracterización específica para determinar la configuración funcional en cada caso.

Palabras claves: Estimulación acústica, *biofilms*, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

Numerous studies have demonstrated the influence of mechanical stimuli on cellular functions. In bacterial systems, however, such studies remain in early stages, and there are no standardized devices for investigating the effects of vibrations on cultures. The objective of this project was the design and implementation of an affordable acoustic stimulation system applicable to biological experiments exploring the impact of vibrations on bacterial cultures.

The system was characterized by using a laser velocity transducer and finite element simulations. These methods enabled the evaluation of displacement generated during stimulation within a frequency range of 1000 to 2000 Hz. To assess the system's functionality in biological experiments, cultures of two *Pseudomonas aeruginosa* strains (ATCC10145 and PAO1) were grown under different media and durations, allowing for quantification of biofilm formation under stimulated and non-stimulated conditions.

The results indicate that it is possible to produce bacterial-perceptible motion using magnet-driven speakers. It is important to emphasize that the system's vibrations are highly dependent on the surface material, thus specific characterization is recommended to determine optimal configurations for each application.

Keywords: Acoustic stimulation, biofilms, *Pseudomonas aeruginosa*

I. Introducción

La diferenciación celular mediada por estímulos mecánicos es un campo de creciente interés debido a que permite entender la influencia de las señales mecánicas, tales como adhesión y rigidez (1). Sin embargo, el avance de este tipo de estudios en procariotas es limitado y aún más incipiente. Esta brecha se debe, en parte, a las dificultades experimentales para replicar entornos mecánicos específicos y la ausencia de dispositivos comerciales accesibles para tales estudios

El desarrollo de dispositivos especializados para aplicar estímulos mecánicos ha sido costoso y técnicamente desafiante. A pesar de avances recientes en dispositivos microfluídicos y bioreactores para estimular células en tiempo real, la producción y personalización de estos equipos sigue siendo una limitante importante debido a sus altos costos de diseño y fabricación (2).

Este panorama subraya la necesidad de desarrollar tecnologías más accesibles para entender mejor el impacto de los estímulos mecánicos en diferentes tipos celulares.

1.1.Mecanosensación celular

La mecanosensación es la capacidad de las células y tejidos de percibir estímulos mecánicos y convertirlos en señales biológicas (3). Gracias a esto se llevan a cabo una variedad de funciones biológicas como el desarrollo embrionario, la homeostasis tisular, la cicatrización de heridas y la progresión de enfermedades como el cáncer (4). Las células logran detectar señales mecánicas a través de estructuras especializadas, como integrinas, canales iónicos mecanosensibles y complejos de adhesión focal que traducen estas señales físicas en respuestas bioquímicas mediante vías de señalización intracelular (5). Esto se conoce como mecanotransducción e involucra cambios en la organización del citoesqueleto, la activación de proteínas señalizadoras como las quinasas y modificaciones en la expresión génica (6).

1.2.Biofilms

Los *biofilms* son el resultado de varias células que entran en contacto entre ellas y/o con una superficie formando una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (7). En el

caso de bacterias, la transformación de una forma de vida planctónica a otra sésil constituye un cambio análogo a lo que se observa en la diferenciación de células eucariotas de organismos multicelulares. Mediante interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, las bacterias adquieren nuevas propiedades a comparación de las bacterias solas(7)(8). Entre otras ventajas, esta estrategia permite a las bacterias patógenas protegerse del sistema inmune al generar una comunidad que crece en una matriz de exopolisacáridos (8).

1.2.1. Formación de *biofilms*

Un *biofilm* maduro tiene una interacción íntima, fuerte y resistente con la superficie que lo aloja (8,9). Esta interacción, compleja, fuerte y cuasi-irreversible, se desarrolla en tres fases: unión inicial a la superficie, formación de la microcolonia y maduración del *biofilm* (8,9).

a. Unión inicial a la superficie

La unión inicial de las bacterias a una superficie es un proceso crítico que desencadena la formación de *biofilms*, comenzando con la capacidad de las bacterias para detectar y responder a fuerzas de contacto a las superficies bióticas o abióticas mediante la mecanosensación (8–10). En el caso de *P. aeruginosa*, el flagelo es clave para percibir la cercanía de la superficie. El flagelo tiene un ancho alrededor de 20 nm de ancho con una frecuencia de rotación de 300 Hz (11). La resistencia del fluido a la rotación y torsión del flagelo cambia significativamente de magnitud al aproximarse la superficie. Esta diferencia en fuerzas es un gatillo de mecanosensación (10). Si la adherencia de la bacteria a la superficie supera la repulsión electrostática se consigue el estado de adhesión reversible inicial, lo que permite la formación de *biofilms* (12). Las fuerzas que participan en esta parte es la electrostática, interacciones hidrofóbicas y las de Lifshitz-van der Waals; la suma de todas estas son las que logran esta interacción inicial. Estas se pueden ocurrir tanto en una superficie biológica o inerte (13).

b. Formación de la microcolonia

Luego de la unión inicial, la producción de exopolisacáridos asegura la unión por medio de interacciones más fuertes como dipolo-dipolo, iónica, unión covalente, entre otros; que llevan a la adhesión estructural de la bacteria (13,14). Las condiciones necesarias para cada organismo son muy distintas. En caso de la *P. aeruginosa*, en condiciones de crecimiento mínimo, se requiere 136 minutos para la generación de exopolisacáridos (14). Los mecanismos por los cuales se da la formación de la monocapa de las células, es por la migración lenta y la propagación, que son resultado de su crecimiento y división (14), estos mecanismos son regulados por señales célula a célula.

c. Maduración del *biofilm*

Esta etapa involucra distintos procesos para el crecimiento de células adheridas y su maduración formando micro y macrocolonias (9). Además, empiezan a generar protección de agentes antibacterianos y síntesis de exopolisacáridos (9,15).

1.2.2. Problemáticas asociadas a *biofilm*

Los *biofilms* promueven la corrosión a través de la actividad microbiana, provocando daños en maquinaria e infraestructura (16). La actividad microbiana contribuye al 20% de los costos de la corrosión del metal (17), lo que hace varios años representó un costo global de \$300 a \$500 mil millones anuales (7).

Por otro lado, en el área de la salud, los *biofilms* representan un problema significativo, ya que pueden crecer en los pulmones de pacientes con fibrosis quística (18) y/o en el tracto urinario (19) de pacientes de otra forma sanos. En estos casos, es relativamente baja la eficacia de los antibióticos y del sistema inmunitario (20). Del mismo modo, su alta probabilidad de aparición en instrumentos y ambientes hospitalarios aumenta el riesgo en las intervenciones médicas (21).

La eliminación de los *biofilms* requiere diversos métodos agresivos, que incluyen tratamientos químicos, detergentes, calor, entre otros (22). Uno de los métodos utilizados para la eliminación de *biofilms* en caso de infecciones relacionadas con catéteres es la terapia de bloqueo (*lock therapy*) con antibióticos, especialmente utilizada para *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa* (23).

De esta forma se puede observar que los *biofilms* tienen un gran impacto en el campo económico y médico. Por este motivo, se requieren métodos efectivos y avanzados para prevenir la formación de *biofilms*. Esto incluye el desarrollo de nuevas tecnologías y tratamientos que puedan inhibir su crecimiento desde el inicio.

1.2.3. Pseudomonas aeruginosa

La bacteria *P. aeruginosa* se caracteriza y clasifica como aeróbica gram-negativa. Es un organismo que puede sobrevivir en distintos ambientes (24,25) y es uno de los más estudiado en el campo de la biología (26). *P. aeruginosa* se encuentran en distintos ambientes, como tejidos humanos, entornos hospitalarios e incluso en los dispositivos médicos, especialmente aquellos de carácter invasivo (27). Por este motivo, son responsables de entre el 10% y 26% de las infecciones hospitalarias según los estudios realizados en hospitales de Irán y España (24,28–30). Una de sus principales características es su predisposición para la formación de *biofilms*, lo cual representa un grave problema ya que esta formación tiene una muy alta resistencia a antibióticos, bacteriófagos, desinfectantes y afectan el sistema inmune del hospedador (24,27).

1.3. Métodos de vibración

Se revisarán 3 métodos de la generación de vibraciones para estímulo de distintos cultivos, como células o bacterias. Entre ellos se tiene la estimulación mediante ondas acústicas, o actuadores piezo-eléctricos. Para realizar la búsqueda de los estudios se utilizó la herramienta Research Rabbit (enlace: <https://www.researchrabbit.ai/>), para encontrar estudios que vayan en la misma línea de estimulación de cultivos.

1.3.1. Estimulación por medio de ondas acústicas

El estudio de Murphy (31) evalúa los efectos de una vibración acústica a baja frecuencia y amplitud sobre la formación de *biofilm* (31). En este caso se evaluó los efectos sobre la bacteria *P. aeruginosa*, a 100, 800 y 1600 Hz; donde el cultivo se expuso por 48 horas de forma continua (31). La investigación de Murphy genera la señal por medio de un *speaker* conectado a una tarjeta de Arduino que tenía programada la onda acústica con una única potencia de 0.2 W (31). Este sistema fue caracterizado por medio de un vibrómetro laser

Polytec Ltd., el cual permitía medir la amplitud medida por la frecuencia; según su caracterización, al aumentar la frecuencia, la amplitud obtenida disminuía (9×10^{-6} m para 100 Hz y 0.1×10^{-6} m para 1600 Hz), Figura 1 (31). Los resultados de Murphy muestran que la formación de *biofilm* aumenta en densidad óptica en la evaluación por medio del cristal violeta con una frecuencia de 800 Hz (31).

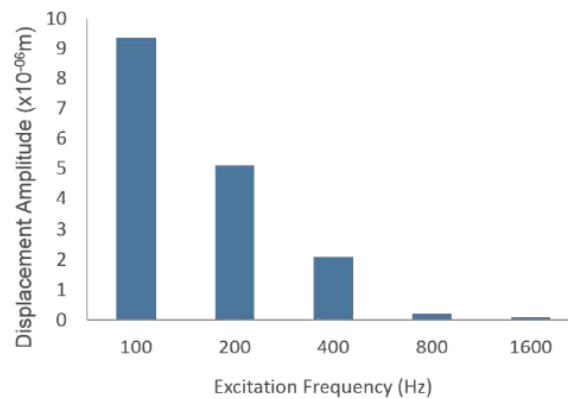


Figura 1: Relación entre desplazamiento de la superficie y frecuencia de la señal de estimulación. Recuperador de (31)

Asimismo, la estimulación acústica también es usada en biorreactores, como en el caso del estudio de Kirsch (32) para la estimulación en el crecimiento de fibroblastos de cuerdas vocales. Ellos utilizan un parlante, el cual tiene un soporte que permite calzar la placa del cultivo celular, Figura 2; a nivel del sistema, se utilizó un amplificador XLS1502, se ofrece una operabilidad hasta 5Hz por lo cual se trabajó ciertas modificaciones que permiten alcanzar valores de 10kHz (32). Es importante mencionar que existe una reducción al 20% de amplitud de vibración con presencia del medio.

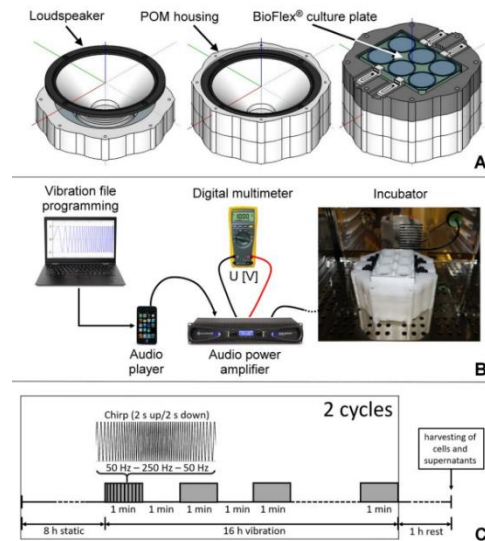


Figura 2: Modelo de estimulación propuesto por Kirsch. (A) Base del parlante con superposición de la placa multipozos. (B) Sistema de estimulación. (C) Modelo de las ondas generadas para el sistema. Recuperado de (32)

1.3.2. Estimulación por medio de piezo-eléctricos

Uno de los estudios con uso de piezo actuadores es el de Nikukar (33), el cual tiene como objetivo observar el efecto de nano vibraciones como de células madre mesenquimales humanas (*human mesenchymal stem cells*, hMSCs). En caso de este estudio se probaron frecuencias de 500 y 1000 Hz con dos opciones de voltaje, 10 y 19 V, la estimulación se mantuvo durante todo el crecimiento de la célula; donde se obtuvieron mediciones a las 24 horas, 1 y 2 semanas (33). Estos regímenes de vibración fueron realizados por medio de piezo actuadores P-010-00H, Physik Instrumente. Estos cuentan con un diámetro interno de 5mm, un externo de 10mm y altura de 7 mm, y fueron conectados a un generador Modelo 33210A (33). La placa Petri fue posicionada sobre el piezo actuador de distintas formas; como se puede visualizar en la Figura 3; esto genera diferencias en la transmisión de la onda (33). Similar a estudios anteriores se hizo una caracterización de un vibrómetro láser SIOS Meßtechnik GmbH, operado a 632.8 nm; de esta forma se observa en la Figura 4 que la amplitud se conserva mejor a lo largo del radio de la placa Petri en presencia del disco de aluminio.

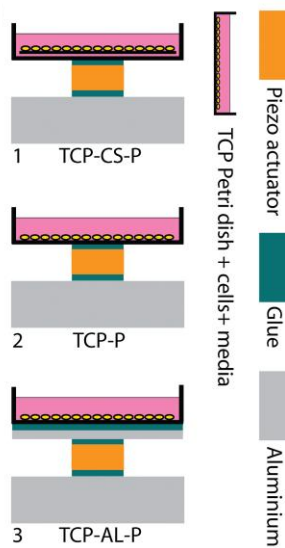


Figura 3: Propuestas de la estructura para la estimulación por medio de piezo eléctricos.

(1) Las células se adhieren a un cubreobjetos. (2) Similar al modelo 1, se retira el cubreobjetos. (3) Similar al modelo 2, se agrega un disco de aluminio. Recuperado de

(33)

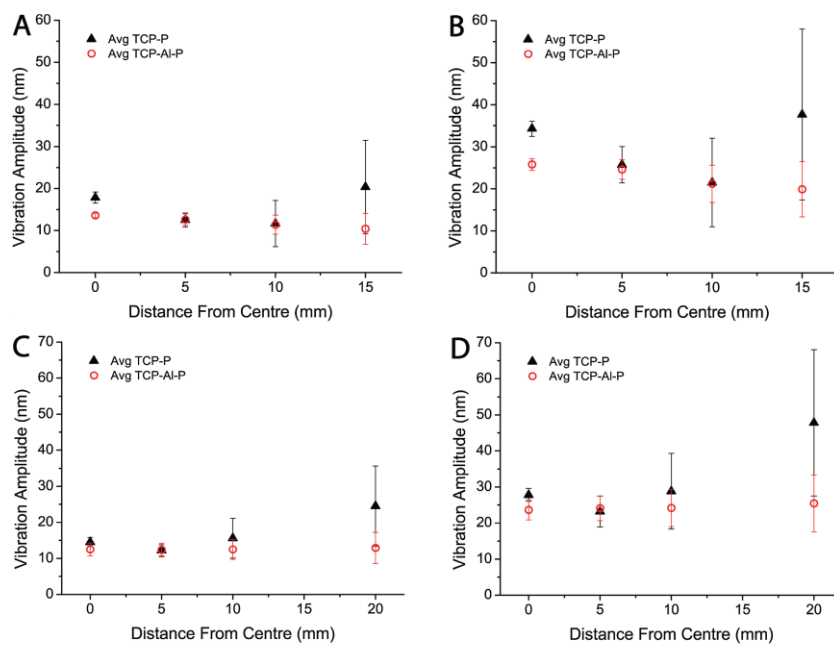


Figura 4: Desplazamientos medidos en las bases de placas Petri. (A) Base de 35mm a 10V. (B) Base de 35 mm a 19V. (C) Base de 52 mm a 10V. (D) Base de 52mm a 19V.

Recuperado de (33)

Otro estudio realizado para el control del crecimiento de MSC es el de Robertson (34) cual busca deformar los discos piezoeléctricos por medio del control del campo eléctrica; de esta forma, las variaciones pueden generar ondas sinusoidales, lo que permite la estimulación por una nano vibración (34). Estos piezo actuadores se unieron a placas Petri y además se pudo adaptar para una placa multipozos; donde su vibración fue medida por medio de un interferómetro láser; acá se pudo observar que al aumentar la cantidad de pocillos el desplazamiento de la vibración aumenta (34). Además, se puede observar según la Figura 5, que el desplazamiento aumenta de forma lineal y positiva con el voltaje de alimentación; no obstante, con la frecuencia; se puede observar que el desplazamiento es menor a medida que este aumenta (34).

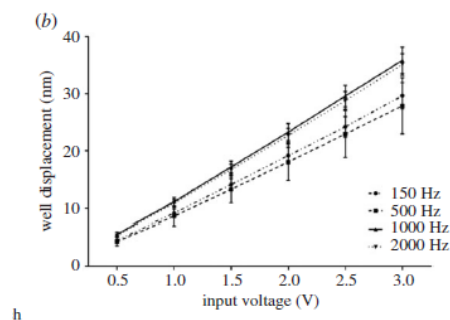


Figura 5: Relación de desplazamiento en la base de los pocillos respecto al voltaje inducido para distintas frecuencias. Recuperado de (34)

En la misma línea, uno de los estudios relacionados con la bacteria *P. aeruginosa*, es el de Robertson (35); el modelo sugerido para la estimulación es el observado en la Figura 6, se cuenta con un transductor piezoeléctrico, un disco de aluminio, la placa Petri como elementos principales (35). Para los experimentos de los cultivos de *P. aeruginosa* se reporta el uso de las frecuencias de 200Hz, 400Hz, 500Hz, 1kHz, 2kHz y 5kHz para la estimulación con un voltaje pico-pico de 20 V (35). Así, se alcanzó un desplazamiento aproximado de 60 nm, con variaciones según las frecuencias usadas; la caracterización de este sistema se realizó por medio de interferometría laser, de donde se obtuvo el desplazamiento y la máxima fuerza ejercida (35), el comportamiento obtenido sigue la tendencia de los otros estudios reportados. Además, para cuantificar el *biofilm* se utilizó cristal violeta, con una posterior adhesión de etanol para removerlo, donde la mayor reducción para una estimulación de 24 horas se atribuye a la frecuencia de 1kHz.

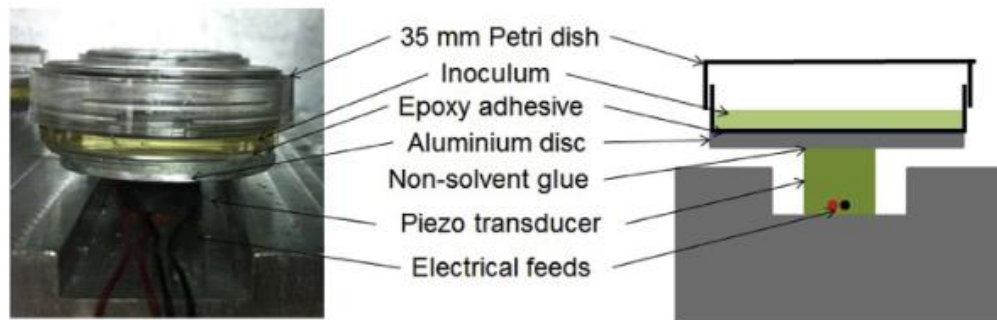


Figura 6: Sistema de estimulación propuesto por Robertson para cultivos de *P. aeruginosa*. Recuperado de (35)

Por otro lado, Liu (36) reporta el uso de pequeños transductores piezoeléctricos en forma de anillo, en placas de 6 pocillos, debajo de cada uno de ellos se coloca el piezoeléctrico, utilizando en el intermedio una lámina de vidrio, para la unión se utilizó Epoxi; el ancho de banda de trabajo permisible para este sistema es de 3kHz, Figura 7 (36). Este sistema fue utilizado para la estimulación de nanopartículas (células + partículas fluorescentes) con una frecuencia de 122 kHz y un voltaje pico-pico de 6 V.

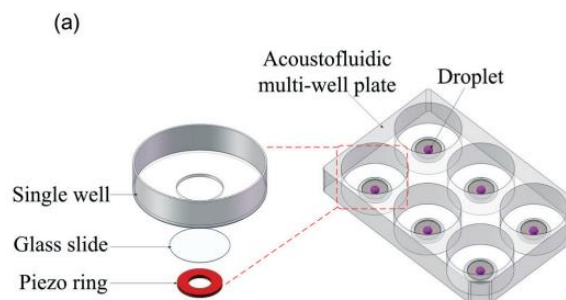


Figura 7: Estimulación por medio de anillos piezo-eléctricos. Recuperado de (36)

1.3.3. Otros métodos de estimulación

Se han generado otras estructuras para generar una vibración en la superficie, ya sea siguiendo formas sinusoidales como los vistos anteriormente y también onda cuadrada que es que incluye Ballance (37). Su diseño para remover *biofilms* de *Escherichia coli* se basa en 3 capas de elastómeros, cinta doble cara y, además, una capa conductora de

carbón la cual es uno de los componentes que permite generar la deformación de la base (Figura 8); cabe resaltar que solo se trabajó con muy bajas frecuencias, 15 a 100 Hz (37). La medición del *biofilm* se realizó por medio de la densidad óptica de 0.07 a 600nm de longitud de onda de un lector de placas y la velocidad de la vibración por medio de un vibrómetro láser Doppler (37).

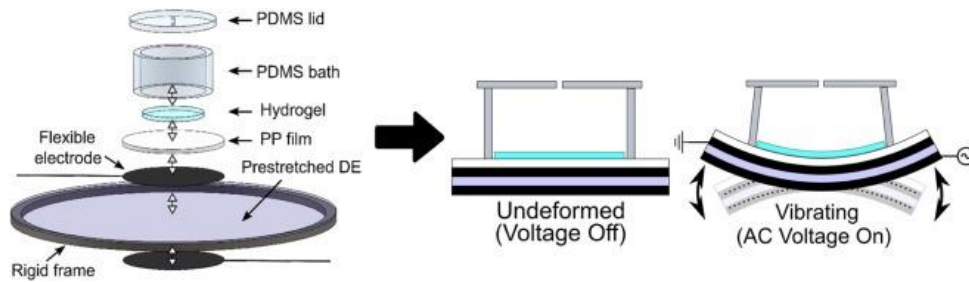


Figura 8: Modelo de estimulación mecánica por medio de una superficie deformable.

Recuperado de (37)

Finalmente, se cuenta con el estudio de Hong (38), quien usó un *shaker* electrodinámico, con un rango de trabajo de 0 y 1.2kHz, para el cultivo de *E. coli*, el cual fue colocado dentro de la incubadora por 24 horas a 37°C (38). Según la caracterización del sistema, se puede lograr una aceleración máxima sobre 20g (g, el valor de la gravedad); por medio de la técnica de Schlieren se determina el campo de desplazamiento y de esta forma, obtener el movimiento de las oscilaciones (39). Así se concluye que las zonas con mayor desplazamiento son donde se genera la mayor proporción del *biofilm*, como se observa en la Figura 9.

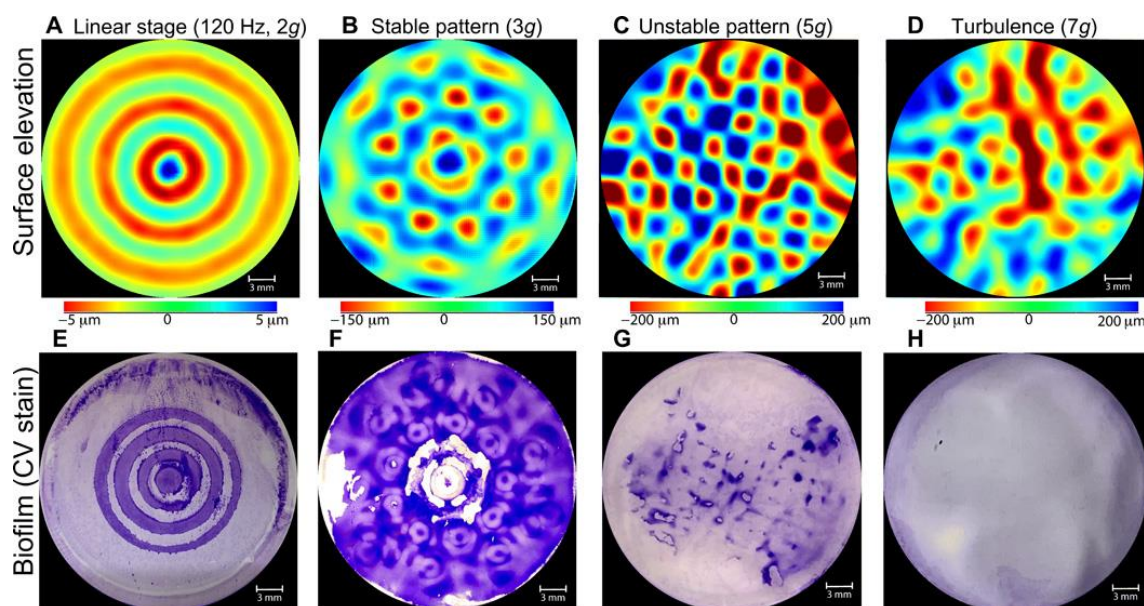


Figura 9: Respuesta del sistema a distintas fuerzas a la frecuencia de 120Hz.

Recuperado de (38)

a. Resumen de los estudios

A continuación, se resume características principales de los estudios anteriormente mencionados:

Tabla 1: Resumen del estado del arte de estimulación en la realización de cultivos.

Método de estimulación	Frecuencias utilizadas	Organismo	Estudio
Ondas acústicas (parlante)	100, 800 y 1600 Hz	<i>P. aeruginosa</i>	(31)
Ondas acústicas (parlante)	<10kHz	Fibroblastos	(32)
Actuadores piezoeléctricos	500 y 1000 Hz	hMSCs	(33)
Actuadores piezoeléctricos	150, 500, 1000 y 2000 Hz	MSC	(34)
Actuadores piezoeléctricos	200, 400, 500, 1k, 2k y 5k Hz	<i>P. aeruginosa</i>	(35)

Actuadores piezoeléctricos	122kHz	Nanopartículas	(36)
Superficie deformable	15 – 100Hz	<i>E. coli</i>	(37)
<i>Shaker</i> electrodinámico	0 – 1.2kHz	<i>E. coli</i>	(38)

1.4.Simulación por elementos finitos

Las simulaciones por elementos finitos permiten resolver diversos problemas relacionados con mecánica de sólidos fluidos, transferencia de calor y campos electromagnéticos (40). En términos generales, este método divide el dominio continuo en una cantidad finita de elementos, lo que permite hacer aproximaciones mediante ecuaciones algebraicas (41). Además, permite realizar simulaciones con parámetros variables lo que permite realizar ciertas predicciones y optimaciones en diversas condiciones (42).

Dentro de los estudios presentados anteriormente podemos observar que Nikukar (2016) realizó una caracterización por medio de modelamiento en ANSYS para observar la influencia del aluminio, Figura 10; en caso de los discos de 35 mm y 52mm de diámetro, se observa una deformación casi uniforme de la vibración regulada por la presencia de este (33).

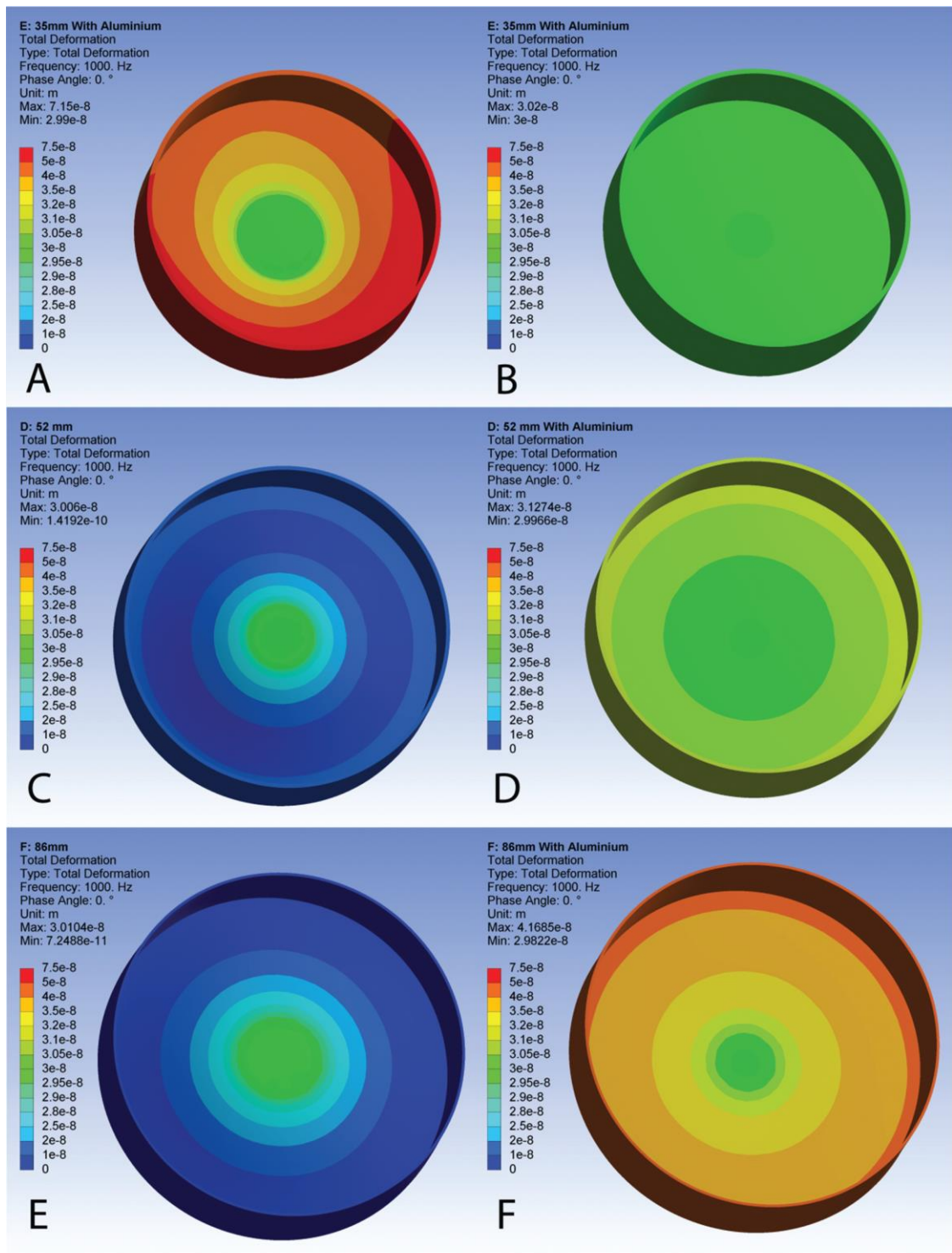


Figura 10: Simulación realizada del desplazamiento de la base de la placa Petri realizada en ANSYS. (C, E) Sin presencia del disco de aluminio. (A, B, D, F) Con presencia del disco de aluminio. Recuperado de (33)

De forma similar, Liu (2020) contempló el uso de un análisis por medio de elementos finitos en COMSOL Multiphysics, el módulo *acoustic-piezoelectric-solid interaction*.,

para evaluar la respuesta armónica del plato del biorreactor; esto es importante ya que se puede analizar las frecuencias de resonancia del sistema y el comportamiento del desplazamiento a lo largo de la superficie, Figura 11 (36).

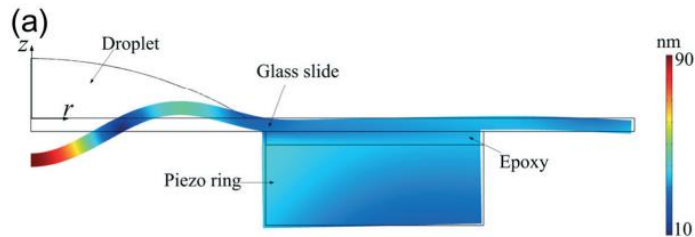


Figura 11: Simulación del área transversal del sistema con la estimulación de una señal a 109kHz y 6Vpp. Recuperado de (36)

Finalmente, Robertson (2018) usó un análisis de elementos finitos para predecir y corregir el efecto vibracional en el dispositivo (34), Figura 12.

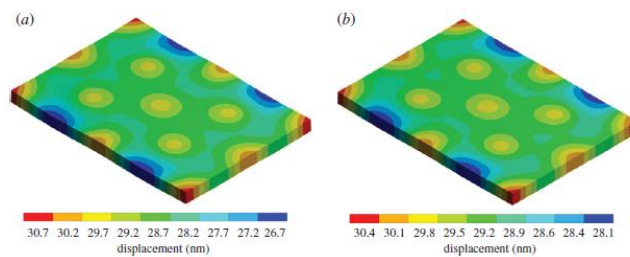


Figura 12: Análisis por medio del análisis de elementos finitos de los armónicos de la superficie de la placa multipozos. (A) Respuesta a 1kHz. (B) Respuesta a 2kHz.

Recuperado de (34)

II. Hipótesis/Pregunta de investigación y objetivos

2.1.Pregunta

¿Cómo generar una vibración en la escala de percepción de la *P. aeruginosa* mediante ondas acústicas en el rango audible, que sea aplicable en ensayos con cultivos?

2.2.Hipótesis

El uso de ondas acústicas, en el rango audible, puede generar una vibración con rango de amplitudes entre nanómetros a micrómetros, lo que sería aplicable en una superficie al fondo de un cultivo de *P. aeruginosa*.

2.3.Objetivos

A partir de lo planteado en la hipótesis se ha planeado los siguientes objetivos:

2.3.1. Objetivo General

Desarrollar un estimulador acústico de bajo costo para el ensayo de vibraciones en el rango audible sobre cultivos de *P. aeruginosa* capaces de formar *biofilm*.

2.3.2. Objetivos Específicos

- Diseñar y construir un sistema de estimulación acústica que permita modular la amplitud de vibración según la frecuencia y voltaje aplicados.
- Obtener la distribución de la amplitud transmitida a la superficie de una placa Petri según la frecuencia de la señal de alimentación mediante una simulación.
- Validar el funcionamiento del dispositivo durante ensayos de formación de biofilm en un cultivo de *P. aeruginosa*.

III. Materiales y métodos

3.1. Diseño del sistema de vibración

En el presente trabajo se utilizó la metodología de *Design Thinking*, donde se establecieron los siguientes requerimientos para el desarrollo del dispositivo:

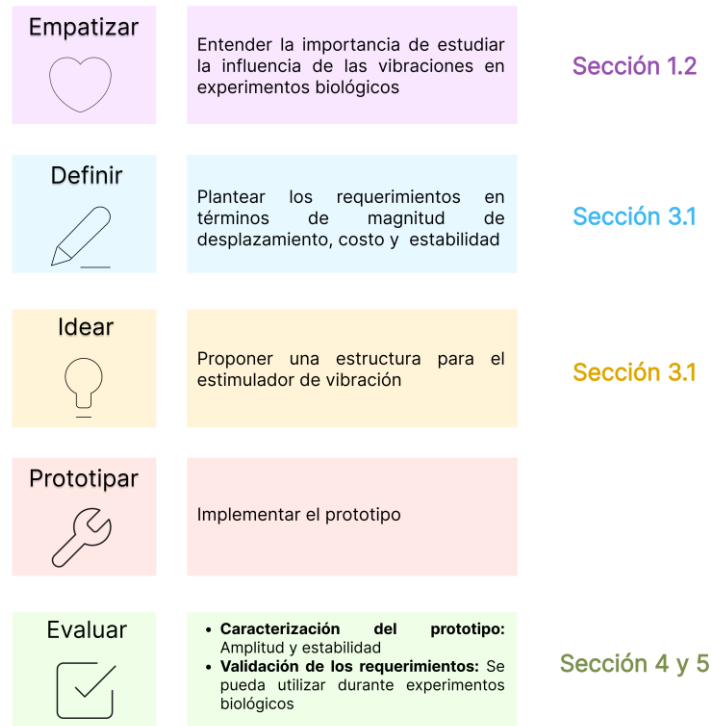


Figura 13: Proceso de *Design Thinking* de un estimulador de vibración para experimentos biológicos, detallado por etapas clave y su relación con las secciones del documento.

a. Requerimientos funcionales

- Generar vibraciones en el rango de micrómetros a nanómetros
- Producir una vibración perceptible en el rango de mayor interés: 1000 a 2000 Hz, los cuales son considerados en la mayor parte de los estudios presentados en el estado del arte
- Operar dentro de una incubadora a 37° C
- Mantener una frecuencia de resonancia fuera del rango de interés para evitar distorsiones

- Minimizar y caracterizar las frecuencias contaminantes generadas por el sistema o estímulos externos
- Garantizar un desplazamiento homogéneo en la superficie de la placa Petri

b. Requerimientos no funcionales

- Diseñar un sistema que sea seguro de usar para los operadores y experimentos
- Funcionar de manera estable y continua durante el tiempo requerido por los experimentos
- Garantizar que el diseño sea compatible con las restricciones físicas y ambientales de la incubadora
- Implementación de bajo costo

El sistema de vibración contiene tres componentes, que cumplen las tareas de generar la función sinusoidal, amplificar la señal voltaica, y finalmente generar la vibración mecánica. En la primera instancia del estudio, se trabajó con una placa Petri de poliestireno.

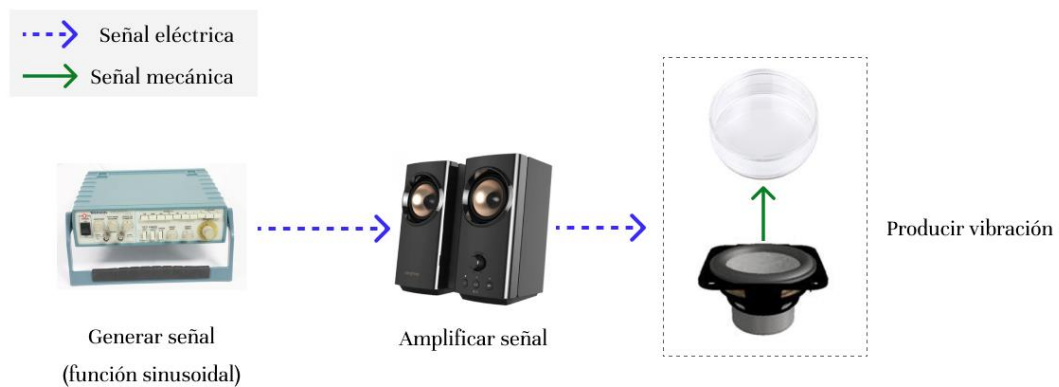


Figura 13: Fases para generar la estimulación por ondas sonoras para la estimulación de superficies

De esta forma, se observa que el flujo del sistema (Figura 13) cuenta con un generador de ondas CFG253 (Tektronix, Oregón), un amplificador comercial Creative T60

(Creative, Singapur); finalmente para la producción de la vibración se optó por el parlante AS04504PS-X-R (PUI Audio, Fairborn) (Figura 14), utilizado en la literatura revisada.

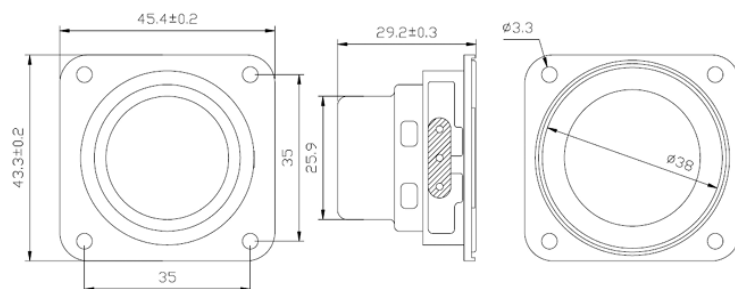
Como se observa en la imagen, la primera fase es para generar la señal, en esta se utilizó el generador de ondas CFG253. Esta cuenta con 3 tipos de ondas: cuadrada, triangular y sinusoidal con un rango de frecuencias de 0.3 a 3.0 MHz y un voltaje de 0 a 20 Vpp (43). La precisión del dial de este equipo es de $\pm 5\%$ de la escala completa, lo que implica que la frecuencia seleccionada puede variar dentro de ese margen respecto al valor indicado. Adicionalmente, la distorsión de la onda senoidal es menor al 1% en el rango de 10 Hz a 100 kHz, y la linealidad de la onda triangular es de al menos 99% entre 20 Hz y 200 kHz. Este dispositivo es el encargado de crear la señal eléctrica de entrada al sistema.

Posterior la señal debe ser amplificada, para esto el parlante comercial cuenta con una respuesta en frecuencia entre 50 y 20 000 Hz, una ratio de señal – ruido (Signal-to-Noise Ratio, SNR) sobre los 75 db (44). Su poder de salida es hasta 15 W (44).

Finalmente, la señal de vibración se produce por el parlante AS04504PS-X-R, que trabaja en el rango de frecuencia de 90 a 20 000 Hz con una frecuencia de resonancia de $170 \pm 20\%$ Hz, lo que implica una posible variación en su frecuencia de resonancia entre 136 Hz y 204 Hz (45). Adicionalmente se realiza una base para dar estabilidad en la parte inferior al parlante (Figura 15).



(a)



(b)

Figura 14: Dimensiones del parlante utilizado. Estas se encuentran en milímetros (mm). Recuperado (45)

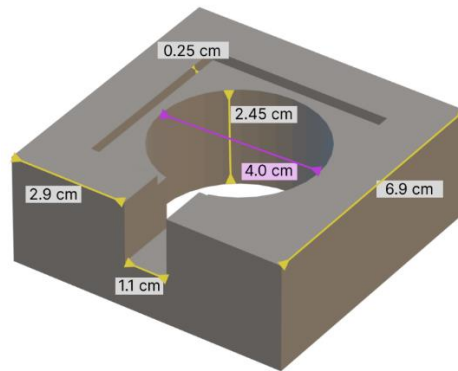


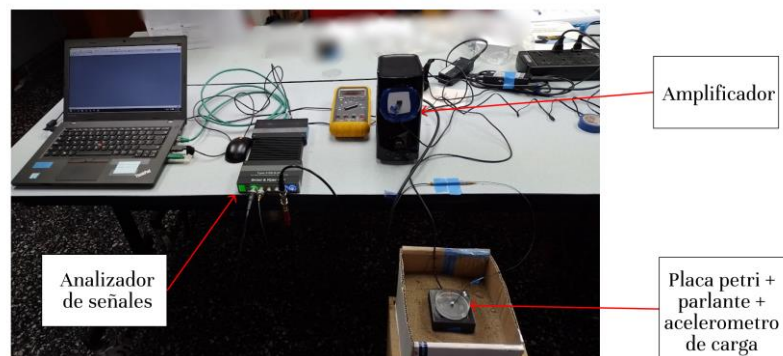
Figura 15: Modelo 3D para la base del parlante. Este fue realizado con PLA a un 99% de densidad.

3.2. Caracterización del sistema de vibración

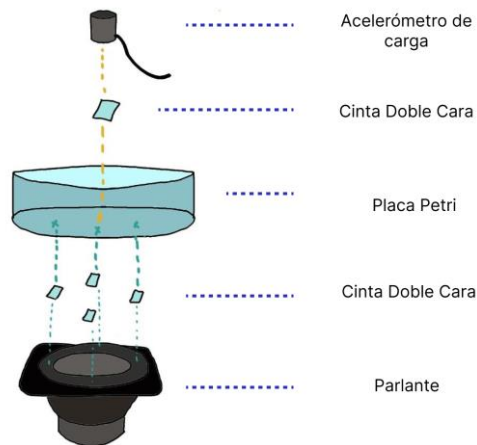
Para asegurar la reproducibilidad de los experimentos, se evaluó la estabilidad mecánica del sistema. Mediante un barrido de 350 a 2000 Hz se buscaron las siguientes características del sistema:

- Una vibración perceptible en el rango de mayor interés: 1000 a 2000 Hz, los cuales son considerados en la mayor parte de los estudios presentados en el estado del arte
- Una frecuencia de resonancia fuera del rango de interés: Esto es debido a que genera distorsión en las frecuencias cercanas
- El valor y la magnitud de las frecuencias contaminantes ya sea por el mismo sistema o por estímulos externos (vibraciones externas)

Los barridos de frecuencia permiten realizar un análisis completo y eficiente de los sistemas (26). Para este barrido se utilizó un acelerómetro de carga 4374 (Brüel & Kjaer, Nærum) adherido con cinta doble cara sobre la superficie de una placa Petri, la cual fue colocada sobre el parlante (Figura 16 (a)). Se utilizó un analizador de señales tipo 3160-B-042 para programar, de forma digital, la señal de entrada al sistema y la lectura de la señal del sensor, y realizar cambios progresivos y controlados durante toda la medición. La Figura 16 (b) muestra la configuración de medición utilizada en este estudio. Además, se realizó una medición de la placa sin ninguna estimulación para poder analizar los ruidos ambientales que se encuentran en la señal.



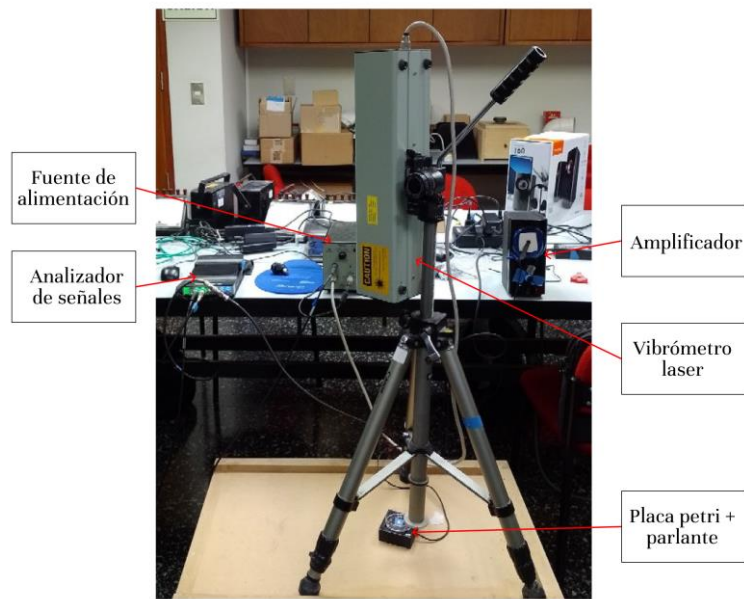
(a)



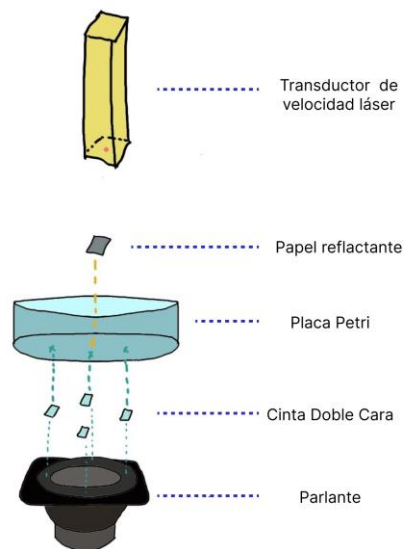
(b)

Figura 16: Configuración del sistema de medición utilizada para la caracterización del sistema. (a) Distribución general de los componentes. (b) Detalle de la configuración para el sensor.

Así confirmada la capacidad de los componentes, se realizó una medición por 15 segundos en las frecuencias específicas de 700, 800, 1000 y 2000 Hz a diferentes voltajes, de 50 a 1000 mV, las cuales se reportan en el estado del arte (Tabla 1). Asimismo, se incluyó una medición sin ningún estímulo para poder evidenciar y evaluar las vibraciones ya presentes por el ambiente. Se optó por cambiar el acelerómetro por un transductor de velocidad láser tipo 8323 (Brüel & Kjaer, Nærum), el cual genera una configuración de medición más compleja, pero con mayor precisión (figura 17). Su uso requiere una fuente de alimentación tipo 2815 y el uso de papel reflectante en el centro de la base para poder reflejar el láser.



(a)



(b)

Figura 17: Configuración del sistema de medición utilizada para la medición del desplazamiento: (a) Distribución general de los componentes. (b) Detalle de la configuración para el sensor.

3.2.1. Preprocesamiento de los datos

Para obtener la medición de amplitud en la frecuencia de interés, se filtró las interferencias que podrían estar presentes en la vibración. Distintas señales del ambiente generan

interferencias a lo largo del espectro de frecuencias; por lo tanto, la vibración real no presenta únicamente la amplitud de la vibración en la frecuencia de interés. Para abordar este problema se utilizó un filtro pasabanda en la frecuencia de interés (Figura 18 (a)). En este caso se decidió trabajar con un filtro FIR (*finite impulse response*) debido a su menor costo computacional y a que el desfase generado es menor. Se utilizó el programa de MATLAB, el cual brinda diversas funciones para el manejo de esta. Para validar que el filtro funcione correctamente, se evaluó que exista una atenuación suficiente en la señal del blanco.

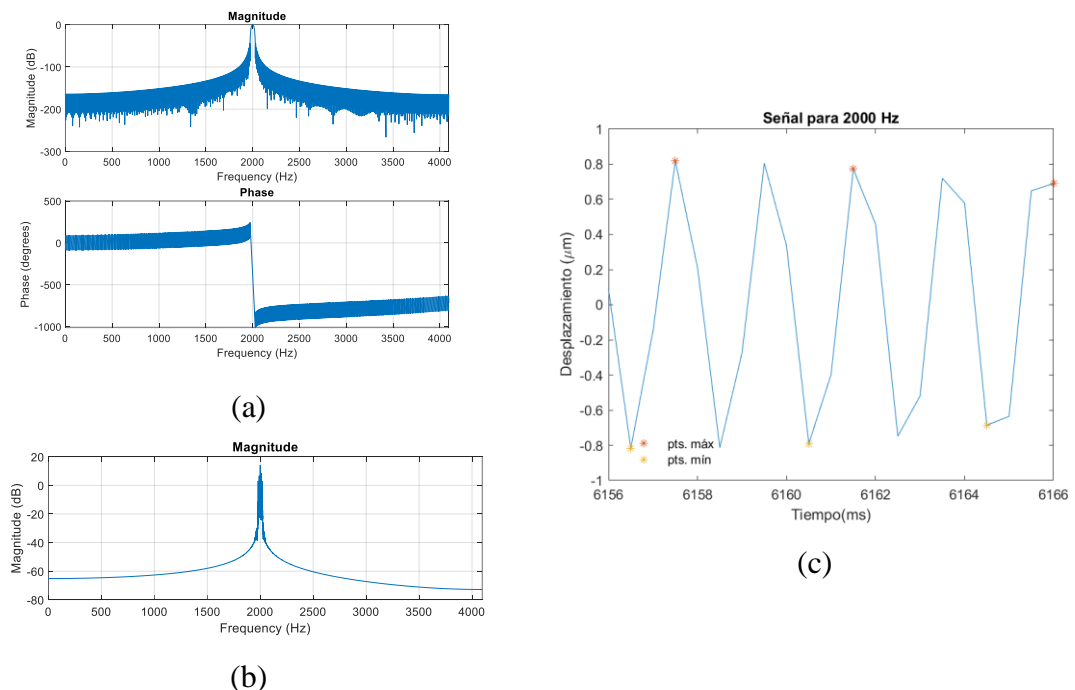


Figura 18: Ejemplo del filtro pasabanda para 2000 Hz. (a) La respuesta de frecuencia del filtro. (b) Muestra la magnitud del espectro de frecuencia, como se puede observar este se centra en la frecuencia de interés. (c) Ejemplo de la señal ya filtrada.

Por medio de la respuesta en frecuencia del filtro se verificó que la frecuencia de interés no cuenta con ninguna alteración en magnitud; en otras palabras, que el filtro presente una respuesta de 0 dB en ese rango. Además, que el resto de las señales sean atenuadas, lo que se puede comprobar en la Figura 18 (b) y (c).

3.2.2. Medición de la amplitud

La amplitud de la señal se obtuvo mediante la envolvente (Figura 19), la cual permite observar las variaciones en baja frecuencia de la amplitud a lo largo de la señal (46,47). En MatLab, esta se obtiene con la transformada de Hilbert, se desplaza la fase de todas las frecuencias a $\pi/2$ y solo se conserva los valores de la magnitud (48).

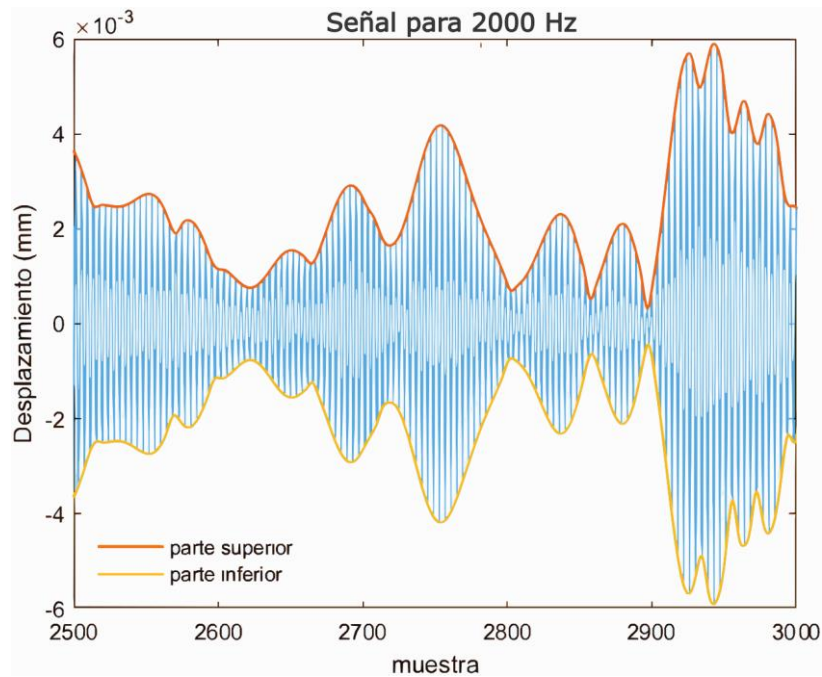


Figura 19: Ejemplo de la medición de la amplitud mediante la envolvente

Posteriormente, se repitió el mismo procedimiento, desde el inciso 3.2 hasta el 3.4, en una placa Petri de vidrio Pyrex (borosilicato), para las frecuencias que demostraron una mayor capacidad y relevancia en el estudio (1000 y 2000 Hz). En este caso, las mediciones se realizaron con un transductor de velocidad láser VH – 1000 – D.

3.3. Simulación del sistema de vibración

Las mediciones experimentales de las vibraciones descritas en la sección 3.2, solo se realizaron en el centro de la superficie (i.e. la placa Petri). No obstante, es importante recalcar que uno de los puntos clave en la vibración, son los modos; estos indican la forma en la que es afectado el cuerpo en su conjunto. Los modos de vibración dependen del material y forma del objeto; y, principalmente, de la frecuencia con la que es estimulado, como se observa en la Figura 20.

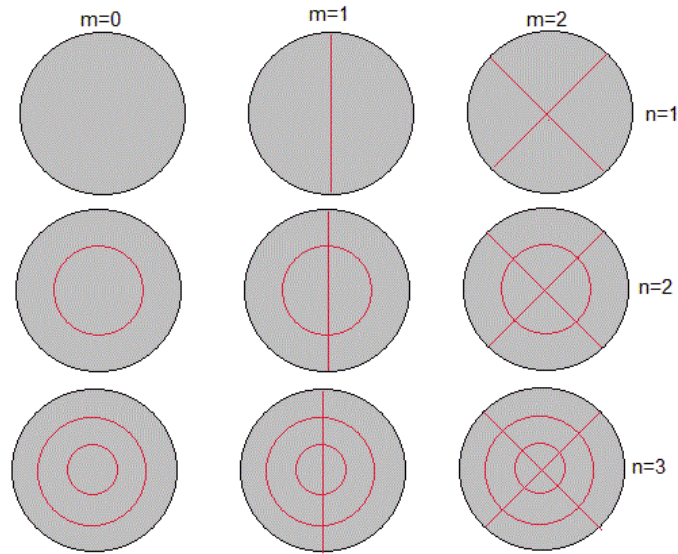


Figura 20: Ejemplo de modos (m, n) de vibración para distintas frecuencias.

Recuperado de (49)

Para detectar los modos y medir cómo la amplitud varía en la superficie, se requiere una simulación 3D de toda la base de la placa Petri y la zona de contacto con el actuador. El presente estudio fue desarrollado mediante el método de elementos finitos utilizando el software COMSOL Multiphysics 6.2, reconocido en la literatura científica por su capacidad para abordar análisis multifísicos avanzados. Este software integra módulos especializados que permiten modelar y simular fenómenos físicos complejos, como la transferencia de calor, la dinámica de fluidos, la mecánica estructural y el electromagnetismo, facilitando un enfoque multifísico para problemas acoplados. Además, su capacidad para personalizar ecuaciones físicas y acoplar diferentes fenómenos lo convierte en una herramienta versátil para la investigación y la ingeniería (50). COMSOL también permite la integración con herramientas externas, como MATLAB, para ampliar las capacidades de simulación y automatización de estudios paramétricos (51). Su enfoque basado en el método de elementos finitos lo posiciona como una plataforma robusta para resolver ecuaciones diferenciales parciales complejas y analizar problemas con geometrías no estándar (52).

3.3.1. Modelo de la estructura 3D

La placa Petri se modeló a partir de la estructura de dos cilindros. En caso de la placa de poliestireno, el primero de diámetro de 60mm y altura 10mm; el segundo de 58mm y 13mm respectivamente, se realizó una diferencia entre el cilindro mayor con el menor (Figura 21). Para el de borosilicato, el primero de diámetro de 50mm y altura 14mm; el segundo de 46mm y 12mm

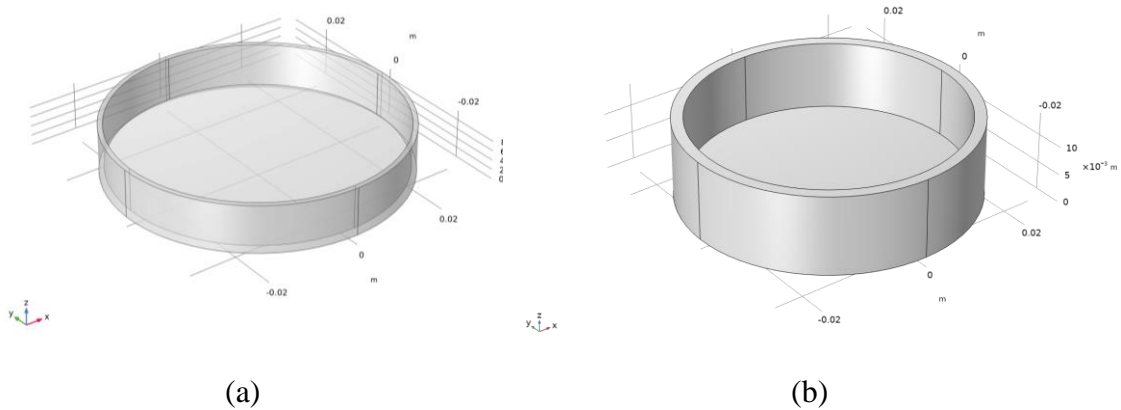


Figura 21: Modelo 3D de la placa Petri a usarse. (a) Material poliestireno: diámetro 60mm, altura 10mm y espesor 1mm. (b) Material borosilicato: Material poliestireno: diámetro 50mm, altura 14mm y espesor 2 mm.

Adicionalmente, se replicó el contacto continuo del parlante mediante puntos, según las medidas expuestas en la Figura 14, para mostrar dónde la placa recibe fuerza para desplazarse, como se observa en la Figura 22.

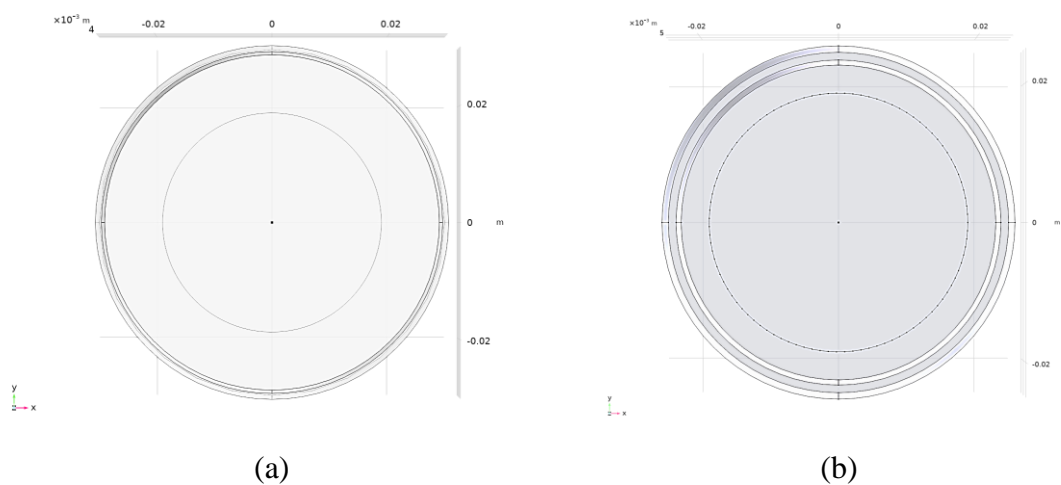
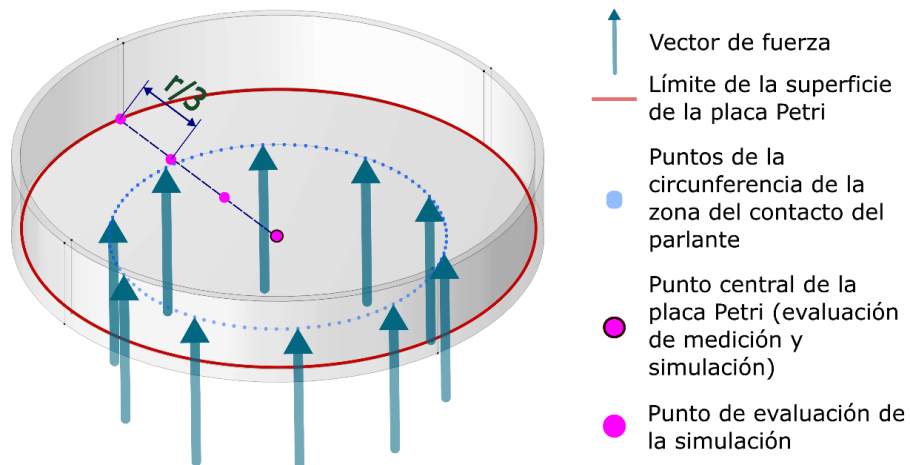


Figura 22: Modelo 3D con los puntos de contacto del parlante en la placa Petri (a) Material poliestireno (b) Material borosilicato

Finalmente, se unió ambos componentes en la posición que se presenta en la misma forma que se presenta en el sistema de caracterización y para los cultivos (Figura 23).



(a)



(b)

Figura 23. Diseño de la configuración del sistema placa Petri - parlante. (a) Ejemplo de la configuración para las mediciones preliminares. (b) Modelo de la simulación resultante con distribución espacial de los elementos para generar las condiciones de la simulación y su posterior evaluación (Los vectores de fuerza se encuentran en todos los puntos de la zona de contacto; no obstante, por facilidad de visualización se graficaron solo 10)

En caso de la placa Petri se utilizó el material disponible en las librerías de COMSOL, poliestireno (*polystirene*) y borosilicato (*Corning 7740 - Pirex*). Los cuales cuentan en su librería con las propiedades de densidad, módulo de Young y ratio de Poisson.

3.3.2. Simulación del comportamiento por elementos finitos

Para simular la interacción de la placa Petri con las ondas sonoras, se empleó el modelo de sólido mecánico. Se simuló una fuerza en el eje Z, en los puntos de la zona de contacto del parlante (Figura 23). La fuerza utilizada se ajustó gradualmente para obtener un valor equivalente en el punto de central, donde también se realizó la medición con el transductor de velocidad láser. Luego, se examinó el desplazamiento en los puntos de evaluación a diferentes distancias ($1/3$, $2/3$ y el equivalente del valor del radio de la placa) del punto central.

3.4. Protocolo para la evaluación del efecto de la vibración sobre la *Pseudomonas aeruginosa*

Se empleó este protocolo para verificar que el dispositivo pueda operar de manera continua y adaptarse a los ensayos biológicos en los que se utilice.

3.4.1. Cultivo de *P. aeruginosa*

Para realizar el cultivo de la *P. aeruginosa* se siguió 3 pasos: preinóculo, siembra e incubación.

a. Preinóculo

Para cultivar *P. aeruginosa*, se siguió tres pasos: preinóculo, siembra e incubación. En el preinóculo, se pican colonias de cepas de *P. aeruginosa* en 10 mL del medio correspondiente y se incuban a 37°C/200 RPM durante 16 a 18 horas. Luego, se centrifugó y descartó el sobrenadante, repitiendo este paso antes de suspender el pellet celular en 1 ml de medio mínimo y medir la absorbancia a 570 nm. En la siembra, la solución se diluye en medio LB hasta una turbidez de absorbancia a 570 nm de 0.082 y se siembran 5 mL en placas Petri. Por último, en la incubación, las placas se incuban a 37°C durante periodos de 3, 24 y 72 horas.

b. Protocolo de estimulación

Se sembró 7 placas Petri de poliestireno las cuales recibieron distinto tratamiento, en la siguiente forma:

- 4 placas Petri con una señal sinusoidal con una amplitud en el orden de los nanómetros.
- 3 placas Petri no reciben ninguna estimulación

Adicionalmente, se contó con una placa que solo contiene medio, esta sirve de blanco para las mediciones.

3.4.2. Medición del *biofilm* resultante

Se utilizó la tinción con cristal violeta, según el protocolo reportado por O'Toole (53). La cantidad de cristal violeta retenido es proporcional al *biofilm* presente en la superficie. Este es cuantificado mediante espectrofotometría del tinte solubilizado.

Después de la incubación, se descartó las células volcando la placa y sacudiendo el líquido. Se sumergió la placa en agua y se agitó para eliminar las células no adheridas y los componentes del medio. Se añadió 125 µL de cristal violeta al 0,1% a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 10-15 min. Se enjuagó la placa de 3 a 4 veces, se sacudió y secó para eliminar restos de células y tinte. Se dejó las placas durante toda la noche para su secado. Se tomó fotografía de la superficie de las placas teñidas para registrar el crecimiento de *biofilm* en las placas (Anexo A).

Al día siguiente, se añadió 125 µL de ácido acético al 30% a cada pocillo para solubilizar el cristal violeta. Se incubó durante 15 min y transfirió 125 µL del cristal violeta solubilizado a un nuevo plato de microtitulación. Se cuantificó la absorbancia a 550 nm en un lector de placas.

IV. Resultados

4.1. Caracterización del sistema de vibración

Luego de realizar el barrido de frecuencia y el análisis de la señal de la frecuencia en blanco, se logró obtener ciertas características del sistema. En la figura 24 se puede observar hay una frecuencia de resonancia entre 875 y 885 aproximadamente; además de observar un pico característico en 1800; esto puede deberse a un error al momento de generar la señal. De esta forma se concluye que:

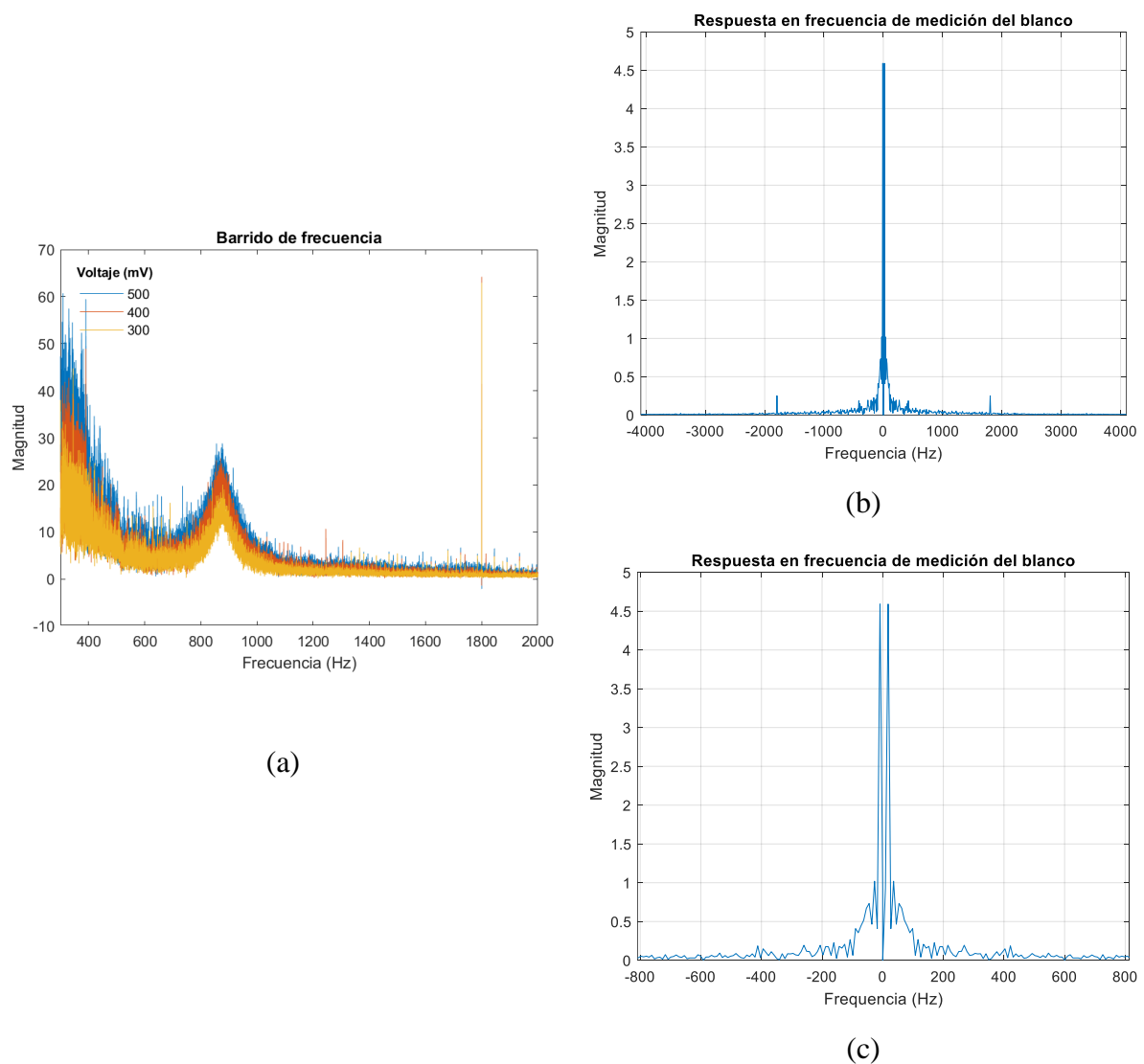


Figura 24: Caracterización del sistema mediante (a) el barrido de frecuencias y (b) la respuesta de la medición en blanco (en (c) se puede observar una ventana más pequeña de frecuencia de -800 a 800).

- Se cuenta con estabilidad en el rango de 1000 a 2000 Hz para poder trabajar en el sistema.
- La frecuencia de resonancia se encuentra antes del rango de interés.
- De la misma forma se puede observar ruido mínimo existente a lo largo de toda la señal, aunque es más prominente debajo de 200 Hz. Por este motivo, es más recomendable usar un filtro pasabanda, para solo considerar el efecto de la frecuencia de estímulo.

4.1.1. Amplitud de la vibración de la placa Petri

A continuación, se evaluó la medición de la amplitud en ambos materiales. Como se observa en la Figura 25, las mediciones tienen una tendencia lineal como se muestra en la literatura. No obstante, se observa en caso de 800 y 1000 Hz un crecimiento en 50 mV, esto podría deberse que, al tratarse de una estimulación tan pequeña, el movimiento generado es menor a la presencia del ruido existente en esa frecuencia.

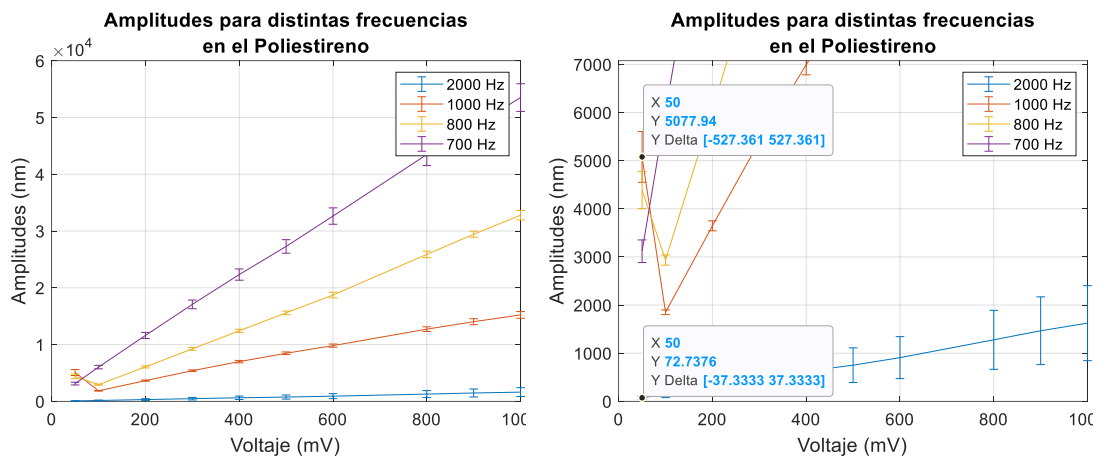


Figura 25: Pruebas realizadas en la placa de poliestireno: (a) Medición del desplazamiento para distintos voltajes y frecuencias empleadas. (b) Ventana de la gráfica de 0 a 7000 nm con anotaciones.

Como se observa la medición más cercana a nuestro rango de interés es en 2000 Hz con 50 mV, donde es 72.73 ± 37.33 nm.

Por otro lado, se cuenta con la medición de la placa Petri de borosilicato (Figura 26), donde se observa una tendencia creciente, pero con un menor alineamiento. Esto podría deberse a un efecto similar que al anterior caso. Los desplazamientos obtenidos para 1000 y 2000 Hz son de 24.19 ± 0.13 nm y 7.19 ± 1.05 nm respectivamente.

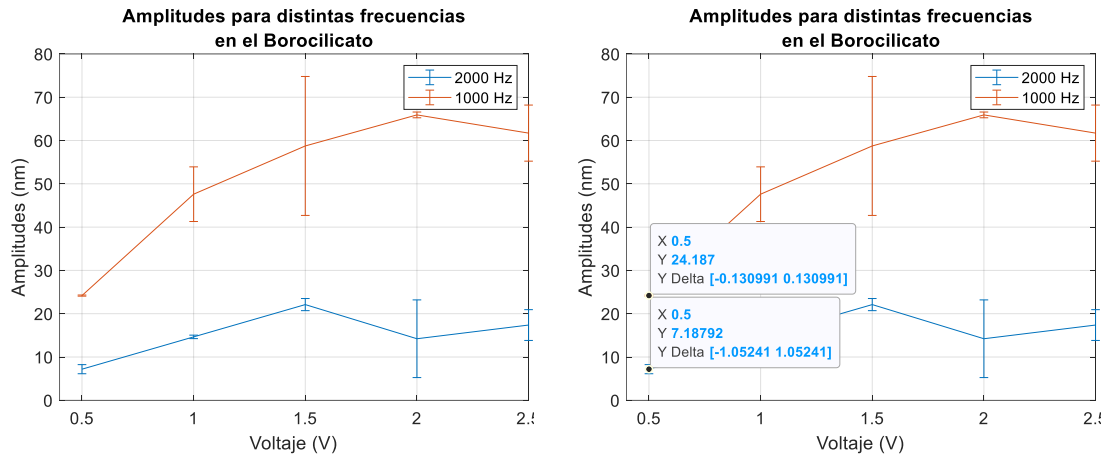


Figura 26: Pruebas realizadas en la placa de borosilicato: (a) Medición del desplazamiento para distintos voltajes y frecuencias empleadas. (b) Medición con anotaciones.

En ambos casos, observa el comportamiento esperado en la transmisión de ondas: a medida que la frecuencia aumenta, la amplitud del desplazamiento disminuye debido a la atenuación en la placa. Esto implica que a frecuencias más bajas se logra una mayor amplitud medida. Sin embargo, la simulación presenta una limitación en este aspecto, ya que no hemos incorporado la respuesta en frecuencia, lo cual resulta crucial dado que el voltaje introducido, en cada frecuencia, se amplifica de manera diferente. Aún no se ha caracterizado el voltaje final que llega al parlante para cada voltaje de entrada, un dato esencial para desarrollar una función que relacione la fuerza en el eje Z (en relación con el voltaje de entrada al parlante) con el voltaje y la frecuencia de entrada al sistema.

4.1.2. Efecto de la tapa y del fluido sobre la vibración de la placa Petri de poliestireno

Como es sabido, al momento de realizar los cultivos, la placa Petri cuenta con dos elementos importantes: la tapa de la placa Petri para protección y el medio de crecimiento de la bacteria. Por este motivo, se validó que estas dos variaciones no afecten a la medición realizada.

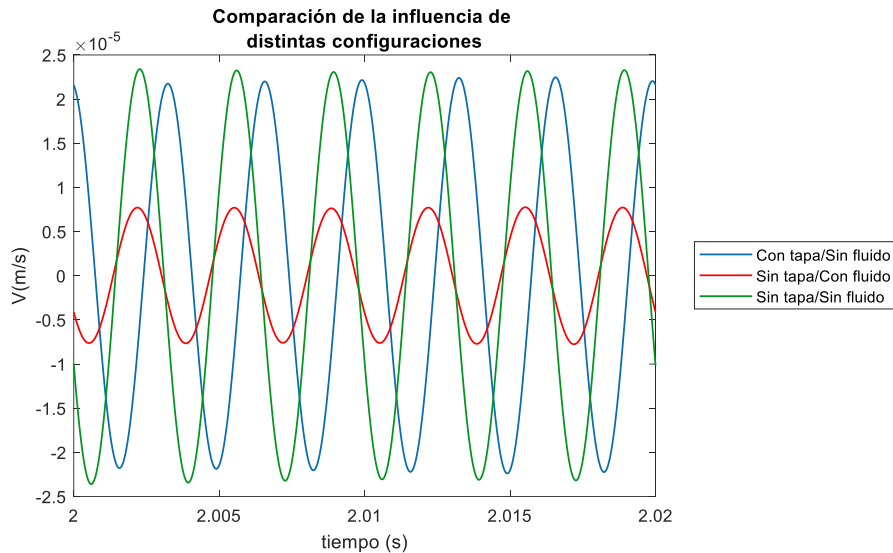


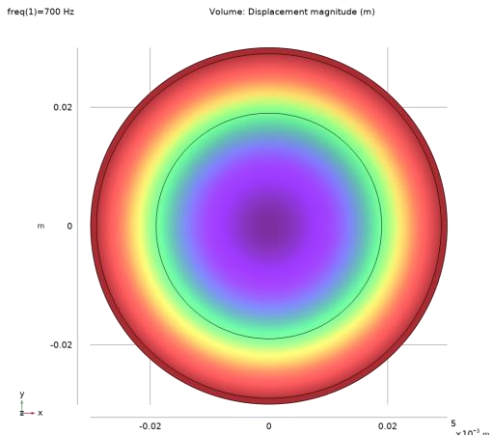
Figura 27: Comparación al utilizar la placa Petri con su tapa de protección y al usar un fluido como medio de cultivo. Mediciones realizadas a 600 Hz.

Como se puede observar, la influencia de la tapa en el sistema es mínima, ya que no presenta una diferencia significativa. Sin embargo, al introducir un fluido, se observa una disminución de más del 50% en la velocidad alcanzada por la placa, atribuible al aumento de masa en la placa Petri. No obstante, como su desplazamiento es elevado, este sigue siendo perceptible a pesar de la reducción. Finalmente, esta variación no se considerará en el análisis, debido a que los valores máximos de desplazamiento obtenidos ya se encuentran en el rango de los nanómetros.

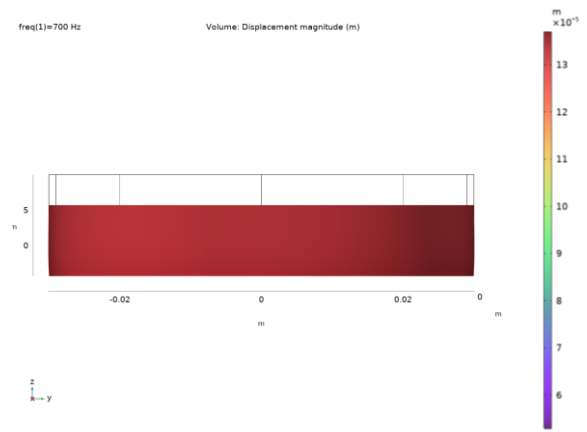
4.2. Distribución de la vibración en la superficie de la placa Petri

Utilizando los datos de vibración de medidas experimentalmente, se puede establecer el patrón de movimiento a lo largo de la placa Petri mediante simulación. En la Figura 27 se observa el patrón de movimiento para la placa de poliestireno. En caso de la placa de

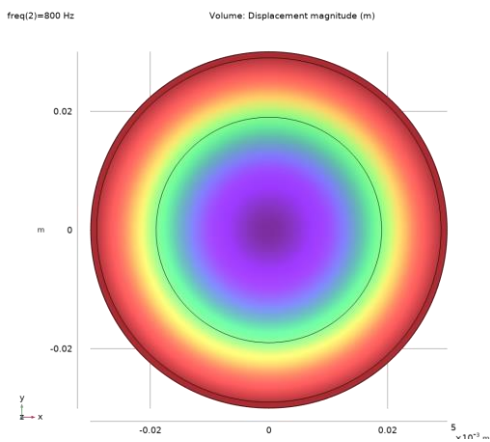
700 y 800 Hz, se tiene un mayor movimiento en los lados extremos; a diferencia de que en 1000 Hz se presenta en los extremos y parte central y en 2000 Hz un movimiento más pronunciado en la parte central.



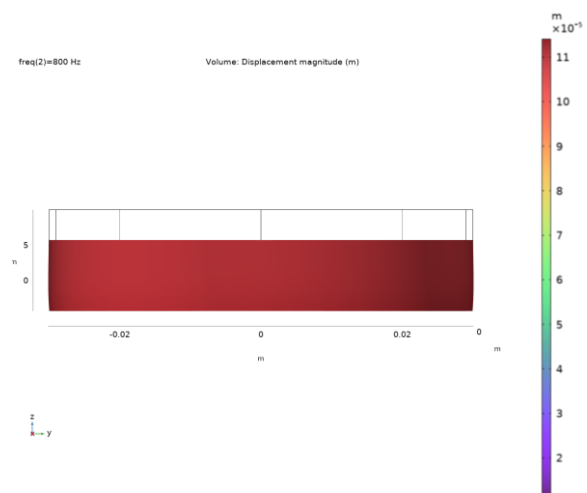
(a)



(b)



(c)



(d)

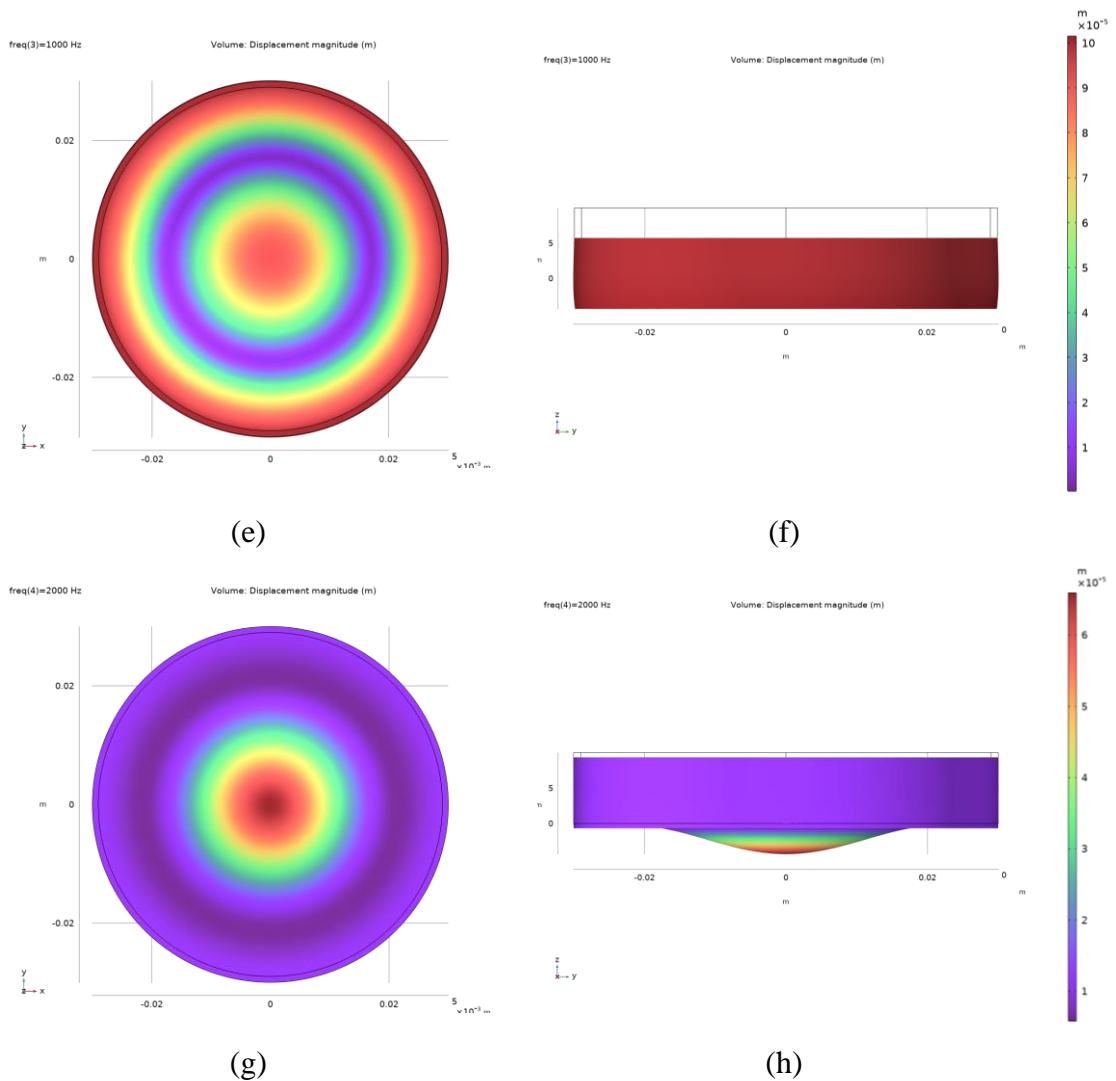


Figura 27: Ejemplo de respuesta de la placa Petri de poliestireno a una carga de 0.1 N en el eje Z a distintas frecuencias: (a) y (b) 700 Hz, (c) y (d) 800 Hz, (e) y (f) 1000 Hz, y (g) y (h) a 2000 Hz. Vista en el plano XY: (a), (c), (e) y (g). Vista en el plano YZ: (b), (d), (f) y (h)

Posterior, para cada uno de los desplazamientos en 2000 Hz se estableció una fuerza para obtener un equivalente en el orden de los nanómetros. Como se observa en la figura 28, se confirma lo mencionado anteriormente, el mayor desplazamiento se encuentra en el punto central.

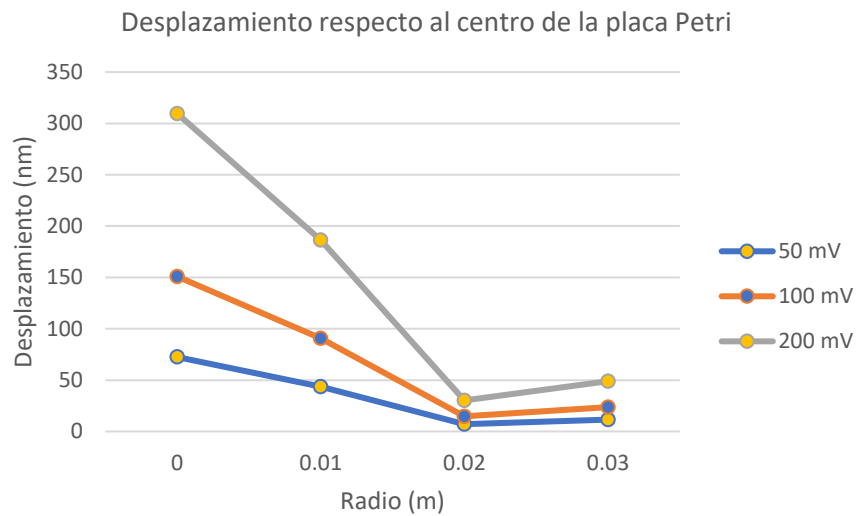


Figura 28: Desplazamiento a lo largo de la placa Petri de poliestireno en 2000 Hz para voltajes de 50 mV, 100 mV y 200 mV.

Además, en la tabla 3, se observa que también existe una correspondencia lineal entre la fuerza utilizada para simular cada uno de los voltajes en 2000 Hz.

Tabla 2: Relación entre fuerza y voltaje para la simulación en la placa Petri de poliestireno.

Fuerza (N)	Voltaje (mV)
0.00011	50
0.000229	100
0.00047	200

Por otro lado, en caso de la placa Petri de borosilicato (Figura 29), se puede observar que el mayor desplazamiento se tiene en la parte central para los dos casos simulados en 1000 Hz y 2000 Hz.

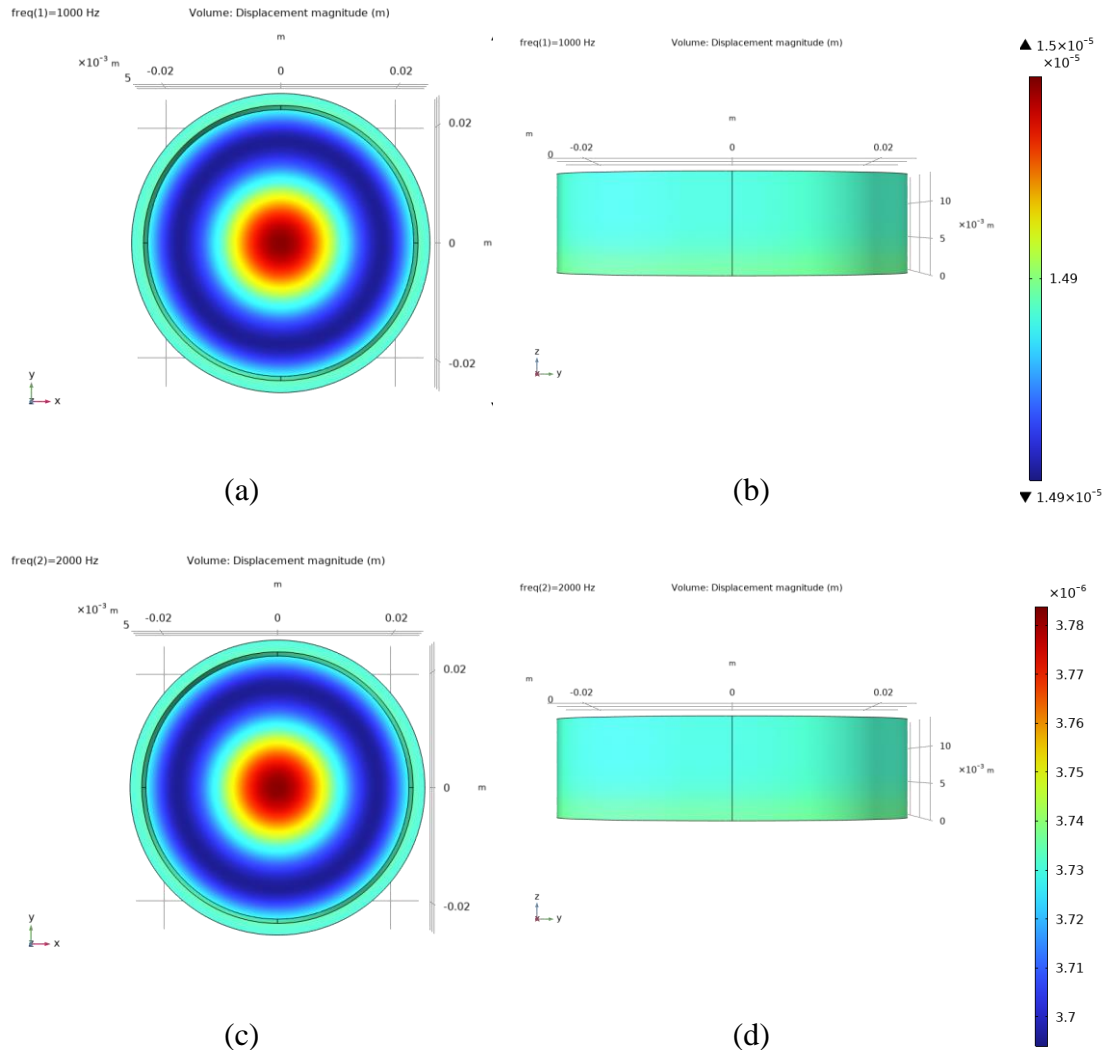


Figura 29: Ejemplo de respuesta de la placa Petri de borosilicato a una carga de 0.1 N en el eje Z a distintas frecuencias: (a) y (b) 1000 Hz, y (c) y (d) 2000 Hz. Vista en el plano XY: (a) y (c). Vista en el plano YZ: (b) y (d).

En caso del desplazamiento en 2000 Hz, se realizó el mismo ajuste que en la placa de poliestireno. De esta forma se tiene:

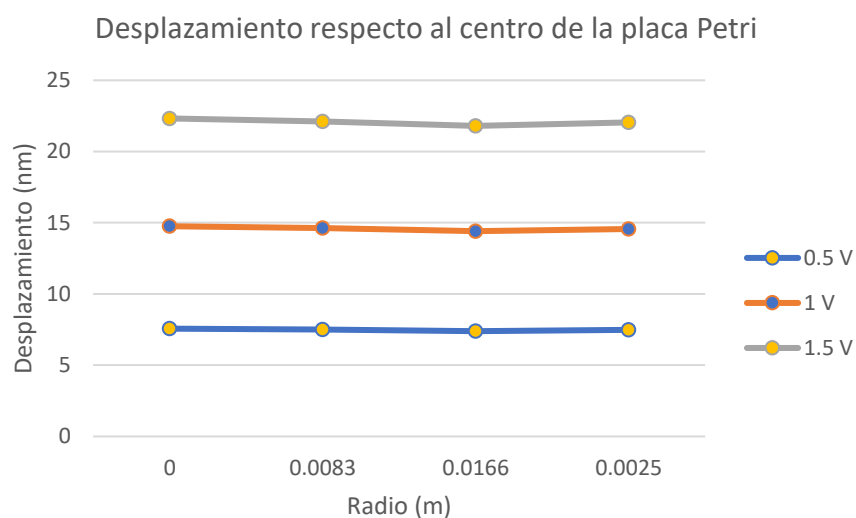


Figura 30: Desplazamiento a lo largo de la placa Petri de borosilicato en 2000 Hz para voltajes de 0.5, 1 y 1.5 V.

A diferencia del poliestireno, se observa que hay menor varianza en el desplazamiento a lo largo de la placa; pese a que se requiere mayores voltajes. De igual forma, en la tabla 3, se puede ver una correspondencia lineal entre la fuerza usada para simular cada voltaje.

Tabla 3: Relación entre fuerza y voltaje para la simulación en la placa Petri de borosilicato.

Fuerza (N)	Voltaje (V)
0.0002	0.5
0.00039	1
0.00059	1.5

El ambiente donde se realizaron las mediciones se encontraba a temperatura ambiente, variando entre 20°C a 25°C. Para realizar las primeras simulaciones se trabajó el ajuste en 20° C, dentro del rango trabajado para las mediciones. No obstante, el cultivo se realiza a 37° C, lo cual podría tener un efecto en el desplazamiento final de la placa. Por este motivo se cambió las condiciones ambientales de la simulación a esta temperatura. En la Figura 31 se puede observar los resultados para el poliestireno y en la tabla 4 el resultado de los desplazamientos en la superficie de la placa:

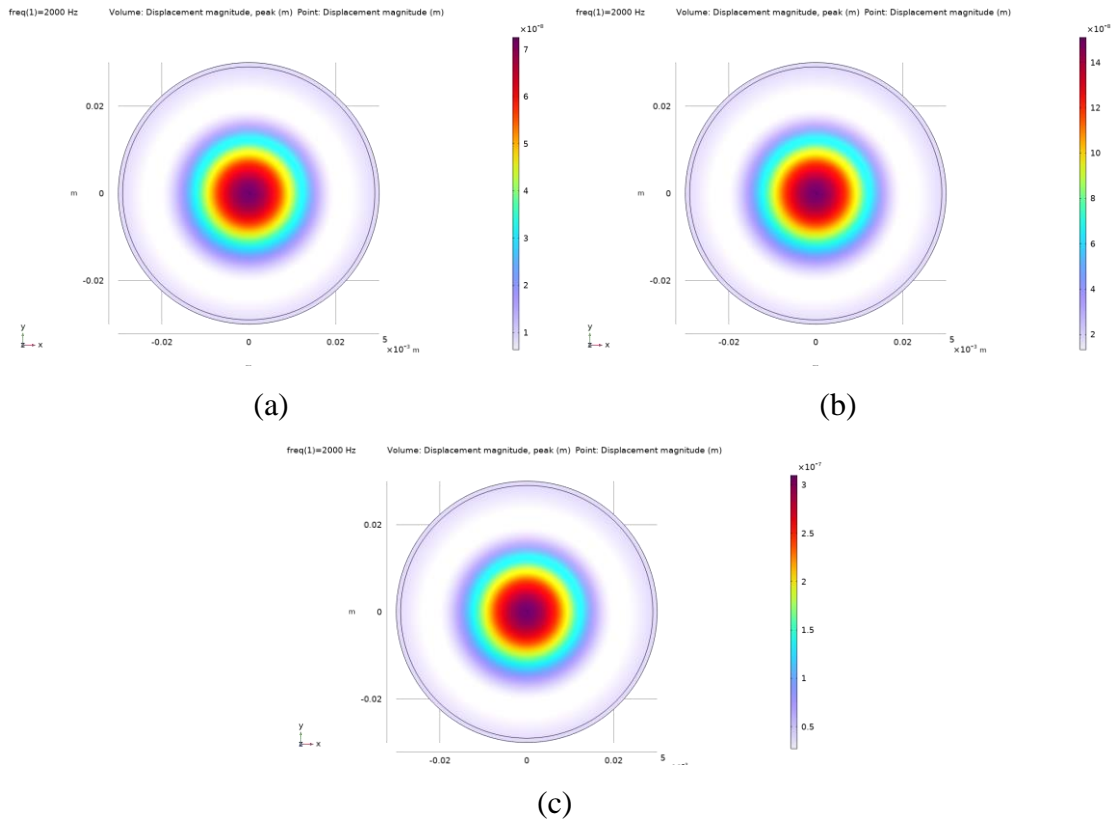


Figura 31: Distribución del desplazamiento para distintos voltajes a 37°C en la placa Petri de poliestireno

Tabla 4: Desplazamiento obtenidos mediante simulación para distintas temperaturas ambientales en la placa Petri de poliestireno

Voltaje (mV)	Radio (m)	Temperatura (°C)	
		20	37
50	0	72.483	72.483
	0.01	43.599	43.599
	0.02	7.0818	7.0818
	0.03	11.434	11.434
100	0	150.9	150.9
	0.01	90.766	90.766
	0.02	14.743	14.743
	0.03	23.803	23.803
200	0	309.7	309.7

	0.01	186.29	186.29
	0.02	30.258	30.258
	0.03	48.852	48.852

Como se puede observar en los 3 voltajes probados se observa un cambio en el desplazamiento en ninguno de los puntos evaluados. De la misma forma se realizan estas variaciones en el borosilicato, en la Figura 32 y tabla 5 se presentan los resultados:

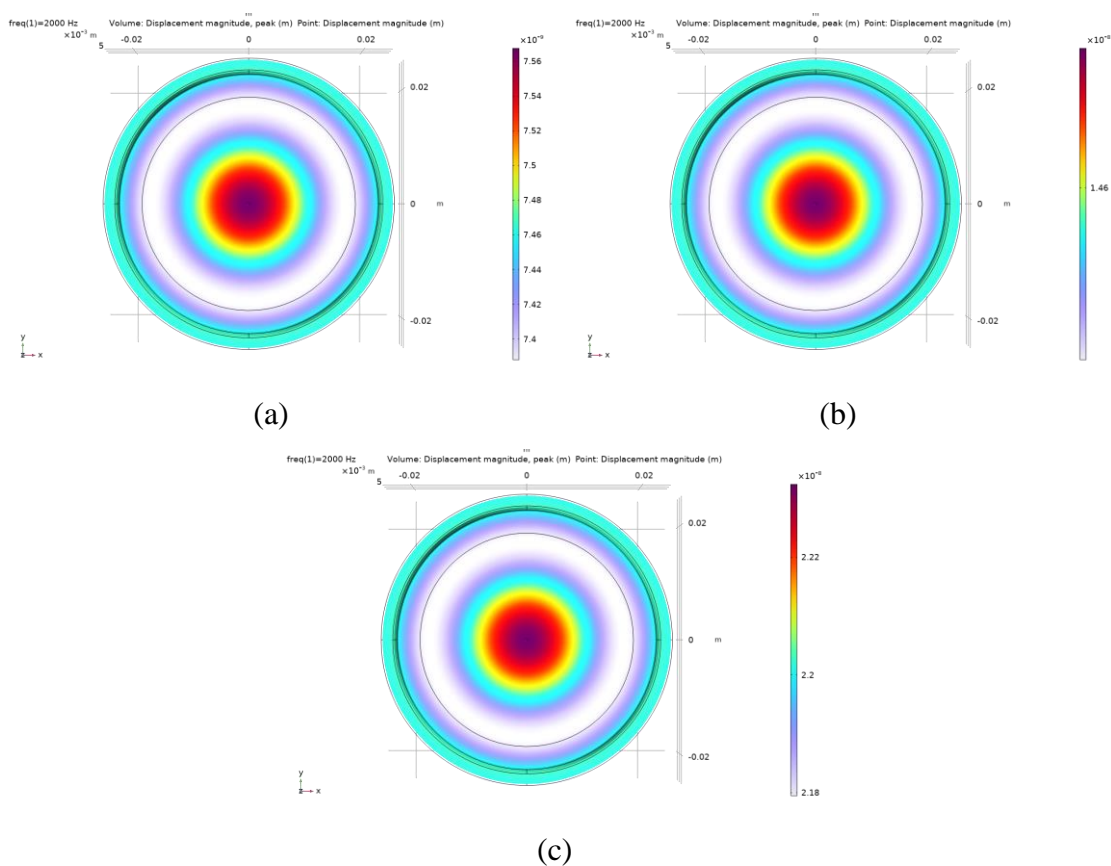


Figura 33: Distribución del desplazamiento para distintos voltajes a 37°C en la placa Petri de Borosilicato

Tabla 5: Desplazamiento obtenidos mediante simulación para distintas temperaturas ambientales en la placa Petri de borosilicato

Voltaje (V)	Radio (m)	Temperatura (°C)	
		20	37
0.5	0	7.5673	7.5673

	0.01	7.4963	7.4963
	0.02	7.3906	7.3906
	0.03	7.4727	7.4727
1	0	14.756	14.756
	0.01	14.618	14.618
	0.02	14.412	14.412
	0.03	14.572	14.572
1.5	0	22.323	22.323
	0.01	22.114	22.114
	0.02	21.802	21.802
	0.03	22.045	22.045

Finalmente, se verificó que la diferencia de temperatura entre los ambientes de medición y la incubadora no va a tener un efecto sobre la amplitud de vibración; debido a que no es lo suficientemente alto para afectar en sus propiedades mecánicas.

4.3. *Biofilm* formado en los cultivos de *P. aeruginosa*

Para validar que la estimulación acústica generada es perceptible por un cultivo capaz de formar *biofilm*, se realizaron ensayos con dos cepas de *P. aeruginosa* (ATCC10145 y PAO1) en diferentes condiciones. Se utilizó la tinción con cristal violeta para cuantificar la cantidad de *biofilm* formado en las placas estimuladas y no estimuladas. El tinte capturado por el biofilm fue solubilizado con ácido acético y medido por absorbancia a 550 nm. Los resultados se presentan en la Tabla 6 y se puede observar imágenes de las placas en el Anexo A.

Tabla 6: Resultados de absorbancia para las cepas sembradas.

PA	Medio	Tiempo	Absorbancia			P-value
			Estimulado	No estimulado	Blanco	

ATCC10145	M9 + cas 0.1%	3h	0.25±0.05	0.30±0.01	0.26	0.29
		24h	0.32±0.02	0.40±0.01	0.20	0.72
PAO1	M9 + cas 0.1%	24h	0.12±0.01	0.11±0.01	0.13	0.15
		24h	0.18±0.03	0.17±0.004	0.17	0.28
		72h	0.11±0.05	0.11±0.02	0.15	0.49
	LB 1x	24h	2.19±1.3	0.34±0.03	0.32	0.03
	LB 0.5x	24h	0.93±0.25	0.39±0.09	0.24	0.03

Los datos obtenidos muestran que la respuesta a la estimulación acústica varía según la cepa y el medio de cultivo.

- **ATCC10145:** No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la formación de *biofilm* entre las condiciones estimuladas y no estimuladas ($p > 0.05$). En el medio M9 + cas 0.1%, los cultivos estimulados presentaron una leve reducción de la absorbancia en comparación con los no estimulados (0.25±0.05 vs. 0.30±0.01 a 3 h; 0.32±0.02 vs. 0.40±0.01 a 24 h), pero la diferencia no fue lo suficientemente grande como para considerarse significativa ($p = 0.29$ y $p = 0.72$, respectivamente).
- **PAO1:** La respuesta varió dependiendo del medio de cultivo:
 - **En el medio M9 + cas 0.1%,** no se detectaron diferencias significativas en la formación de *biofilm* entre las condiciones estimuladas y no estimuladas en ninguno de los tiempos evaluados ($p = 0.15 - 0.49$).
 - **En el medio LB,** se observó un aumento significativo en la formación de *biofilm* en las placas estimuladas en comparación con las no estimuladas. A 24 h, la absorbancia en las placas estimuladas fue 2.19±1.3 en LB 1x y 0.93±0.25 en LB 0.5x, mientras que en las no estimuladas los valores fueron significativamente menores (0.34±0.03 y 0.39±0.09, respectivamente). En ambos casos, el valor de p fue de 0.03, indicando que la diferencia es estadísticamente significativa.

Los resultados indican que la estimulación acústica puede influir en la formación de *biofilm*. Los efectos dependen del medio de cultivo y el material de la superficie, lo que sería motivo de investigaciones biológicas que podrán utilizar el dispositivo aquí desarrollado.

V. **Discusión**

Se logró generar una vibración con amplitudes en el rango de los nanómetros, específicamente dirigida a la placa Petri, minimizando la influencia de interferencias externas. Las mediciones realizadas en condiciones similares a las del entorno final validaron la estabilidad de la señal vibratoria (54). Además, la documentación detallada de los criterios de diseño respalda la replicabilidad del sistema, tanto en su configuración original como en posibles modificaciones posteriores.

A diferencia de otros estudios (31), este trabajo presenta un enfoque integral que detalla la configuración experimental, los equipos utilizados y las especificaciones de los componentes, asegurando una mayor transparencia en la metodología. La caracterización del sistema permite validar la fiabilidad de los resultados obtenidos y facilita su comparación con sistemas de vibración previos.

El desarrollo de este prototipo de bajo costo hace accesible la evaluación de condiciones de vibración en laboratorios con recursos limitados. En particular, los laboratorios biológicos requieren equipos especializados debido, entre otras razones, a restricciones de bioseguridad, lo que suele incrementar significativamente los costos de investigación. En este contexto, el sistema propuesto representa una alternativa asequible al priorizar el uso de componentes comerciales, como el amplificador Creative T60 y parlantes convencionales, en lugar de sistemas más costosos como agitadores electromecánicos o piezoeléctricos (31,35).

Las simulaciones realizadas mostraron que la distribución de los desplazamientos en la placa Petri sigue un comportamiento similar al observado en sistemas piezoeléctricos (33), con mayores amplitudes de vibración en los extremos de la superficie. Esto sugiere que el dispositivo puede replicar los efectos mecánicos inducidos por otros actuadores de vibración, con la ventaja de ser una opción más accesible y adaptable.

El tipo de material de la placa de cultivo juega un papel determinante en la propagación de la vibración, por ejemplo, en el estudio de Lindsay (2016) exploran cómo los gradientes térmicos en las placas Petri afectan la transmisión de ondas (55). En este caso la variable presentada es la rigidez. El poliestireno, con un módulo de Young de 3.2 GPa, presentó una deformación significativamente mayor en comparación con el borosilicato, cuyo módulo de Young es de aproximadamente 64 GPa, lo que representa una diferencia

del 1900% en rigidez estructural. Estas diferencias influyen directamente en la transmisión de la vibración, ya que materiales con mayor rigidez minimizan la atenuación de las ondas acústicas, favoreciendo una propagación más uniforme y una mayor eficiencia en la transmisión de energía en la interfase sólido-líquido.

En la literatura, se ha propuesto la incorporación de una placa de aluminio para reducir la deformación del poliestireno y aumentar la rigidez estructural del sistema (33,35). Sin embargo, en este estudio se sugiere una alternativa viable mediante el uso de borosilicato, un material con mayor módulo de Young, lo que permite mejorar la estabilidad de la vibración sin la necesidad de estructuras adicionales.

Las propiedades mecánicas del material no solo afectan la propagación de la vibración, sino también su interacción con el entorno experimental. La elasticidad del material, representada por su módulo de Young, determina el grado de deformación bajo carga vibratoria, mientras que la densidad influye en la velocidad de propagación de la onda. Materiales más densos pueden generar una mayor inercia al movimiento, alterando la transmisión de la vibración a lo largo de la superficie de la placa. Estas variables deben considerarse al diseñar dispositivos de estimulación mecánica, ya que cada material responde de manera diferente según sus características estructurales. Por esta razón, una de las principales limitaciones identificadas en este estudio es la necesidad de caracterizar con mayor precisión los materiales utilizados, dado que su respuesta afecta directamente la uniformidad y efectividad de la estimulación vibratoria.

El uso de parlantes como actuadores representa una estrategia eficiente para inducir vibraciones en superficies más amplias. No obstante, se observó que un aumento en la potencia de excitación del sistema puede incrementar el ruido mecánico, particularmente cuando la señal de entrada varía entre 50 mV y 2.5 V. Esta variabilidad sugiere la necesidad de desarrollar un protocolo optimizado para las pruebas con placas de borosilicato, donde se minimicen las interferencias externas y se controle la propagación de la vibración con mayor precisión.

La presencia del medio de cultivo afectó la propagación de la vibración debido a sus propiedades físicas, particularmente su viscosidad y densidad. En las pruebas comparativas con y sin medio de cultivo, se observó que la amplitud de vibración se redujo en más del 50% en presencia del líquido, lo que concuerda con estudios que

demuestran cómo la viscosidad y la densidad alteran las características vibratorias de los materiales (56). Este fenómeno ocurre porque el medio actúa como un amortiguador mecánico, absorbiendo parte de la energía vibratoria y limitando la transmisión eficiente hacia la interfase sólido-líquido (57). Estudios previos han validado que la absorción de energía por parte de medios líquidos introduce amortiguamiento en sistemas vibratorios, afectando la estabilidad de la respuesta oscilatoria (58). Estos resultados resaltan la importancia de calibrar la amplitud de vibración en función de la densidad del medio para compensar la disipación de energía en futuros experimentos.

Si bien este estudio se centró en la caracterización del sistema de estimulación acústica, los resultados obtenidos pueden servir como base para investigaciones futuras sobre la interacción entre vibraciones mecánicas y sistemas biológicos. Se ha propuesto que la estimulación acústica en el rango de 1000-2000 Hz podría inducir cambios en la adhesión celular a través de mecanismos de mecanosensación bacteriana. Estudios previos han reportado que *P. aeruginosa* responde a estímulos mecánicos mediante la activación de sistemas de señalización asociados a la formación de *biofilm* (31,35). Sin embargo, este trabajo no evaluó directamente dichos efectos, por lo que futuras investigaciones podrían explorar la influencia de la vibración en la adhesión celular y la organización estructural del *biofilm* utilizando técnicas de microscopía avanzada y análisis de expresión génica.

Los resultados obtenidos destacan la importancia de realizar estudios adicionales para comprender mejor los mecanismos de interacción entre la vibración acústica y los sistemas biológicos. Se recomienda explorar otros rangos de frecuencia y evaluar el impacto de la estimulación a largo plazo, además de caracterizar con mayor precisión los materiales utilizados en la propagación de ondas mecánicas. A partir de estas observaciones, el sistema desarrollado en este estudio representa un avance significativo en la generación de vibraciones controladas y abre nuevas posibilidades para su aplicación en distintos contextos experimentales.

VI. Conclusiones

- Un sistema basado en parlantes de motor magnético logra modular la amplitud y frecuencia de vibración sobre la superficie de una placa Petri para cultivos de *P. aeruginosa* con resultados comparables a sistemas basados en piezoeléctricos, a una fracción de su costo
- Integrando datos de medición directa (amplitud en el punto central) y simulación (distribución de la vibración en la superficie) se logra una caracterización completa del movimiento, lo que se requiere para controlar los experimentos biológicos.
- Debido a la forma de transmisión de movimiento del sistema desarrollado, materiales con un mayor coeficiente de Poisson requieren voltajes más altos (p.ej. borosilicato 0.5 V), en comparación con materiales de menor coeficiente de Poisson (p.ej. poliestireno 0.05 V) para generar desplazamientos nanométricos.

VII. Referencias bibliográficas

1. Snyder RA, Ellison CK, Severin GB, Waters CM, Brun Y V. Surface Sensing Stimulates Cellular Differentiation in *Caulobacter crescentus*. bioRxiv [Internet]. 2019 Nov 16 [cited 2024 Nov 18];844324. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/844324v1>
2. Totani M, Kojima M, Horade M, Mae Y, Ogura T, Kaneko M, et al. Microfluidic device for applying a mechanical stimulus to a large number of cellular nuclei. MHS 2017 - 28th 2017 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science. 2017 Jul 2;2018-January:1–2.
3. Mechanosensitivity and Mechanotransduction. Mechanosensitivity and Mechanotransduction. 2011;
4. Mierke CT. Mechanosensing and the mechanotransduction of cells. Physics of Cancer, Volume 4 (Second Edition). 2023 Nov 1;1-1-1–114.
5. Groeger S, Wang Y, Ruf S, Wang L. The Dual Roles of Lamin A/C in Mechanosensation to Compressive Force. 2023 Dec 11 [cited 2024 Nov 19]; Available from: <https://www.researchsquare.com/article/rs-3586140/v1>
6. Iglesias MA, Plaza-Rodriguez AI, Robinson DN, Iglesias PA. A computational model of mechanosensation shows how contractility kits promote the accumulation of contractile proteins at the site of applied stress. Biophys J [Internet]. 2024 Feb 8 [cited 2024 Nov 19];123(3):128a–9a. Available from: <http://www.cell.com/article/S0006349523015850/fulltext>
7. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology 2016 14:9 [Internet]. 2016 Aug 11 [cited 2024 Jul 5];14(9):563–75. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.94>
8. Ramos JL, Goldberg JB, Filloux A. Pseudomonas: Volume 7: New aspects of pseudomonas biology. Pseudomonas: Volume 7: New Aspects of Pseudomonas Biology. 2015 Jan 1;1–316.

9. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*. 2018 Dec 1;4(12):e01067.
10. Dufrière YF, Persat A. Mechanomicrobiology: how bacteria sense and respond to forces. *Nature Reviews Microbiology* 2020 18:4 [Internet]. 2020 Jan 20 [cited 2022 May 29];18(4):227–40. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0314-2>
11. Nirody JA, Sun YR, Lo CJ. The biophysicist’s guide to the bacterial flagellar motor. *Adv Phys X* [Internet]. 2017 Mar 4 [cited 2024 Jul 9];2(2):324–43. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/23746149.2017.1289120>
12. Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol*. 2014 Sep 1;22(9):517–27.
13. Muhammad MH, Idris AL, Fan X, Guo Y, Yu Y, Jin X, et al. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front Microbiol*. 2020 May 21;11:928.
14. Habash M, Reid G. Microbial biofilms: Their development and significance for medical device-related infections. *J Clin Pharmacol*. 1999;39(9):887–98.
15. O’Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2000 Oct 1 [cited 2024 Jul 29];54(Volume 54, 2000):49–79. Available from: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
16. Koch B, Worm J, Jensen LE, Højberg O, Nybroe O. Carbon limitation induces sigma(S)-dependent gene expression in *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2001 Aug [cited 2024 Jul 8];67(8):3363–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11472905/>
17. Flemming HC. “Economical and Technical Overview,” In: *Microbially Influenced Corrosion of Materials Scientific and Engineering Aspects* [Internet]. Heitz Ewald, Flemming HC, Sand W, editors. Springer-Verlag Berlin; 1996 [cited 2024 Jul 28]. Available from: <https://link.springer.com/book/9783642800191>

18. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ. Cystic fibrosis and pseudomonas aeruginosa: The host-microbe interface. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2024 Jul 8];32(3). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00138-18>
19. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology* 2015 13:5 [Internet]. 2015 Apr 8 [cited 2024 Jul 8];13(5):269–84. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3432>
20. Ciofu O, Moser C, Jensen PØ, Høiby N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 2022 20:10 [Internet]. 2022 Feb 3 [cited 2024 Jul 8];20(10):621–35. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00682-4>
21. Assefa M, Amare A. Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections: A Review. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2022 Aug 31 [cited 2024 Jul 8];15:5061–8. Available from: <https://www.dovepress.com/biofilm-associated-multi-drug-resistance-in-hospital-acquired-infectio-peer-reviewed-fulltext-article-IDR>
22. González-Rivas F, Ripolles-Avila C, Fontecha-Umaña F, Ríos-Castillo AG, Rodríguez-Jerez JJ. Biofilms in the Spotlight: Detection, Quantification, and Removal Methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Jul 11];17(5):1261–76. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12378>
23. Justo JA, Bookstaver PB. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2014 Dec 12 [cited 2022 Jul 11];7:343. Available from: [/pmc/articles/PMC4271721/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2471721/)
24. Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S, Kumargowda ST, Challapilli SB. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiologica* 2018 63:4 [Internet]. 2018 Jan 19 [cited 2022 Apr 24];63(4):413–32. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-018-0585-4>

25. Tümmler B, Klockgether J. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Res* [Internet]. 2017 [cited 2022 May 16];6. Available from: [/pmc/articles/PMC5538032/](https://doi.org/10.1093/f1000res/2017/6/1)
26. Rietsch A. *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Edited by Pierre Cornelis. Norfolk (United Kingdom): Caister Academic Press. \$300.00. ix + 244 p. + 8 pl.; ill.; index. 978-1-904455-19-6. 2008. . <https://doi.org/10.101086/596265> [Internet]. 2008 Dec [cited 2024 Jul 9];83(4):409–10. Available from: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/596265>
27. Mikkelsen H, Sivaneson M, Filloux A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2022 Apr 24];13(7):1666–81. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x>
28. Chang CY. Surface sensing for biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2018 Jan 9;8(JAN):2671.
29. Fazeli H, Akbari R, Moghim S, Narimani T, Arabestani MR, Ghoddousi AR. *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospital means, and personnel’s specimens. *J Res Med Sci*. 2012 Apr;17(4):332–7.
30. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2019 [cited 2022 Aug 25];32(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00031-19>
31. Murphy MF, Edwards T, Hobbs G, Shepherd J, Bezombes F. Acoustic vibration can enhance bacterial biofilm formation. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 May 28];122(6):765–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27338651/>
32. Kirsch A, Hortobagyi D, Stachl T, Karbiener M, Grossmann T, Gerstenberger C, et al. Development and validation of a novel phonomimetic bioreactor. *PLoS One* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Jun 9];14(3):e0213788. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0213788>

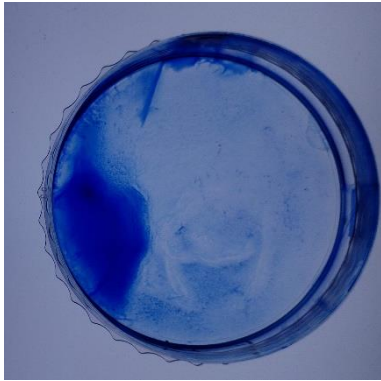
33. Nikukar H, Childs PG, Curtis ASG, Martin IW, Riehle MO, Dalby MJ, et al. Production of Nanoscale Vibration for Stimulation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Nanotechnol* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2022 May 28];12(7):1478–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29337487/>
34. Robertson SN, Campsie P, Childs PG, Madsen F, Donnelly H, Henriquez FL, et al. Control of cell behaviour through nanovibrational stimulation: nanokicking. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* [Internet]. 2018 May 28 [cited 2021 Nov 22];376(2120). Available from: </pmc/articles/PMC5915650/>
35. Robertson SN, Childs PG, Akinbobola A, Henriquez FL, Ramage G, Reid S, et al. Reduction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation through the application of nanoscale vibration. *J Biosci Bioeng*. 2020 Mar 1;129(3):379–86.
36. Liu P, Tian Z, Hao N, Bachman H, Zhang P, Hu J, et al. Acoustofluidic multi-well plates for enrichment of micro/nano particles and cells. *Lab Chip* [Internet]. 2020 Sep 15 [cited 2022 Jun 13];20(18):3399–409. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/lc/d0lc00378f>
37. Ballance WC, Oh I, Lai Y, Elhebeary M, Saif T, Hu Y, et al. Vibration at structural resonance frequency of hydrophilic substrates enhances biofilm removal. *Sens Actuators B Chem*. 2019 Nov 15;299:126950.
38. Hong SH, Gorce JB, Punzmann H, Francois N, Shats M, Xia H. Surface waves control bacterial attachment and formation of biofilms in thin layers. *Sci Adv* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Jun 13];6(22):9386–413. Available from: <https://www.science.org>
39. Hong SH, Gorce JB, Punzmann H, Francois N, Shats M, Xia H. Surface waves control bacterial attachment and formation of biofilms in thin layers. *Sci Adv* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Jun 13];6(22):9386–413. Available from: <https://www.science.org>
40. Sutjahjo E, Chamis CC. Finite element procedures for coupled linear analysis of heat transfer, fluid and solid mechanics. *Collection of Technical Papers - AIAA/ASME Structures, Structural Dynamics and Materials Conference*

- [Internet]. 1993 [cited 2024 Nov 19];(pt 5):2919–29. Available from: <https://arc.aiaa.org/doi/10.2514/6.1993-1639>
41. Li BQ. Discontinuous Finite Elements in Fluid Dynamics and Heat Transfer. 2006 [cited 2024 Nov 19]; Available from: <https://link.springer.com/10.1007/1-84628-205-5>
 42. Nithiarasu P. A unified fractional step method for compressible and incompressible flows, heat transfer and incompressible solid mechanics. *Int J Numer Methods Heat Fluid Flow*. 2008;18(2):111–30.
 43. User Manual CFG253 3 MHz Function Generator.
 44. Creative T60 Compact Hi-Fi 2.0 Desktop Speakers with Clear Dialog and Surround by Sound Blaster for Computers and Laptops - Creative Labs (Pan Euro) [Internet]. [cited 2024 Jan 29]. Available from: <https://en.creative.com/p/speakers/creative-t60>
 45. AS04504PS-X-R PUI Audio | Mouser Perú [Internet]. [cited 2023 Aug 26]. Available from: <https://www.mouser.pe/ProductDetail/PUI-Audio/AS04504PS-X-R?qs=RcG8xmE7yp2oV%252BxCPoSZVw%3D%3D>
 46. Andersen TH, Huber R, Kretz A, Fjeld M. Feel the beat: Direct manipulation of sound during playback. *Proceedings of the First IEEE International Workshop on Horizontal Interactive Human-Computer Systems, TABLETOP'06* [Internet]. 2006 [cited 2024 May 7];2006:123–6. Available from: https://www.researchgate.net/publication/4215923_Feel_the_beat_direct_manipulation_of_sound_during_playback
 47. Goswami U, Leong V. Speech rhythm and temporal structure: Converging perspectives? *Lab Phonol*. 2013 May 30;4(1).
 48. Feldman M. Hilbert transform in vibration analysis. *Mech Syst Signal Process*. 2011 Apr 1;25(3):735–802.
 49. Modos de vibración de una membrana circular [Internet]. [cited 2023 Aug 26]. Available from: <http://www.sc.ehu.es/sbweb/fisica3/ondas/membrana/membrana.html>

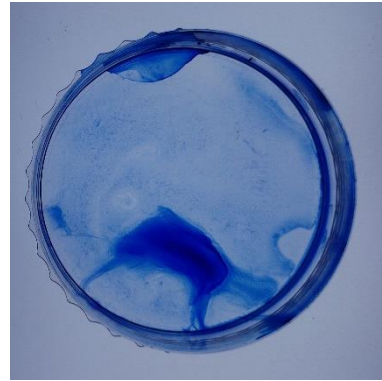
50. Dickinson E J F, Ekström H, Fontes E. COMSOL Multiphysics®: Finite element software for electrochemical analysis. A mini-review. *Electrochem commun.* 2014;40:71–4.
51. Kern D, Framke N. Automation of COMSOL Multiphysics Parameter Studies using the MATLAB LiveLink. 2012;
52. Nassan TH, Amro M. Finite Element Simulation of Multiphase Flow in Oil Reservoirs -Comsol Multiphysics as Fast Prototyping Tool in Reservoir Simulation. *Mining science and technology.* 2020;4(3):220–6.
53. O’Toole GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp [Internet].* 2011 [cited 2024 Jan 29];(47). Available from: /pmc/articles/PMC3182663/
54. Šuránek P, Mahdal M, Tůma J. Laboratory model for active vibration control. In: *Proceedings of the 2015 16th International Carpathian Control Conference, ICCO 2015.* Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.; 2015. p. 517–20.
55. Lindsay SM, Yin J. Temperature gradients drive radial fluid flow in petri dishes and multiwell plates. *AIChE Journal.* 2016 Jun;62:2227–33.
56. Huang L, Zhao L, Tan R, Lu D, Yang P, Jiang Z. A Novel Piezoelectric Resonator for Liquid Density and Viscosity Measurement. In: *Proceedings of 2020 International Conference on Sensing, Diagnostics, Prognostics, and Control, SDPC 2020.* Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.; 2020. p. 313–6.
57. Sathiya S, Sikander A. Online Estimation of Liquid Viscosity and Density Based on Artificial Neural Network Approach. In: *Advances in Intelligent Systems and Computing.* Springer; 2020. p. 1403–12.
58. Toledo J, Ruiz-Díez V, Velasco J, Hernando-García J, Sánchez-Rojas JL. 3d-printed liquid cell resonator with piezoelectric actuation for in-line density-viscosity measurements. *Sensors.* 2021 Nov;21.

Anexos

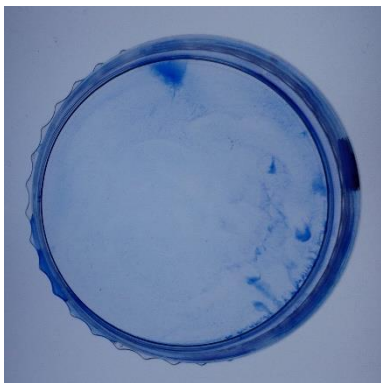
Anexo A: Placas de las mediciones realizadas para PAO1 en medio LB



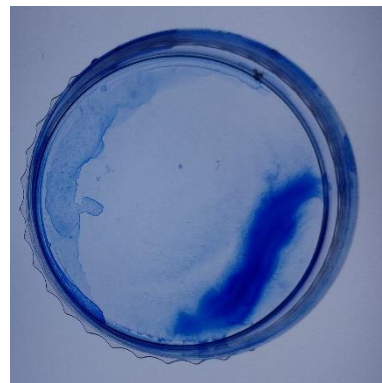
(a)



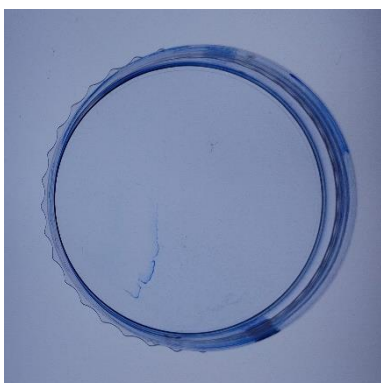
(b)



(c)



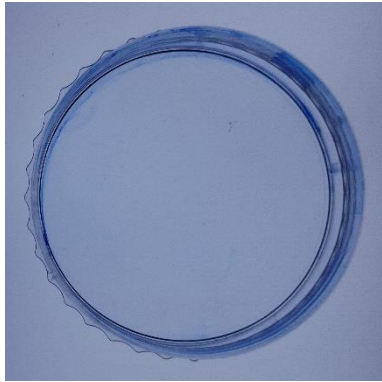
(d)



(e)



(f)

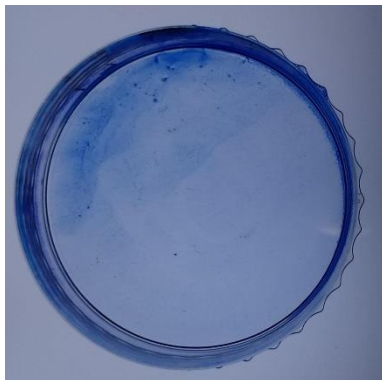


(g)

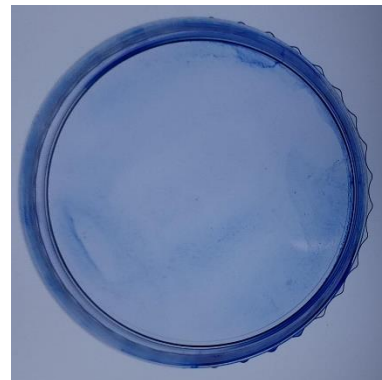


(h)

Figura A.1: Placas obtenidas para la Cepa PAO 1 con medio LB. (a), (b), (c) y (d) han sido estimuladas en 2000 Hz a 50 mV, (e) es el blanco (no contiene bacteria) y (f), (g) y (h) no han sido estimuladas



(a)



(b)



(c)



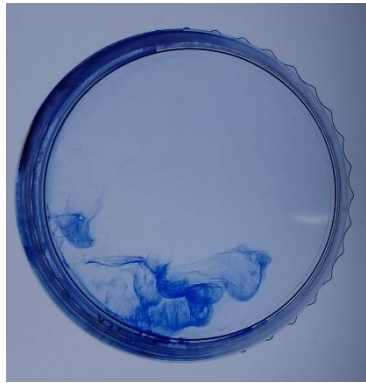
(d)



(e)



(f)



(g)



(h)

Figura A. 2: Placas obtenidas para la Cepa PAO 1 con medio 0.5x LB. (a), (b), (c) y (d) han sido estimuladas en 2000 Hz a 50 mV, (e) es el blanco (no contiene bacteria) y (f), (g) y (h) no han sido estimuladas