



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS

DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Exploración de la sensibilidad colateral del fitopatógeno *Erwinia amylovora*
expuesto a nanopartículas de óxido de zinc**

TESIS

para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL

Presenta

Diana Laura Aboites Quiriarte

Director

Dr. Joan Sebastián Salas Leiva

Departamento de Medio Ambiente y Energía

CIMAV

Codirector

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Departamento de Acuicultura

Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste, S.C.

CIBNOR

Chihuahua, Chih. México

Abril, 2024

Resumen

El estado de Chihuahua es el principal productor de manzana a nivel nacional. Sin embargo, la producción se ha visto afectada por diversos factores, entre ellos las plagas y enfermedades como lo es la mancha de fuego, una de las enfermedades más severas causada por la bacteria *Erwinia amylovora* (*E. amylovora*), la cual tiene la capacidad de infectar cultivos de alto interés comercial de la familia de las Rosáceas como la manzana, generando pérdidas significativas económicas y de producción. Para su control y tratamiento se ha empleado el uso de antibióticos, sin embargo, debido a su uso indiscriminado, se han reportado cepas resistentes a estos métodos de control. Por otro lado, la nanotecnología ofrece nanomateriales con propiedades antimicrobianas, como las nanopartículas de óxido de Zinc (ZnO-NP) entre otras; sin embargo, se han reportado cepas resistentes a las nanopartículas. Para hacer frente a esta problemática en esta investigación se propone lo que se denomina sensibilidad colateral. El objetivo de esta investigación fue determinar la existencia de la sensibilidad colateral en *E. amylovora* expuesta a nanopartículas de óxido de zinc. Para ello, se determinó la concentración inhibitoria de crecimiento (IC_{90}) y se llevó a cabo una presión selectiva donde se expuso continuamente a la cepa control *E. amylovora* WT a 0.2 mg/mL. Se obtuvieron las cepas *E. amylovora* 13G y 20G con mayor resistencia al ZnO-NP con respecto al control. Así mismo, para determinar la sensibilidad colateral, se probaron 216 agentes antimicrobianos distribuidos en las placas de Microarray de fenotipo Biolog PM de la 11 a la 19. También se determinaron los cambios en el metabolismo del carbono mediante el uso de Biolog Ecoplate. La Presión selectiva a ZnO-NP en *E. amylovora* estimuló cambios fenotípicos. Entre estas adaptaciones se presentó un aumento en el tamaño celular, mayor diversidad en el uso fuentes de carbono especialmente por aminoácidos, así como un incremento y reducción en la susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos. Por otro lado, es

importante resaltar que *E. amylovora* WT presenta un plásmido de resistencia a estreptomicina el cual tras la presión selectiva a las ZnO-NP, presentó sensibilidad colateral a estreptomicina y disminución de la sensibilidad al cloruro de zinc.

Abstract

The state of Chihuahua is the main apple producer nationwide. However, production has been affected by various factors, including pests and diseases such as fire spot, one of the most severe diseases caused by the bacteria *Erwinia amylovora* (*E. amylovora*), which has the capacity to infect high-quality crops. commercial interest of the Rosaceae family such as the apple, generating significant economic and production losses. The use of antibiotics has been used for its control and treatment; however, due to their indiscriminate use, strains resistant to these control methods have been reported. On the other hand, nanotechnology offers nanomaterials with antimicrobial properties, such as Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NP) among others; However, strains resistant to nanoparticles have been reported. To address this problem, this research proposes what is called collateral sensitivity. The objective of this research was to determine the existence of collateral sensitivity in *E. amylovora* exposed to zinc oxide nanoparticles. For this, the growth inhibitory concentration (IC90) was determined, and a selective pressure was carried out where the control strain *E. amylovora* WT was continuously exposed to 0.2 mg/mL. The *E. amylovora* 13G and 20G strains with greater resistance to ZnO-NP were obtained with respect to the control. Likewise, to determine collateral sensitivity, 216 antimicrobial agents distributed on Biolog PM phenotype Microarray plates 11 to 19 were tested. Changes in carbon metabolism were also determined by using Biolog Ecoplate. Selective pressure to ZnO-NP in *E. amylovora* stimulated phenotypic changes. Among these adaptations there was an increase in cell size, greater diversity in the use of carbon sources, especially amino acids, as well as an increase and reduction in susceptibility to different antimicrobial agents. On the other hand, it is important to highlight that *E. amylovora* WT presents a streptomycin resistance plasmid which, after selective pressure to ZnO-NPs, presented collateral sensitivity to

streptomycin and decreased sensitivity to zinc chloride.

Contenido

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	10
1. Marco Teórico.....	13
1.1. Importancia del cultivo de manzana.....	13
1.2 <i>Erwinia amylovora</i> como fitopatógeno del manzano	13
1.3 Mecanismos de control de <i>Erwinia amylovora</i>	15
1.3.1 Antibióticos	15
1.3.2 Nanopartículas metálicas.....	16
1.4 Mecanismos de resistencia antimicrobiana	18
1.4.1 Resistencia a Antibióticos	22
1.4.2 Resistencia a Nanopartículas	25
1.5 Sensibilidad Colateral	28
1.6 Métodos de evaluación de sensibilidad colateral (Biolog® PM).....	32
1.7 Determinación del metabolismo de carbono (Biolog® EcoPlate)	33
2.Hipótesis.....	34
3.Objetivo General	34
3.1Objetivos Específicos.....	34
4. Metodología	35
4.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc	35

4.2 Caracterización de óxido de zinc	35
4.3 Cultivo de <i>Erwinia amylovora</i>	36
4.4 Determinación de Concentración Inhibitoria del 90% (IC ₉₀).....	36
4.4.1 Preparación de dispersión stock de ZnO-NP.....	36
4.4.2 Ensayo azul alamar en microplaca (MABA)	37
4.5 Presión selectiva mediante la determinación de la dosis letal (IC ₉₀).	38
4.6 Determinación del mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas de óxido de zinc por daño mecánico	39
4.7 Preparación cepas bacterianas para microscopía electrónica de barrido MEB	40
4.8 Determinación del metabolismo de carbono	41
4.9 Determinación de la sensibilidad colateral	42
5. Resultados	45
5.1 Síntesis de nanopartículas	45
5.2 Estructura de nanopartículas por DRX.....	45
5.3 Morfología de nanopartículas por MET	46
5.4 Morfología de nanopartículas por SEM	48
5.5 Determinación de IC ₉₀	49
5.6 Curvas de Crecimiento de <i>E. amylovora</i>	50
5.7 Morfología de <i>E. amylovora</i>	52
5.8 Mecanismo de acción de las Pt-ZnO.....	54
5.10 Determinación de la sensibilidad colateral.....	60

6. Discusión.....	74
7. Conclusión	79
8. Recomendaciones	80
9. Bibliografía	81

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de acción de las nanopartículas	18
Figura 2. Mecanismo de resistencia a los antimicrobianos	19
Figura 3. Mecanismos de resistencia vertical y horizontal.....	21
Figura 4. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.....	22
Figura 5. Sensibilidad colateral.....	30
Figura 6. Programas de rotación de antimicrobianos	31
Figura 7. Difracción de rayos X.....	46
Figura 8. Micrografías de campo claro obtenidas por MET.....	47
Figura 9. Micrografía electrónica de barrido.....	48
Figura 10. Determinación de IC ₉₀ de <i>E. amylovora</i>	49
Figura 11. Curvas de crecimiento	51
Figura 12. Micrografías de <i>E. amylovora</i> obtenidas en microscopía electrónica de barrido.....	52
Figura 13. Histogramas de frecuencia de tamaño de <i>E. amylovora</i>	53
Figura 14. Mecanismo de acción de las Pt-ZnO.....	55
Figura 15. Metabolismo de <i>E. amylovora</i> (EcoPlate).....	56

Figura 16. Diagrama de agrupamiento por similitud UPGMA.....	57
Figura 18. Mapa de calor del consumo de fuentes de carbono	58
Figura 19. PM 11	60
Figura 20. PM 12	61
Figura 21. PM 13	62
Figura 22. PM14	63
Figura 23. PM 15	64
Figura 24. PM16	65
Figura 25. PM 17	66
Figura 26. PM 18	67
Figura 27. PM 19	68
Figura 28. Consolidado de porcentajes de sensibilidad colateral y resistencia de <i>E. amylovora</i> 13G.....	69
Figura 29. Consolidado de porcentajes de sensibilidad colateral y resistencia de <i>E. amylovora</i> 20G.....	70
Figura 30. Diagrama de conjuntos de resistencia	71
Figura 31. Diagrama de conjuntos de sensibilidad colateral	72

Índice de tablas

Tabla 1. Desarrollo de resistencia a nanopartículas antimicrobianas tras presión selectiva.....	27
---	----

AGRADECIMIENTOS

Extiendo mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Joan Sebastián Salas Leiva por todo lo que conllevó desarrollar este proyecto de tesis, el apoyo, la asesoría, el recurso, las oportunidades y todo el aprendizaje adquirido a lo largo de este viaje llamado maestría.

A mi codirector el Dr. Eduardo Quiroz Guzmán por su disposición, tiempo, dedicación y esfuerzo durante la estancia para el desarrollo de la tesis.

A mis evaluadores la Dra. María Antonia Luna, el Dr. Francisco Paraguay y la Dra. Yuridia Ortiz por fungir como guía, por sus recomendaciones, correcciones, conocimiento, que sin duda han dado lugar y forma a esta investigación.

A Aurora Araiza quien fungió como mi maestra y asesora, brindarme orientación y compartirme su conocimiento que sirvieron como base para el desarrollo de esta tesis, así como dedicar tiempo y esfuerzo a este proyecto.

Introducción

En México, el estado de Chihuahua es el principal productor de manzana (*Malus domestica*). En el año 2020 se tuvo una producción de 594 mil 711 toneladas correspondientes a más de un 83% de la producción nacional (SADER, 2021). Sin embargo, la producción de manzana se ha visto afectada por diversos factores como el binomio cambio climático-calentamiento global, que involucra sequías, acumulación de frío invernal, plagas y enfermedades de las plantas (Ramírez *et al.*, 2021). Entre ellas la infección causada por la mancha del fuego, una de las enfermedades más severas causada por la bacteria Gramnegativa *Erwinia amylovora*, la cual tiene la capacidad de infectar cultivos de alto interés comercial de la familia de las Rosáceas como la manzana, pera, durazno, entre otras. Esta enfermedad puede originar la muerte de yemas florales, daño sistemático en la planta y en múltiples ocasiones puede causar hasta la muerte de los árboles, lo que conlleva a pérdidas económicas significativas (Donat, 2004; Romo Chacón *et al.*, 2011). Entre los métodos más comunes para el control y tratamiento de esta enfermedad se encuentra la aplicación de antibióticos sintéticos (i.e Estreptomicina y Oxitetraciclina) (Gill *et al.*, 2003; Mesa, 2021; Nagy *et al.*, 2012), sin embargo, debido al uso inapropiado de estos, se han generado cepas resistentes a los múltiples antibióticos (Prada *et al.*, 2015; Romo Chacón *et al.*, 2011; Serra, 2017). Así mismo, se han utilizado compuestos de cobre (e.g.e, hidróxido de cobre y sulfato de cobre) (Chillo, 2019; Dagher *et al.*, 2020) no obstante, se ha reportado que son fitotóxicos y en varios países se ha prohibido el uso de estas medidas de control (Dagher *et al.*, 2020). En la actualidad, el uso de la nanotecnología ha sido una alternativa que ha permitido un control antimicrobiano mediante el uso de ciertas nanopartículas (NPs) por ejemplo óxido de zinc (ZnO), TiO₂, CuO, entre otras. Estas se presentan como una opción para el control y tratamiento de bacterias fitopatógenas debido a su acción antimicrobiana y amplio espectro (Cortez, 2018;

Rivas & Torres, 2021; Zavaleta *et al.*, 2019). Sin embargo, se han reportado cepas resistentes a nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, por ejemplo: cepas *Escherichia coli* 013, *E. coli* CCM 3954 y *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a nanopartículas de plata (Panáček *et al.*, 2018). La resistencia a los antimicrobianos pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de infecciones causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos (OMS, 2015). Para hacer frente a esta problemática se viene estudiando lo que se denomina “sensibilidad colateral” que es un fenómeno que se produce cuando los cambios fisiológicos y metabólicos asociados con el mecanismo de resistencia de una bacteria frente a un antibiótico concreto ocasionan que la bacteria sea más sensible a otro antibiótico distinto (Holguín *et al.*, 2017; Pál *et al.*, 2015). Por ejemplo, en un estudio se probaron cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes que contenían un gen que altera la biosíntesis de la membrana externa de lipopolisacáridos, una vez adquirida la resistencia al antibiótico colistin observaron sensibilidad a azitromicina, rifampicina, vancomicina amikacina, ceftazidima, imipenem, cefepime, y meropenem debido a la pérdida del polisacárido (Holguín *et al.*, 2017). Así mismo al evaluar la sensibilidad colateral de *P. aeruginosa* multirresistente, la cepa evolucionó mediante una presión selectiva para resistir a ciprofloxacina al mismo tiempo se observó que generó sensibilidad a piperacilina y la tobramicina (Barbosa *et al.*, 2019). De acuerdo a Holguín *et al.* (2017) se ha planteado tres mecanismos por los cuales un microorganismo puede desarrollar susceptibilidad colateral: i) mutaciones o alteraciones de la membrana en los cuales se puede disminuir el transporte activo de uno de ellos, y presentar una disminución en la actividad de las bombas de expulsión para otros antimicrobianos; ii) alteración de las actividades reguladas por el ADN, llevan a que la bacteria cambie su fenotipo (pleiotropismo) y, por ende, se presente susceptibilidad a otros antimicrobianos y iii) dos antimicrobianos que son afines a la misma enzima pueden presentar

susceptibilidad colateral (Holguín *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta estos antecedentes el presente proyecto de investigación tiene como objetivo determinar la existencia de la sensibilidad colateral del fitopatógeno *E. amylovora* expuesto a nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs). Determinar la sensibilidad colateral abre nuevas perspectivas que permite conocer la susceptibilidad de *E. amylovora* a otros antimicrobianos y de esa manera generar conocimiento para el desarrollo de protocolos de manejo de estos como, por ejemplo, tiempos de usos y/o rotación de estos para su control.

1. Marco Teórico

1.1. Importancia del cultivo de manzana

El manzano (*Malus domestica*) es un árbol frutal, de la familia de las rosáceas, subfamilia Pomoideas y género *Malus*, caducifolio (Díaz, 2016; Dolz, 2008; SAGARPA, 2017). A nivel mundial se producen 87,236,221 toneladas de manzana al año. En la actualidad China es el país con mayor producción de manzana, produce aproximadamente 42,426,578 toneladas al año lo que corresponde al 50% de la totalidad a nivel mundial seguido de la Unión Europea y los Estados Unidos (Toranzo, 2016). En el 2020, en México se produjeron 714 mil 203 toneladas de manzana, se estima que la producción va en aumento, el cual la mayor producción de manzana la lidera el estado de Chihuahua seguido de Coahuila y Puebla (SADER, 2021).

1.2 *Erwinia amylovora* como fitopatógeno del manzano

Erwinia amylovora, es una bacteria (bacilo) Gramnegativa, de la familia Enterobacteriaceae, que presenta flagelos peritricos, es anaerobia facultativa, fermentativa, no forma esporas (Mesa, 2021) y su temperatura óptima de crecimiento es 28°C (Santander & Biosca, 2017). *E. amylovora* es considerado un fitopatógeno, responsable de la enfermedad conocida como la mancha de fuego o fuego bacteriano, una de las enfermedades más frecuentes del grupo de las rosáceas (manzana y pera), aunque presenta un amplio rango de hospederos (e.g., nogales, tejocote (*Crataegus* spp), membrillo (*Cydonia* spp) *nispero* (*Eriobotrya* spp), Espino de fuego (*Pyracantha* spp) (Doolotkeldieva et al., 2021; FIPRODEFO, 2020; Razo et al., 2021; Romo et al., 2011). El nombre de la enfermedad “Mancha de fuego” hace referencia al efecto parduzco y necrótico de las ramas, flores, hojas y frutos, presentando un aspecto como si hubieran sido quemados con fuego. La enfermedad origina la necrosis de yemas florales, estas se

secan con una coloración de naranja a negro y los pedúnculos suelen presentar exudados (compuesto de polisacáridos) en gotas (FIPRODEFO, 2020). Las hojas y los frutos se marchitan, se producen frutos inmaduros, presentan curvatura en los nuevos brotes, podredumbre y en las ramas hay formación de canchales (FIPRODEFO, 2020; Piqué et al., 2015; Romo et al., 2011). Para llevar a cabo el ciclo de la enfermedad es necesario un hospedador susceptible, condiciones ambientales que favorezcan el crecimiento de *E. amylovora*, como la estación del año, clima y espacio geográfico, así como, las condiciones del huésped según su especie y variedad. Los síntomas de la enfermedad suelen aparecer al inicio de la primavera, en la etapa de floración. La enfermedad se introduce a través de las flores, los estomas y las heridas causadas por granizo (Santander & Biosca, 2017) y puede ser diseminada por insectos (vectores), viento y/o agua a través del riego, lluvia, lixiviación y la poda (FIPRODEFO, 2020). Así mismo, la temperatura de entre 18° C a 29°C, una humedad relativa alta y la cantidad de inóculo son condiciones ambientales que favorecen la infección (Donat, 2004). En consecuencia, puede causar hasta la muerte de estos árboles, generando una significativa amenaza mundial para la producción comercial de estos cultivos (Piqué et al., 2015; Romo-Chacón et al., 2011)

Dentro de los factores de virulencia que exhibe *E. amylovora* destacan el sistema de secreción tipo III (T3SS), secreta un exopolisacárido (EPS) amilovorano que obstruye el sistema vascular del árbol, así mismo, tiende a la formación de biopelículas y a la motilidad

1.3 Mecanismos de control de *Erwinia amylovora*

1.3.1 Antibióticos

Entre las opciones de control actualmente disponibles, la aplicación profiláctica de antibióticos en la agricultura se ha utilizado ampliamente, para prevenir y curar enfermedades en los cultivos. La estreptomycinina, un aminoglucósido, ha sido el más utilizado en huertos de manzanos y perales para tratar enfermedades como la mancha de fuego causada por *E. amylovora*. Además, se rocían antibióticos como oxitetraciclina y kasugamicina para controlar la infección (Donat, 2004; (Mann et al., 2021)). En México, los productores han empleado como método de control y tratamiento el uso de los antibióticos (i.e., estreptomycinina, gentamicina, tetraciclina y oxitetraciclina) productos de cobre (hidróxido de cobre y el sulfato de cobre el ingrediente activo es el ion cobre divalente solubilizado) aunado al uso de sulfato de cobre y extractos orgánicos de plantas como (i.e., orégano, tomillo y canela), sin embargo, el uso indiscriminado ha generado problemas de resistencia principalmente a estreptomycinina (Dagher et al., 2020; García et al., 2020). En Canadá y EE. UU., se aplican estreptomycinina y kasugamicina durante la floración abierta para obtener el control del patógeno, sin embargo, en la mayor parte de los países europeos está prohibido el uso de estreptomycinina (Svircev et al., 2018). Esto dificulta el control de la enfermedad puesto que se ha estimado que la estreptomycinina ha sido el antibiótico eficaz para su control (Nagy et al., 2012). En la actualidad los antibióticos han sido catalogados como contaminantes emergentes debido a que además de promover la aparición de microorganismo resistentes afectan negativamente a los ecosistemas y los organismos que los habitan incluyendo el ser humano (Martínez-Alcalá et al., 2020).

1.3.2 Nanopartículas metálicas

La nanotecnología ofrece nanomateriales con propiedades antimicrobianas, como las nanopartículas (NP) de óxidos metálicos, óxido de zinc (ZnO-NP), óxido de cobre (CuO-NP) entre otras. Se ha reportado que las (ZnO-NP) son efectivas frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas, hongos y virus, esto las convierte en una atractiva alternativa puesto que poseen un amplio espectro de acción y un bajo nivel de resistencia, son estables y fáciles de sintetizar (Zavaleta Espejo, 2019). Actualmente, las NP se emplean cada vez más como antimicrobianos en comparación a los antibióticos convencionales para combatir eventos infecciosos (Cuenca, 2021). El tamaño, la morfología y la composición de las nanopartículas es muy importante puesto que su efectividad antimicrobiana depende en gran medida de estas características (Cuenca, 2021; Mba & Nweze, 2021; Mesa, 2021; Rivas & Torres, 2021).

El óxido de zinc (ZnO) se caracteriza por su capacidad para actuar contra especies químicas y biológicas (Zavaleta Espejo, 2019). Otros trabajos señalan que las NP de óxidos metálicos pueden liberar iones metálicos a través de adsorción, disolución e hidrólisis (Vázquez et al., 2018). Los mecanismos de acción antibacterianos de las ZnO-NP no están completamente definidos, sin embargo, se proponen cuatro principales mecanismos de acción: i) generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), ii) liberación de iones zinc y iii) el contacto directo con las NP mediante interacción electrostática (Marques et al., 2024; Zavaleta Espejo, 2019) y iv) la acumulación de iones en la membrana celular (Zavaleta Espejo, 2019) como se muestra en la figura 1. Dentro de las ERO que pueden formarse a partir de las Zn-NP son: El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la molécula más reactiva el radical hidroxilo (OH). En general estas especies se caracterizan por ser altamente reactivas y oxidantes ya que presentan un electrón no apareado, el H_2O_2 atraviesa la pared celular, la membrana en consecuencia produce daño en el ADN,

desnaturalización de las proteínas, fuga del contenido intracelular debido al daño oxidativo en los lípidos y proteínas y finalmente la muerte celular (De los Santos & Picazzo, 2016; Vázquez et al., 2018; Zavaleta et al., 2019). Las interacciones entre la bacteria y las NP por factores químicos o físicos pueden alterar el funcionamiento de la bacteria. Las interacciones entre la pared celular y la membrana de la bacteria con las NP se llevan a cabo por fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno y reacciones químicas (Raza et al., 2021). Entre los mecanismos de acción antimicrobiana de las NP se encuentran la muerte por contacto, el efecto de las especies liberadas de iones y tensión o daño mecánico, la destrucción mecánica se basa en la obstrucción física de las células mediante la ruptura generada por nanoestructuras afiladas (Raza et al., 2021). Los grupos acetato e hidroxilo en la superficie de las ZnO-NP pueden unirse fácilmente con los grupos hidroxilo y amino del peptidoglicano (Marques et al., 2024). Algunas NP tienen la capacidad de unirse a las membranas debido a su carga positiva, facilita su interacción con la carga negativa de la membrana celular interactuando con los lípidos de la membrana y los grupos electronegativos de los polisacáridos, estos son sitios de atracción para cationes metálicos como el Zn^{+2} , por interacción electrostática, se acumulan en la superficie de la membrana y/o con la pared celular alterando su estructura y permeabilidad. Además, este mecanismo interrumpe la replicación del ADN y la producción de ATP, generando la muerte de las bacterias (Vázquez et al., 2018). Los iones metálicos interactúan con el ADN y alteran su conformación helicoidal mediante enlaces cruzados (cambios moleculares en la estructura). También la transducción de señales se ve afectada por cationes metálicos (Vázquez et al., 2018)

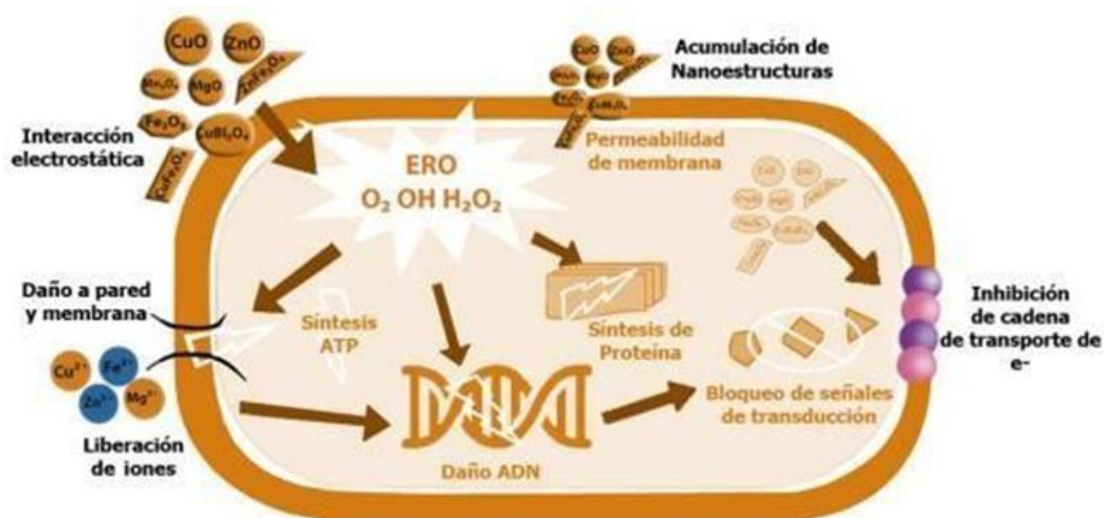


Figura 1. Mecanismo de acción de las nanopartículas (Vázquez et al., 2018)

1.4 Mecanismos de resistencia antimicrobiana

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos se pueden clasificar en mecanismos de resistencia genética (i.e mutaciones) y en resistencia mecanicista (i.e modificación de moléculas antimicrobianas, resistencia por procesos adaptativos celulares globales) (Mann et al., 2021). Entre los mecanismos de resistencia antimicrobiana se destacan: 1) modificación del sitio activo u objetivos antimicrobianos, 2) disminución de la absorción de fármacos donde disminuye la permeabilidad de la pared celular para el ingreso del antimicrobiano, 3) Producción de bombas de eflujo, 4) cambios importantes en las vías metabólicas, 5) inactivación de fármacos, 6) enzimas hidrolíticas y 7) mutaciones en genes que codifican sitios diana (Mann et al., 2021; Moreno et al., 2009) como se muestra en la figura 2.

Las bacterias desarrollan resistencia a los antimicrobianos mediante diversos mecanismos: sintetizan enzimas, como las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que inactivan los antibióticos al hidrolizar el anillo betalactámico; alteran las proteínas fijadoras de penicilina

(PBP), reduciendo la afinidad del antimicrobiana y modifican la permeabilidad celular, a través de cambios en el diámetro y la cantidad de porinas, limitando la entrada de los antimicrobianos; emplean bombas de eflujo para expulsar antimicrobianos al exterior de la célula; y modifican vías bioquímicas, reduciendo la eficacia antibiótica. También pueden inactivar los fármacos una vez dentro de la célula mediante reacciones químicas como la acetilación o la metilación. Además, la resistencia puede surgir por mutaciones genéticas que alteran sitios diana de los antibióticos, como la ADN polimerasa y topoisomerasas, haciéndolas impermeables o incapaces de unirse a estos agentes (Mann et al., 2021; Moreno et al., 2009; UNAM, 2019). Este conocimiento es crucial para desarrollar estrategias efectivas contra la resistencia antimicrobiana

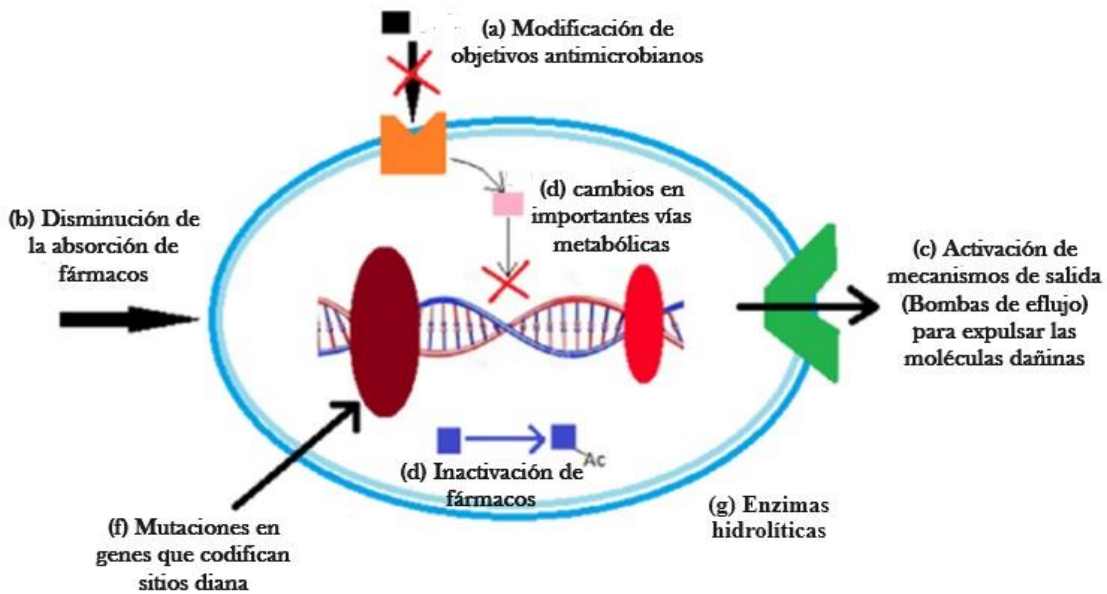


Figura 2. Mecanismo de resistencia a los antimicrobianos (Mann et al., 2021)

Por otro lado, existen otros mecanismos que permiten la variabilidad genética y la evolución bacteriana, confiriéndole a la bacteria la capacidad de adaptarse al medio y adquirir resistencia antimicrobiana a través de dos mecanismos básicos: vertical (a) y horizontal (b) como se aprecia en la figura 3. La transferencia vertical produce una mutación en el genoma bacteriano y se transfieren los genes de resistencia durante la reproducción bacteriana a su progenie. Por el contrario, en la transferencia horizontal las bacterias intercambian genes de virulencia en procesos como: la conjugación, transducción y transformación. En la conjugación, existe un intercambio de información genética entre bacterias, mediado por plásmidos, estos, son elementos genéticos móviles de forma circular, contiene material genético extracromosomal y se duplican de manera autónoma e independiente al proceso de replicación, se intercambian de una célula a otra a través de una estructura conocida como pili sexual. De forma similar, la transducción se caracteriza por la inyección de material genético de un bacteriófago (virus que infectan bacterias) a una bacteria, donde el virus integra su genoma en el ADN de la bacteria y esta información genética puede contener genes de resistencia antimicrobiana y transferirse a otra bacteria. Por último, el proceso de transformación da lugar, una vez que una bacteria sufre lisis, este material genético extracelular es liberado al medio, es capturado e integrado al genoma de una bacteria viable y como consecuencia puede expresarse (Chávez-Jacobo, 2020; Moreno et al., 2009).

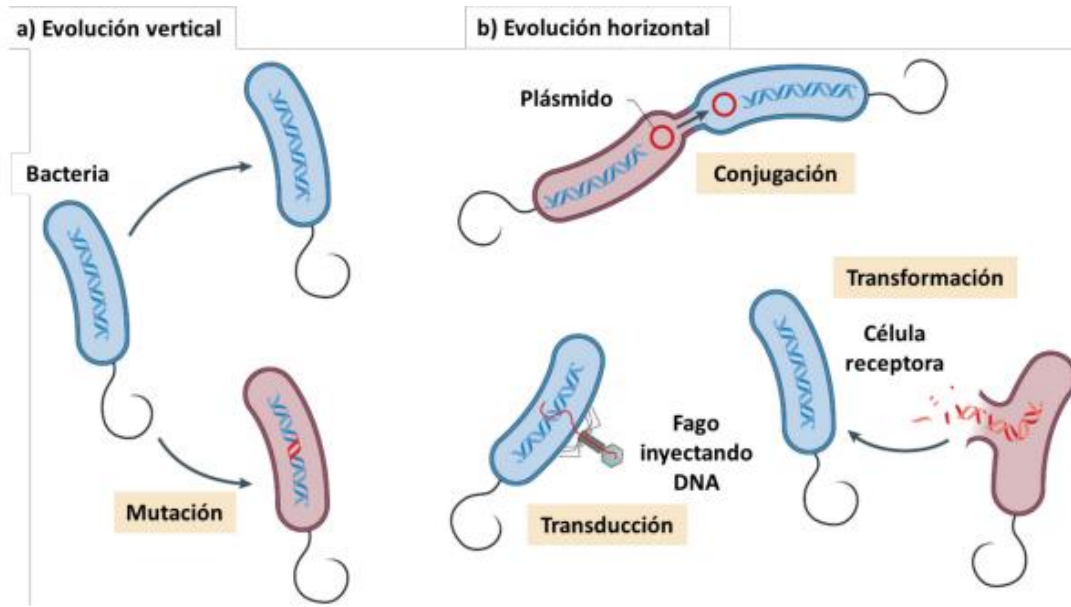


Figura 3. Mecanismos de resistencia vertical y horizontal (Chávez-Jacobo, 2020)

1.4.1 Resistencia a Antibióticos

Los antibióticos son sustancias producidas por varios microorganismos (hongos y bacterias) o de manera sintética en el laboratorio. Tienen la capacidad de destruir la célula bacteriana (bactericidas) o retardar el crecimiento de las bacterias (bacteriostáticos) y se clasifican de acuerdo con su clase, espectro, mecanismo de acción y estructura química como se muestra a continuación en la figura 3 (Camacho, 2023; Patiño, 2023).

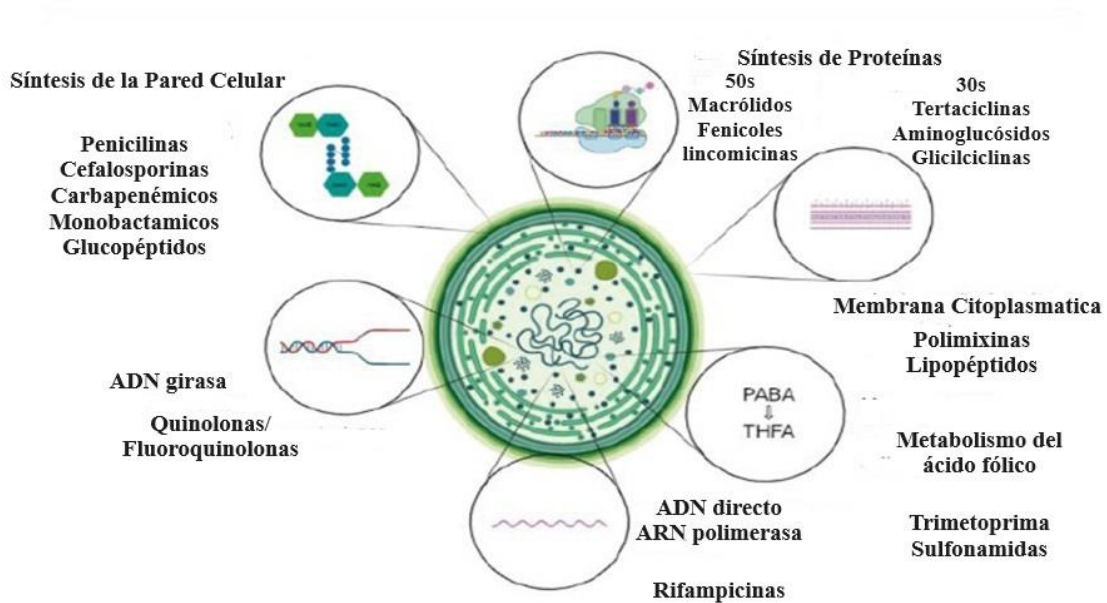


Figura 4. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción. (Camacho, 2023)

La forma más frecuente de clasificar los antibióticos es de acuerdo con el mecanismo de acción que el fármaco ejerce sobre la estructura bacteriana, por ejemplo, sobre la síntesis de pared celular, la permeabilidad de la membrana, enzimas que involucran la síntesis de ADN, la producción de ácido fólico y la síntesis de proteínas (Patiño, 2023).

Los antibióticos ejercen una fuerte presión selectiva sobre las bacterias (Santos-Lopez et al., 2021). La presión selectiva es un proceso evolutivo, de selección natural, en el que las bacterias debido al amplio uso y el mal uso de los antimicrobianos en un determinado periodo de tiempo adquieren mecanismos de resistencia, lo que da como resultado la pérdida de la efectividad de estas medidas de control y tratamiento y con ello la aparición de cepas capaces de crecer en presencia de un compuesto tóxico (agentes antimicrobianos). La presión selectiva es la base de la resistencia adaptativa, es el resultado de modificaciones en la estructura y en las características funcionales del microorganismo o de características adquiridas en respuesta al estrés ejercido por la presión selectiva de los antibióticos, a su vez, les proporciona una ventaja adaptativa con mejores oportunidades de reproducción y de sobrevivencia (Camacho, 2023; Troncoso et al., 2017).

El hecho de que las bacterias adquieran resistencia a los antibióticos suele acompañarse de una reducción de la aptitud física en ausencia de los antibióticos conocido como “coste de aptitud física” (Suzuki et al., 2016) .

La resistencia a antibióticos ha sido descrita por la OMS como un problema importante en términos de medio ambiente, salud humana y salud animal, debido a la disposición inadecuada, estos fármacos se introducen al suelo y al agua mediante los efluentes de las plantas tratadoras de agua residual, vertederos, desechos agrícolas y la aplicación de biosólidos en los campos (Jałowiecki et al., 2017). Además, es un problema global emergente, que representa un desafío creciente por el consumo excesivo, y uso indiscriminado, precisamente estos factores han incrementado la probabilidad de que los microorganismos desarrollen resistencia antimicrobiana gracias la capacidad de las bacterias para transferir genes de resistencia a otras bacterias a través de plásmidos (Dagher et al., 2020; Donat, 2004; Mann et al., 2021; Piqué et al., 2015; Romo et

al., 2011). La resistencia a antibióticos es mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facilidad de transmitirlo no solo a su descendencia sino a otras bacterias de diferente género y especie (Moreno et al., 2009).

Por otro lado, se ha reportado que el fitopatógeno *E. amylovora* está desarrollando resistencia a los antibióticos, se han encontrado cepas de *E. amylovora* resistentes a estreptomicina y oxitetraciclina (Gill et al., 2003; Mesa, 2021; Nagy et al., 2012). En *E. amylovora* existen descritos plásmidos como el pEa29 que le confiere resistencia a estreptomicina (de León Door et al., 2013; Romo et al., 2011) Salas-Leiva (comunicación personal). Estos plásmidos se han encontrado en cepa *E. amylovora* de huertos manzaneros de Cuauhtémoc (Chihuahua, México).

1.4.2 Resistencia a Nanopartículas

El zinc es un ion metálico y un metal pesado esencial para la fisiología y la respiración celular, la replicación del ADN y el ARN, la señalización intracelular, la síntesis proteica cuya función como componente estructural y cofactor de proteínas, actúa como centro catalítico de enzimas como las metaloproteasas, superóxido dismutasas y las metalobetalactamasas; estos son algunos de los procesos básicos para la vida en los que el zinc es imprescindible además de su abundancia en la célula. Según (Rensing et al., 2018) la cantidad total de zinc en una célula de *E. coli* corresponde en un rango similar a las concentraciones celulares de calcio y hierro. Por otro lado, los metales esenciales en altas concentraciones son tóxicos para las bacterias.

Ahora bien, antes del descubrimiento de los antibióticos, los metales pesados se utilizaban con mayor frecuencia en prácticas terapéuticas contra las infecciones. No obstante, se prevé que los microorganismos han adquirido resistencia a los metales de manera natural, debido a su exposición por el entorno en el que habitan, del mismo modo, se ha observado que han adquirido resistencia debido a la exposición de metales por contaminación antropogénica. Dicho lo anterior, algunos estudios mencionan que las altas concentraciones de metales activan mecanismos de resistencia de tal forma que aumentan la tolerancia microbiana a estos metales.

En consecuencia, los microorganismos han evolucionado para sobrevivir y han logrado desarrollar ingeniosamente mecanismos de resistencia a los metales y mecanismos de desintoxicación en respuesta a su exposición en el medio ambiente, expulsando iones metálicos, lo que también conduce a la expulsión de antibióticos como mecanismo de defensa a estos. los microorganismos utilizan sistemas de eflujo para eliminar los metales de la célula mediante bombas denominadas ATPasa o bombas quimiosmóticas. Los genes de resistencia que codifican para resistir a los metales pesados pueden ser los mismos para resistir al efecto antimicrobiano de

los antibióticos (Eggers et al., 2021).

Por otra parte, entre las nuevas alternativas antimicrobianas, las NP se han propuesto como una opción para inhibir patógenos bacterianos, sin embargo, se han reportado cepas resistentes a las NP. Esta resistencia adquirida por algunas bacterias ha generado una alarmante preocupación, como método antimicrobiano, para hacer frente al problema de resistencia que se presenta con los antibióticos (Kumari & Kamat, 2023). Así mismo, la frecuente aplicación de nanopartículas prevé la generación de resistencia a estos agentes potenciales (Mba & Nweze, 2021). Por otro lado, las bacterias pueden desarrollar resistencia a las nanopartículas mediante mecanismos de alteraciones en la membrana, resistencia adaptativa reversible, modificaciones irreversibles en la división celular, cambio en la motilidad, cambio en la morfología, la formación de biopelículas, producción de bombas de eflujo, repulsión electrostática, exclusión de metales y la síntesis de plásmidos R y flagelina (Kumari & Kamat, 2023; Salas Orozco et al., 2019). También se ha observado que la mutación ha sido el principal mecanismo bacteriano de resistencia a las NP. Así mismo, se ha reportado que las NP metálicas (i.e., óxidos metálicos) estimulan la coselección y coexpresión de genes de resistencia a los antibióticos (Mba & Nweze, 2021). No obstante, un estudio ha reportado que al exponer cultivos de *E. Coli* a concentraciones subletales de ZnO-NP dicha exposición originó un aumento en la permeabilidad de la membrana de las bacterias y potencializó la transferencia conjugativa de plásmidos de resistencia a fármacos (Mba & Nweze, 2021). Así mismo, algunos estudios han reportado diferentes cepas resistentes a nanopartículas de plata, por ejemplo, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Panáček et al., 2018).

A continuación, en la tabla 1 se resumen algunos ejemplos que destacan el desarrollo de resistencia a NP en un determinado tiempo de exposición (generaciones) y los cambios fenotípicos y genéticos generados en cepas microbianas.

Tabla 1. Desarrollo de resistencia a nanopartículas antimicrobianas tras presión selectiva.

Revisado por: (Kumari & Kamat, 2023)

Tipo de nanopartícula	Organismo resistente	Tiempo de desarrollo de resistencia (Generaciones)	Cambios observados genético/ celular/fenotípico	Referencia
Nanopartículas de Ag recubiertas de citrato	<i>E. coli</i> K-12 MG1655	225 generaciones	Mutation in <i>cusS</i> , <i>purl</i> , <i>rpoB</i> , <i>ompR</i>	Graves et al., 2015
Nanopartículas de Ag	<i>E. coli</i>		Sobreproducción de exopolisacáridos.	Joshi et al., 2012
Nanopartículas de Ag	<i>E. coli</i> 013, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 and <i>E. coli</i> CCM 3954		Producción de flagelina de proteína de flagelo adhesivo que desencadena la agregación de nanopartículas	Panáček et al., 2018
Nanopartículas de Ag recubiertas de Ag ₂ S	<i>E. coli</i>	100 generaciones	Regulación positiva de genes MDR, genes transportadores de eflujo de Cu	Li et al., 2019
Nanopartículas de ZnO	<i>E. coli</i>	25 generaciones	Los cambios en la forma de la célula (de varilla a ovalada) probablemente por una baja expresión de la proteína de membrana RodZ, porinas.	Zhang et al., 2018
Nanopartículas de Ag	<i>E. coli</i>		Modulación del tabique de división del anillo Z, regulación positiva de componentes de permeasa de genes citoprotectores, proteínas de eflujo	Gunawan et al., 2013
Hierro cerivalente a nanoescala	<i>Pseudomonas putida</i> F1		Membrana celular rígida por la conversión cis a trans de ácidos grasos insaturados	Kotchaplai et al., 2017

1.5 Sensibilidad Colateral

La sensibilidad o susceptibilidad colateral es una compensación evolutiva relacionada con la adquisición del fenotipo adaptativo de resistencia a un antibiótico conduciendo a una mayor susceptibilidad no adaptativa a otros fármacos (Hernando-Amado et al., 2022, 2023) Dicho de otra forma, es un fenómeno que se produce cuando un microorganismo que ha desarrollado resistencia a un antimicrobiano genera un aumento en la sensibilidad de uno o más antimicrobianos (Ardell & Kryazhimskiy, 2021; Barbosa et al., 2019; Dunkley et al., 2019; Herencias et al., 2021; Pál et al., 2015). En otras palabras, la exposición de un microorganismo a un antimicrobiano A desarrolla resistencia y da paso al aumento en la hipersensibilidad a un antimicrobiano B (Barbosa et al., 2019; Holguín et al., 2017; Udekwu & Weiss, 2018).

Se ha explorado la evolución adaptativa microbiana en presencia de un solo antibiótico, como resultado existe una modificación en el perfil de sensibilidad a otros fármacos de un antimicrobiano en relación con la administración de uno anterior (Holguín et al., 2017; Pál et al., 2015). Las interacciones evolutivas como la sensibilidad colateral proponen que el desarrollo de la sensibilidad y/o la resistencia de un microorganismo frente a un antimicrobiano originará un efecto inverso. Estas interacciones evolutivas se plantean como una alternativa de control y tratamiento para contrarrestar la resistencia bacteriana (Holguín et al., 2017). La adquisición de un mecanismo de resistencia representa en muchos casos, costos físicos para la bacteria, es decir, se compensa en adquirir resistencia, pero se descompensa en alguna otra característica o propiedad, por ejemplo, la pérdida en la actividad de la homeostasis. De esta manera también se explica la sensibilidad colateral (Holguín et al., 2017). Las interacciones evolutivas tienen la capacidad de transformar la efectividad de los antimicrobianos. Los cambios o modificaciones en

las interacciones evolutivas pueden ser mediadas por alteraciones en los genes que conceden resistencia a los fármacos.

Se han propuesto tres mecanismos por los cuales una bacteria puede adquirir sensibilidad colateral: El primer mecanismo es a través de mutaciones o alteraciones en la membrana, donde se logra una disminución del transporte activo y a su vez una disminución en la actividad de las bombas de expulsión, es decir, mutaciones que evitan el ingreso de ciertos antimicrobianos mediante el sistema de transporte activo Protón-Motive Force (PMF), y una disminución en la actividad de las bombas de expulsión, lo cual, accede a que los antimicrobianos que son dependientes de estas bombas presenten una mayor concentración intra-bacteriana, este efecto se presenta por ejemplo en los aminoglucósidos. El segundo mecanismo es mediado por alteraciones en la actividad del ADN donde la bacteria sufre un cambio fenotípico y por lo tanto presenta susceptibilidad a los antimicrobianos que tienen su mecanismo de acción en el ADN como las quinolonas. El tercer mecanismo se caracteriza por dos antimicrobianos que tienen afinidad por una misma enzima y pueden presentar sensibilidad colateral (Holguín et al., 2017).

En el estudio in vitro de la sensibilidad colateral una cepa bacteriana con un perfil de susceptibilidad conocido o sin ningún mecanismo de resistencia, se expone a concentraciones crecientes de un antimicrobiano luego la cepa bacteriana adquiere resistencia a dicho antimicrobiano y se evalúa la sensibilidad del microorganismo a la exposición de otros antimicrobianos de interés.

Se puede observar que existe un proceso inverso cuando se genera resistencia al antimicrobiano al que fue sometido en concentraciones crecientes se observa disminución en la susceptibilidad a los antimicrobianos de interés como lo muestra la Figura 4.

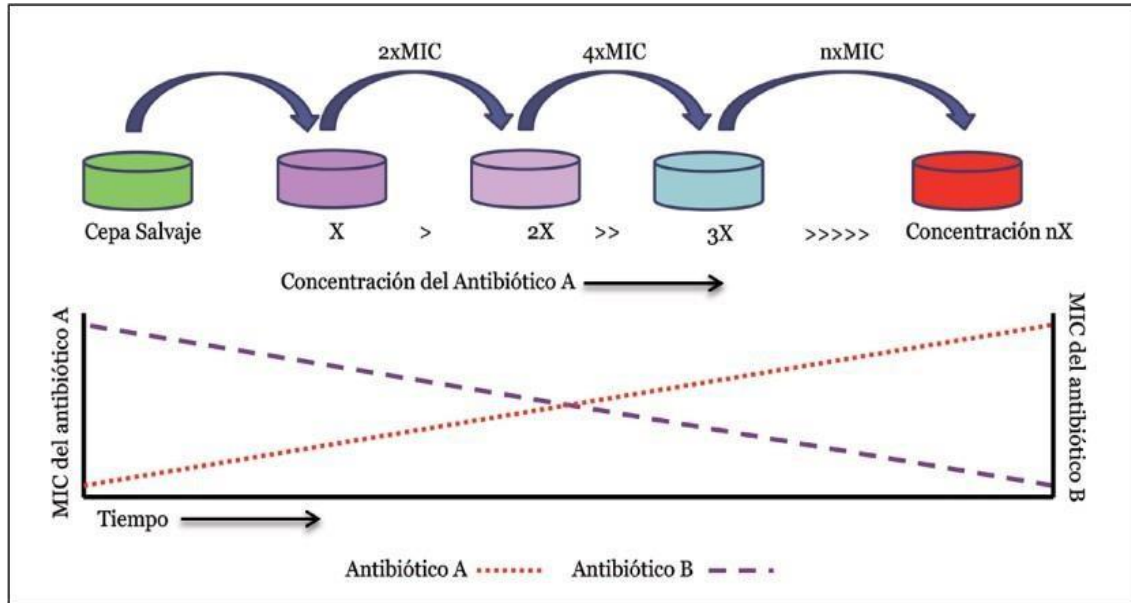


Figura 5. Sensibilidad colateral. (Holguín et al., 2017)

Muestra el proceso in vitro de la sensibilidad colateral de una cepa bacteriana que es sometida a concentraciones crecientes, es un proceso inverso donde un antimicrobiano A aumenta la MIC y el antimicrobiano de interés B al que es evaluado disminuye su MIC. (Holguín et al., 2017).

Así mismo, se ha descrito la sensibilidad colateral como una alternativa terapéutica frente a la resistencia microbiana para evaluar y dirigir futuras prácticas de control y tratamiento lo que conlleva a un mejor uso de los antimicrobianos actualmente disponibles y generar un plan en los programas de administración de antimicrobianos (Holguín et al., 2017; Pál et al., 2015). Con este plan se propone llevar a cabo una rotación de las alternativas antimicrobianas donde la resistencia que se ve favorecida a la continua exposición de un determinado fármaco y con base a la teoría de compensación, se producirá una pérdida del mecanismo de resistencia y en consecuencia el microorganismo podrá presentar de nuevo un fenotipo de sensibilidad donde este antimicrobiano inicial puede retornar su viabilidad terapéutica.

El programa de rotación de antimicrobianos prevé y propone que cuando un microorganismo

inicialmente susceptible adquiere resistencia a un antimicrobiano **A**, luego se lleva a cabo la rotación hacia un antimicrobiano **B**; al anular la terapia del antimicrobiano **A** hay una disminución en la presión del antimicrobiano **A** en el microorganismo, lo cual genera una pérdida de genes de resistencia al antimicrobiano **A** debido al alto costo que genera mantener ese mecanismo de resistencia en la bacteria por la presión originada del antimicrobiano **B**. Como se aprecia en la Figura 4 (Holguín et al., 2017).

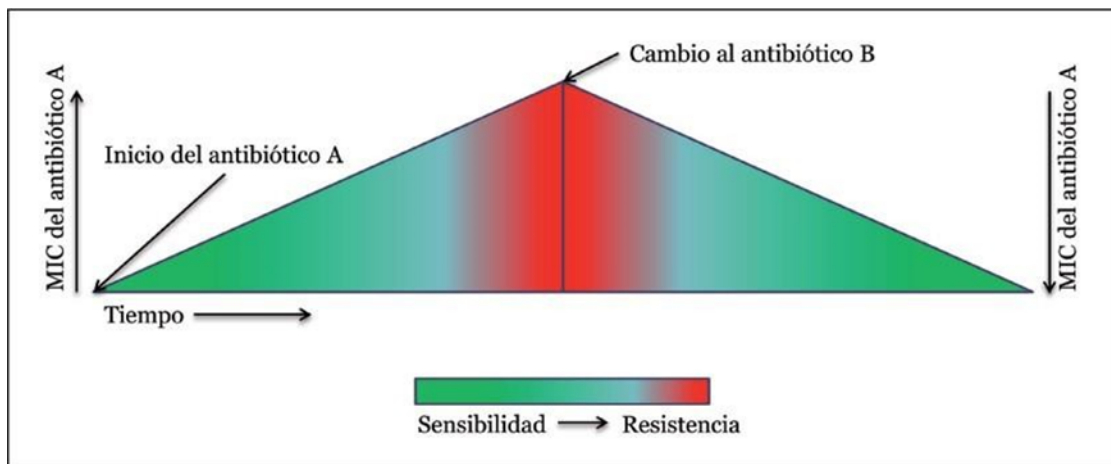


Figura 6. Programas de rotación de antimicrobianos (Holguín et al., 2017).

1.6 Métodos de evaluación de sensibilidad colateral (Biolog® PM)

El fenotipo son todas las características físicas, estructurales, bioquímicas y fisiológicas, incluyendo las que no se detectan a simple vista en un organismo y están determinadas por la interacción de su genoma y el ambiente (Zerón, 2010). La tecnología “Microarrays de fenotipo (PM)” es una herramienta para la caracterización cuantitativa del estado fisiológico en que se encuentra una célula u organismo, así como también es un método para la detección de sustancias que alteran el fenotipo de este (Dunkley et al., 2019; Shea et al., 2012). Su empleo es de sumo beneficio y son adecuadas para una amplia gama de aplicaciones en la investigación científica en las áreas de la salud y del medio ambiente. Por ejemplo, en la identificación del fenotipo de bacterias Grampositivas, Gramnegativas, levaduras, hongos y células de mamíferos (Shea et al., 2012) . Así mismo, se ha empleado para medir los cambios en el metabolismo celular en un determinado tiempo o bajo diversas condiciones ambientales. Del mismo modo, se han evaluado candidatos a fármacos como antibióticos en perfiles toxicológicos y análisis del modo de acción. Los paneles PM son microplacas de 96 pocillos que contienen diferente sustrato en cada pocillo (Jałowiecki et al., 2017). Cada placa PM de la 11 a la 19 contiene 24 antimicrobianos diferentes, los cuales están dispuestos en pocillos a concentraciones crecientes, pertenecientes a diferentes clases químicas (i.e., aminoglucósidos, β -lactámicos, lincosamidas, antibióticos sintéticos, glucopéptidos, tetraciclinas, fenicoles, macrólidos, sulfonamidas y rifampicinas). El reactivo redox que se emplea en los ensayos de identificación bacteriana de Biolog es un tinte de tetrazolio, es una molécula incolora, soluble en agua, que se reduce fácilmente a formazán en presencia de un donador de electrones produciendo una coloración azul, violeta, rojo o fluorescente (Shea et al., 2012). En cada pocillo se añade este reactivo redox el cual si presenta actividad metabólica se produce un cambio de coloración (Dunkley et al.,

2019b; Jałowiecki et al., 2017). La intensidad del cambio de color del tinte redox hace referencia a la cantidad de sustrato que se consume. El cambio de coloración se puede determinar cuantitativamente mediante un equipo como el Varioskan LUX y en algunos casos cualitativamente se ha observado a simple vista (Dunkley et al., 2019a; Jałowiecki et al., 2017).

1.7 Determinación del metabolismo de carbono (Biolog® EcoPlate)

En la investigación ecológica aplicada se han utilizado placas EcoPlate como ensayo para determinar la estabilidad de una población microbiana y evaluar cambios tras la aparición de alguna variable ambiental. Las placas Biolog EcoPlate contienen fuentes de carbono comúnmente utilizadas por la mayoría de los microorganismos. Hay 31 fuentes de carbono, incluidos carbohidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, misceláneos, polímeros y aminas (Feng et al., 2023).

2.Hipótesis

La presión selectiva generada por la exposición repetida del fitopatógeno *Erwinia amylovora* a nanopartículas de óxido de zinc ocasionará sensibilidad colateral del microorganismo a otras sustancias o métodos de control.

3.Objetivo General

Determinar la existencia de sensibilidad colateral del fitopatógeno *Erwinia amylovora* expuesto a nanopartículas de óxido de zinc

3.1Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar estructuralmente nanopartículas de óxido de zinc
- Determinar la concentración inhibitoria de crecimiento (IC90) de *E. amylovora* expuesta a ZnO-NP
- Obtener mediante presión selectiva aislados de *E. amylovora* con mayor resistencia al ZnO-NP con respecto al control.
- Determinar la sensibilidad colateral de aislados *E. amylovora* resistentes a las ZnO-NP
- Determinar si la presión selectiva a las ZnO-NP genera cambios metabólicos en *E. amylovora*

4. Metodología

4.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc

Para la síntesis de las nanopartículas de (ZnO) con morfología de plateletas se seleccionó la morfología con base a lo reportado por (Araiza et al., 2023), lo cual señala que las Pt-ZnO presentaron mayor efectividad antimicrobiana frente a *E. amylovora*, *E. Coli* y *Staphylococcus aureus* en comparación a otras morfologías y estructuras de plateletas y esferas con vacancias y sin vacancias de oxígeno. Para su obtención se empleó el método de síntesis hidrotérmal. La síntesis consistió en disolver 1.09 g de acetato de Zinc anhidro $Zn(O_2CCH_3)_2(H_2O)_2$ (5 mmol) y 0.85 g de KOH (15 mmol) en 15 mL de agua tridestilada. Posteriormente, se añadió gota a gota 15 mL de etanol con agitación constante. Una vez obtenida la solución se transfirió a un vial de teflón y ubicó en una autoclave de acero inoxidable a tratamiento térmico de 160°C por 18 h. Después se recuperó el precipitado color blanco y se lavó con agua destilada y se centrifugó, tres veces. Luego, el precipitado de nanopartículas se secó por 4 horas a 100°C. Finalmente el precipitado se pesó y etiquetó para su posterior caracterización (Pariona et al., 2020).

4.2 Caracterización de óxido de zinc

La pureza de fase y tamaño de cristal de los productos sintetizados se analizaron con difracción de rayos X (DRX) en polvos. Los difractogramas se colectaron a temperatura ambiente en un equipo PANalytical X'Pert PRO con fuente de CuK_{α} ($\lambda=1.54\text{\AA}$) en geometría de Bragg-Brentano. El voltaje de aceleración fue de 40 kV y la corriente de 30 mA. Para la detección de los patrones se usó un detector X'Celerator Considerando un barrido de 20 a 80° con incrementos de 0.017° y

un tiempo de 20 segundos. La identificación de las fases se realizó usando la base de datos del programa Match Phase Analysis. Por otra parte, la morfología y tamaño de las nanopartículas se examinaron mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) con emisión de campo con un equipo JEOL modelo JSM-7401F y con Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) empleando un equipo Hitachi HT 7700.

4.3 Cultivo de *Erwinia amylovora*

El aislado de *E. amylovora* fue obtenido de los huertos de manzanos de la ciudad de Cuauhtémoc Chihuahua y se identificó como 7G-CUU en el estudio de León Door *et al.* (2013). Así mismo, fue facilitado por parte del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, sede Cuauhtémoc). El cultivo de *E. amylovora* se realizó siguiendo la metodología de de León Door *et al.* (2013). Se mantuvo la pureza del cultivo resembrando con la técnica de estriado en placas Petri con medio semi-selectivo Crystalvioleta-cyclohexamida-tergitol (CCT) y se incubó por 48 horas a 28 °C, además, el cultivo se enriqueció en caldo de cultivo lisogénico (LB) o placas de LB según se requirió en la experimentación.

4.4 Determinación de Concentración Inhibitoria del 90% (IC₉₀)

4.4.1 Preparación de dispersión stock de ZnO-NP

Se realizó una dispersión stock de 2 mg/mL de ZnO-NP en agua destilada estéril y se sonicaron por 20 minutos para lograr una óptima dispersión. Se formó así una suspensión coloidal uniforme y a partir de esta dispersión se evaluaron diferentes concentraciones para determinar la IC₉₀ con el método de ensayo azul alamar en microplaca (MABA).

4.4.2 Ensayo azul alamar en microplaca (MABA)

Se realizó un ensayo azul alamar en microplaca para conocer la viabilidad celular y determinación de IC_{90} . Se utilizó el reactivo alamarBlue™ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. En resumen, se utilizaron tubos Falcon que contenían 5 mL de una suspensión bacteriana en LB con una OD 600 de 0.065 (4×10^7 UFC/mL) de *E. amylovora*, luego se añadió a cada tubo la cantidad de solución stock de nanopartículas de ZnO calculada para alcanzar las concentraciones a evaluar para el primer ajuste fueron de 50, 140, 200 ppm. Después los tubos se colocaron en incubación con agitación orbital (150 rpm) durante 6 horas (fase logarítmica). Al término del tiempo en incubación, se colocó en una microplaca de fluorescencia 90 μ L de cada tubo y se adicionaron 10 μ L del reactivo alamarBlue™ a cada pocillo. Posteriormente, la microplaca se protegió de la luz con papel aluminio y se colocó en incubación con las mismas condiciones descritas anteriormente. Por último, se realizó la lectura de la microplaca con una longitud de onda de excitación de 560 nm, y una longitud de onda de emisión de 590 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Fisher Scientific). El porcentaje de viabilidad se calculó teniendo en cuenta la fórmula de Kamiloglu *et al.* (2020), y después de establecer el porcentaje de mortalidad, se realizó un análisis Probit (Wiegand Finney, 1972) para determinar la IC_{90} .

4.5 Presión selectiva mediante la determinación de la dosis letal (IC₉₀).

La presión selectiva consistió en exponer a la bacteria *E. amylovora* de tipo salvaje (WT) (la cepa asilada y proveniente de los cultivos de manzana que previamente no había estado expuesta a ZnO-NP) en condiciones de estrés continuo a ZnO-NP. De tal manera que se expuso a una IC₉₀ que correspondió a una concentración de 0.2 mg/mL consecutivamente. Este proceso se realizó con base a la metodología utilizada por Sniegowski (1997) con modificaciones. Donde se realizaron suspensiones bacterianas de *E. amylovora* en un volumen total de 5 mL. Se agregaron 4.450 mL de caldo LB, 0.050 mL de la suspensión bacteriana (4×10^7 UFC/mL) y 0.500 mL de la dispersión stock de ZnO-NP (0.2 mg/mL) por triplicado. Posteriormente se procedió a incubar a 28 °C en agitación constante a 150 rpm, por 24 horas. Una vez transcurrido el periodo de 24 horas de incubación, este se consideró como una generación. De esta generación se transfirieron 0.050 mL a un nuevo vial y se continuo con el procediemimiento anterior bajo las mismas condiciones. Este mismo proceso se llevó a cabo 13 veces, lo cual se definió como la cepa decimotercera generación (*E. amylovora* 13G). Una vez que se obtuvieron 13 generaciones de *E. amylovora* se procedió a realizar un corte y se evaluó la IC₉₀ de la cepa 13G. Como resultado de la evaluación de la IC₉₀ correspondió a una concentración de 1.7 mg/mL, el cual se estableció que dicha concentración no es factible para su aplicación en campo, por lo tanto, se procedió a exponer a la bacteria a 0.2 mg/mL hasta su décimo segunda generación (*E. amylovora* 20G). De cada suspensión bacteriana que se obtuvo se sembró en medio semi-selectivo CCT para su posterior enriquecimiento y conservación en glicerol (40%) de cada generación obtenida *E. amylovora*

4.6 Determinación del mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas de óxido de zinc por daño mecánico

Para efectuar el mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas de óxido de zinc sobre *Erwinia amylovora* se realizó un preinoculo en tubos Corning con 15 mL de caldo LB, se inoculó una colonia bacteriana de las cepas de *Erwinia amylovora*: WT, 13G y 20G respectivamente, y se procedió a incubar por 16 horas a 28°C, en agitación constante a 120 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron lecturas de OD a 600 nm. Posteriormente se realizaron suspensiones bacterianas adicionando 0.050 µL de los preinoculos, 0.500 mL de una solución stock de 0.2 mg/mL y 4.450 mL de caldo LB en un volumen final de 5 mL (4×10^7 UFC/mL) a 28 °C. Se colocaron dos triplicados de cada cepa, el primero en agitación constante a 150 rpm a 28°C por 24 horas y el segundo bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura, exceptuando la agitación. Así mismo, se realizaron diluciones seriadas (en PBS a pH 7.4) y el método de microgota en placas de Petri de agar LB para recuentos de UFC/mL, para los triplicados antes de la incubación y determinar la concentración bacteriana que ingresó y posteriormente una vez concluido el tiempo de incubación se realizó el recuento para determinar la concentración final.

4.7 Preparación cepas bacterianas para microscopía electrónica de barrido MEB

El tamaño (largo y ancho) y la morfología de las cepas WT, 13G y 20G se determinaron a través de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) con base a lo reportado por Thomasson (2011) y Athie-Garcia et al. (2018) con modificaciones. Para la preparación de las muestras WT, 13G y 20G se realizaron preinoculos de 15 mL en caldo LB. De cada cepa se llevaron a cabo dos lavados con buffer fosfato salino PBS (pH 7.4) centrifugados a 7,000 rpm por 5 minutos en cada lavado, retirando el sobrenadante.

Luego se fijó la muestra con glutaraldehído al 2.5%, se incubó por 4 horas a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con PBS. Por consiguiente, se procedió a realizar la deshidratación con el tren de alcohol, a diferentes concentraciones de alcohol las cuales fueron: 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, por duplicado al 95% y 100%. Entre cada concentración, se incubó con la solución de alcohol por 15 minutos a 4°C, pasados los 15 minutos de incubación se centrifugaron a 7,000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, en orden creciente, este paso entre cada concentración de alcohol. Finalmente se fijó cada suspensión de células en una placa de silicio y se dejó secar.

4.8 Determinación del metabolismo de carbono

Mediante el uso de Biolog EcoPlates (Biolog Inc.) se determinó el consumo de fuentes de carbono de las cepas *Erwinia amylovora* WT, 13G y 20G de acuerdo con las especificaciones del fabricante con algunas modificaciones. Las placas biolog EcoPlate contienen 96 pozos con 31 sustratos diferentes de carbono por triplicado, agrupadas con base a los siguientes grupos funcionales: Carbohidratos, misceláneos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, aminos-amidas y polímeros. Para esta prueba se realizaron 3 preinoculos de 16 horas de incubación de cada cepa WT, 13G y 20G. Luego se realizaron dos lavados con 10 mL solución salina estéril y se centrifugaron a 3200 rcf por 8 minutos. Luego se resuspendieron en 15 mL de solución salina; de esta re-suspensión se realizó una dilución 10x (1 mL de la suspensión bacteriana y 9 mL de solución salina), después se procedió a leer densidad óptica de la solución 10x en el equipo varioskan lux a 600 nm, se ajustó a una absorbancia de 0.180 a 0.250 (3.05×10^8 UFC/mL) una vez ajustada se inocularon las placas Ecoplate con una micropipeta multicanal 150 μ L de la solución 10x. Las placas son fotosensibles se cubrieron con aluminio y se incubaron a 28°C, 200 rpm. La actividad metabólica de las 3 cepas se cuantificó por espectrofotometría (equipo Varioskan lux a 600 nm) a las 48 horas. Así mismo se determinó el análisis estadístico, donde se realizó un promedio de las lecturas obtenidas de viabilidad por triplicado y de acuerdo con los datos obtenidos se realizaron análisis estadísticos paramétricos (ANOVA) y no paramétricos (Kruskal-wallis) teniendo en cuenta si cumplían con los supuestos de homocedasticidad y normalidad.

4.9 Determinación de la sensibilidad colateral

Las placas del microarreglo fenotípico biológico PM se realizaron conforme a la metodología establecida por el proveedor con algunas modificaciones. Estas placas contienen 96 pocillos con 24 agentes químicos, entre ellos antimicrobianos, en cuatro concentraciones desconocidas por el proveedor en orden creciente. Se probaron 216 agentes químicos contenidos 24 en cada placa fenotípica PM distribuidos en 9 placas de la PM 11 a la PM 19. Este análisis se realizó con el objetivo de determinar la sensibilidad colateral de las cepas 13G y 20G con respecto a la cepa control (WT). Para ello se realizaron preinoculos de 16 horas de incubación de cada cepa (13G, 20G y WT) por triplicado, una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a hacer dos lavados con solución salina estéril y se centrifugaron a 3200 rcf por 8 minutos a 25°C. Por consiguiente, se resuspendieron en 5 mL de solución salina, luego de esta re-suspensión se realizó una dilución 10x, con 1 mL de la re-suspensión y 9 mL de solución salina ajustando a una densidad óptica entre 0.650-0.750 u.a (8.5×10^8 UFC/mL). Posteriormente en una canaleta para micropipeta multicanal se mezclaron 12 mL del reactivo IF-10, 52 μ L de la dilución 10x y 120 μ L del reactivo Dye mix A. Obtenida la mezcla se inocularon las placas PM por triplicado para cada cepa, (9 placas), se incubaron a 28°C a 200 rpm, se realizaron lecturas de u.a en el equipo Varioskan lux cada 12 horas a 590 nm por 72 horas.

Para llevar a cabo el análisis estadístico se realizó un promedio de las lecturas obtenidas de viabilidad en las cuatro concentraciones por triplicado de cada agente químico y de acuerdo con los datos obtenidos se realizaron análisis estadísticos paramétricos (ANOVA) y no paramétricos (Kruskal-wallis) teniendo en cuenta si cumplían con los supuestos de homocedasticidad y normalidad.

De los 216 agentes químicos que se probaron se determinó cuantos, de estos, las cepas de *E. amylovora* 13G y 20G presentaron sensibilidad colateral y resistencia respectivamente y cuantos no presentaron cambio o modificación alguna con respecto a la cepa control (*E. amylovora* WT) Para esta determinación se utilizó como base el análisis estadístico y las gráficas de las PM en las figuras 17-25.

Para determinar el porcentaje de sensibilidad colateral se tomaron en cuenta los 216 agentes químicos como el 100% y se contaron de cada cepa 13G y 20G de manera independiente a cuantos presentaron sensibilidad colateral en comparación a la cepa WT.

$$\% \text{ Sensibilidad colateral} = \frac{(S) * 100}{TAQ}$$

Donde:

S = Es el número de agentes químicos que la cepa presentó sensibilidad colateral

TAQ = Total de agentes químicos (216) (es una constante)

Así mismo para la determinación del porcentaje de resistencia se tomaron en cuenta los 216 agentes químicos como el 100% y se contaron de cada cepa 13G y 20G respectivamente a cuantos presentaron resistencia en comparación a la cepa WT.

$$\% \text{ Resistencia} = \frac{(R) * 100}{TAQ}$$

Donde:

R = Es el número de agentes químicos que la cepa presentó resistencia

TAQ = Total de agentes químicos (216)

Por último, para determinar el porcentaje de los agentes químicos sin cambio o modificación estadísticamente significativo, se tomaron en cuenta los 216 agentes químicos como el 100% y se contaron de cada cepa 13G y 20G respectivamente cuantos presentaron resistencia en comparación a la cepa WT.

$$\% \text{ Sin modificación} = \frac{(\text{SM}) * 100}{\text{TAQ}}$$

Donde:

SM = Es el número de agentes químicos que la cepa no presentó modificación

TAQ = Total de agentes químicos (**216**)

5. Resultados

5.1 Síntesis de nanopartículas

Para la obtención de las Pt-ZnO se empleó el método de síntesis hidrotermal y se obtuvieron seis muestras pulverizadas de color blanco, fino, las cuales se identificaron como LZP01-6. Posteriormente se procedió a la caracterización por XRD, SEM, TEM. Finalmente, al confirmar su pureza y morfología se mezclaron en un solo lote identificado como ZnO-Plts.

5.2 Estructura de nanopartículas por DRX

La figura 7 muestra los patrones de difracción de rayos X para la morfología de plateletas de ZnO. Los principales picos de difracción corresponden a la estructura de tipo Wurtzita en fase hexagonal con grupo espacial P63mc (no.186). Esto fue corroborado a través de la indexación de las reflexiones ubicadas en 31.74° , 34.45° , 36.06° , 47.43° , 56.40° , 62.88° , 66.40° , 67.88° , 69.03° , 72.54° , 76.94° las cuales están asociados a los planos que corresponden a los índices de Miller (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004), (202) y estos a su vez corresponden a la tarjeta JCPDS 00-036-1451. Se ha reportado que los planos (002) de NP-ZnO tienen actividad antimicrobiana (Pariona et al., 2020)

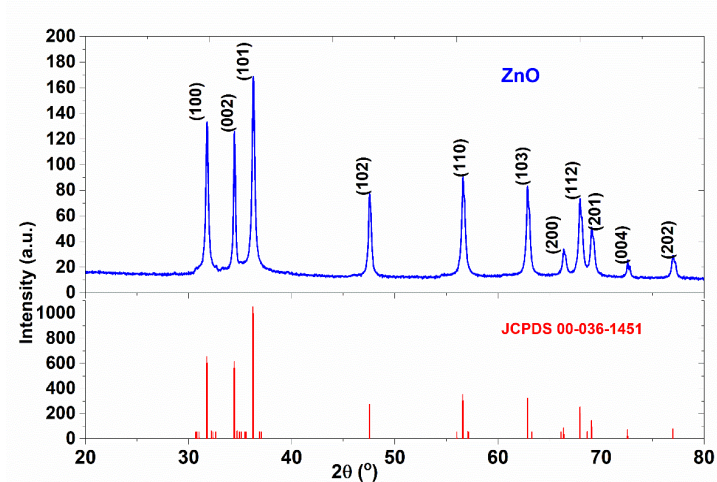


Figura 7. Difracción de rayos X.

Muestra el patrón de difracción de rayos X (DRX). Fue indexado con la tarjeta JCPDS 00-036-1451, la cual está relacionada con una estructura de Wurtzita y su fase hexagonal con grupo espacial P63mc (186).

5.3 Morfología de nanopartículas por MET

En la figura 8 se muestran las micrografías en campo claro obtenidas por la microscopía electrónica de transmisión para elucidar las características morfológicas de las ZnO-NPs y los histogramas de frecuencias. En el panel (A) se observa una micrografía tomada en la escala de 1000 nm la cual muestra a las ZnO-NPs con una aglomeración. En esta imagen se pueden apreciar formas poligonales por el traslape de ZnO-NPs. En el panel (B) una micrografía magnificada con una escala de 500 nm con el fin de apreciar más los detalles de ZnO-NPs. En la micrografía mostrada en el panel (C) se puede apreciar con más detalle la estructura de tipo plateletas. El tamaño medio de partícula es consistente con el análisis XRD obtenido, tienen una longitud de 362 ± 10 nm, una anchura de 253 ± 6 nm y un espesor de 53 ± 1 nm. Estas

dimensiones se han obtenido a través del programa ImageJ y se han enmarcado con una línea de color amarillo. Los paneles (D, E y F) muestran los histogramas de frecuencia de longitud, ancho y espesor respectivamente.

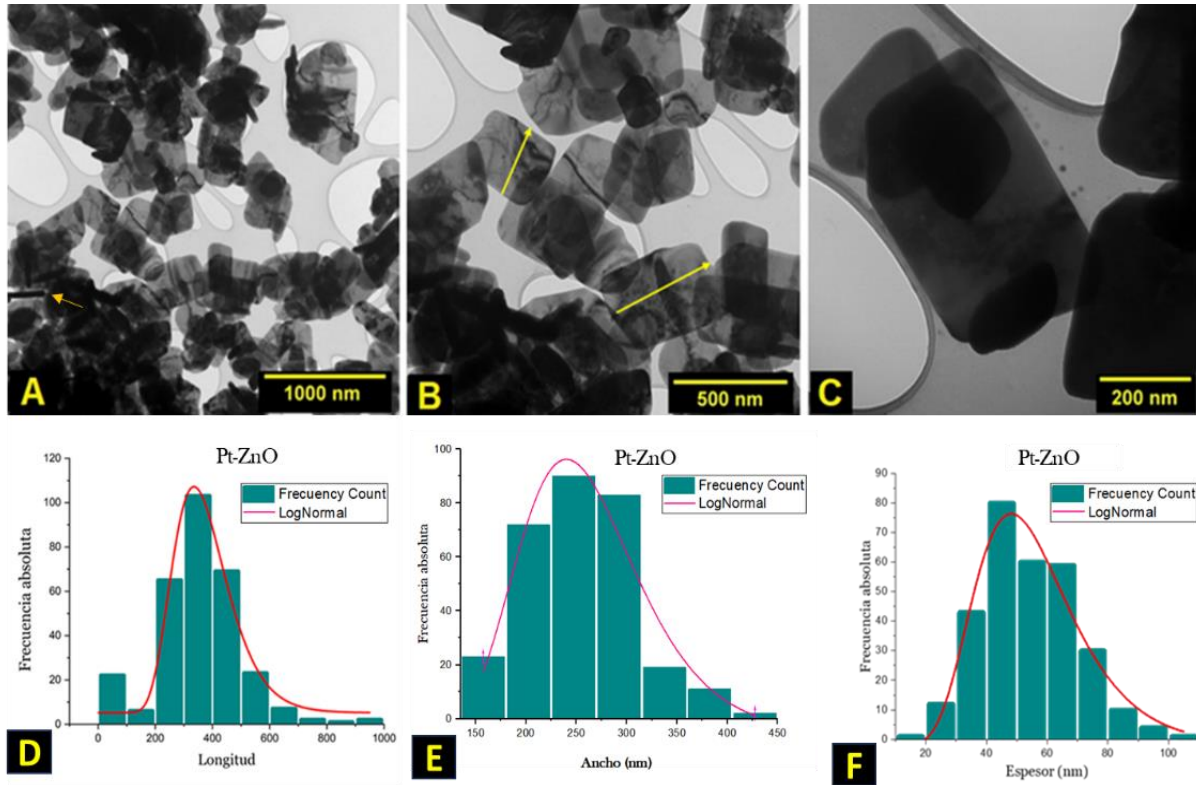


Figura 8. Micrografías de campo claro obtenidas por MET.

Muestra diferentes magnificaciones que muestran la morfología y el tamaño de las plateletas de ZnO, así como, los histogramas de distribución del tamaño de partículas y ajuste log-normal.

5.4 Morfología de nanopartículas por SEM

La micrografía de SEM muestra la influencia del método de síntesis hidrotérmal en la morfología de plateletas de ZnO con una distribución aglomerada.

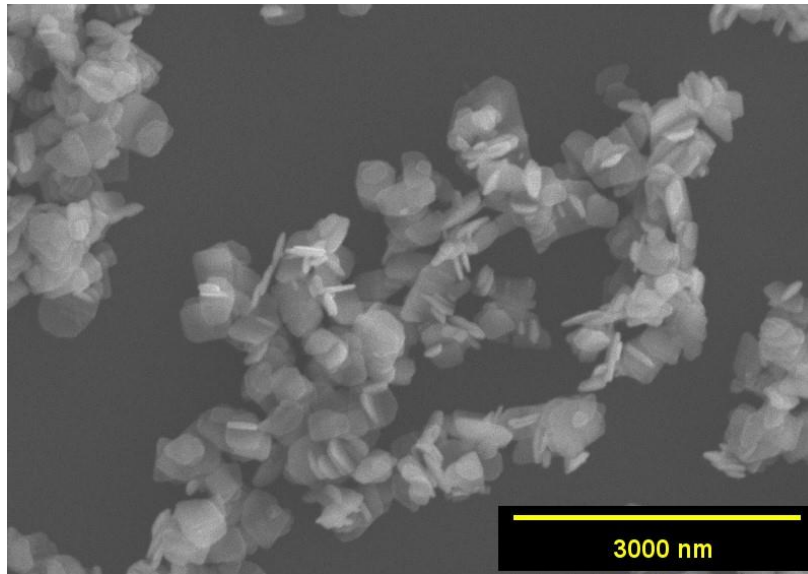


Figura 9. Micrografía electrónica de barrido.

Muestra una morfología heterogénea y aglomerada de plateletas de ZnO.

5.5 Determinación de IC₉₀

La figura 10 ilustra el valor estimado para la determinación de IC₉₀ de *E. amylovora*. En el ajuste de la IC₉₀ de *E. amylovora* se inocularon 4×10^7 UFC/mL y se expusieron a diferentes concentraciones. Las concentraciones que se evaluaron fueron 50, 140 y 200 ppm por triplicado, de Pt-ZnO. A través de un ensayo alamarBlue y un análisis probit se determinó que la concentración inhibitoria de *E. amylovora* en un 90% los resultados indican que las Pt-ZnO tienen la capacidad de inhibir el crecimiento en 90% de *E. amylovora* a concentraciones cercanas a 200 mg L⁻¹ (P < 0.05) fue de 200 ppm. Así mismo, se muestra el porcentaje de mortalidad que se obtuvo en las concentraciones probadas. Con la determinación de la IC₉₀ dió lugar a la presión selectiva de *E. amylovora* a las ZnO-NPs.

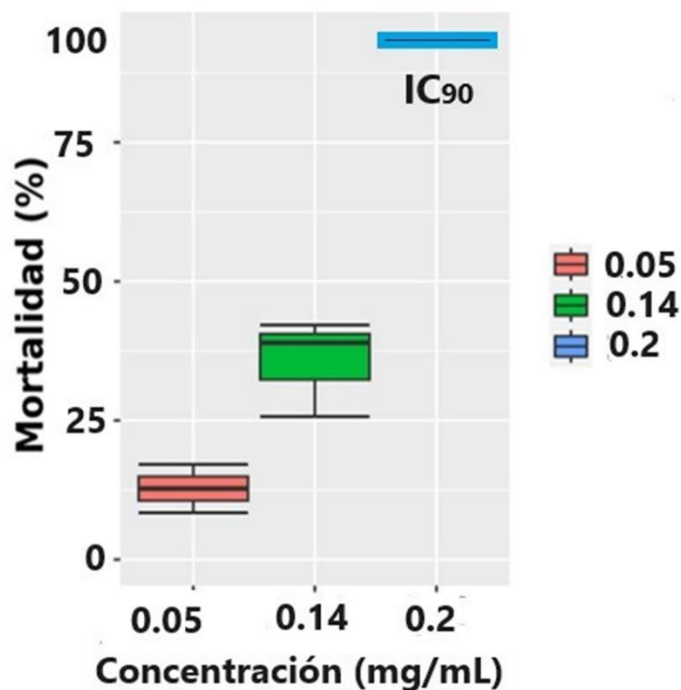


Figura 10. Determinación de IC₉₀ de *E. amylovora*.

Muestra el valor estimado de la IC₉₀ a partir del ensayo alamar blue tras una exposición al ZnO.

5.6 Curvas de Crecimiento de *E. amylovora*

La figura 11 muestra la curva de crecimiento de 12 horas de *E. amylovora* WT, la cual es la cepa control, es decir, sin exposición a nanopartículas. Por otro lado, la cepa *E. amylovora* 13G y *E. amylovora* 20G son cepas que se trataron bajo una exposición repetidamente a ZnO 13 y 20 veces respectivamente. Para obtener una concentración uniforme de las 3 cepas de aproximadamente 8×10^7 UFC/mL a las cero horas, se ajustaron las OD de cada cepa. Para obtener una concentración de 8×10^7 UFC/mL de *E. amylovora* WT se ajustó a una OD de 0.065. Sin embargo, para obtener esa concentración en las cepas 13G y 20G se requirió una OD de 0.100. Una vez ajustadas a las cero horas se procedieron a incubar en agitación constante a 120 rpm a 28°C y se tomaron lecturas de absorbancia cada dos horas, así mismo, se hizo recuento por la técnica de microgota. De acuerdo con la tasa de crecimiento específica (μ) los valores para cada cepa fueron WT 0.252, 13G 0.272 y 20G 0.296. Por lo que *E. amylovora* 13G y 20G presentan similitud con respecto a *E. amylovora* WT, lo cual indica que las cepas expuestas a Pt-ZnO presentan mayor crecimiento y velocidad de duplicación.

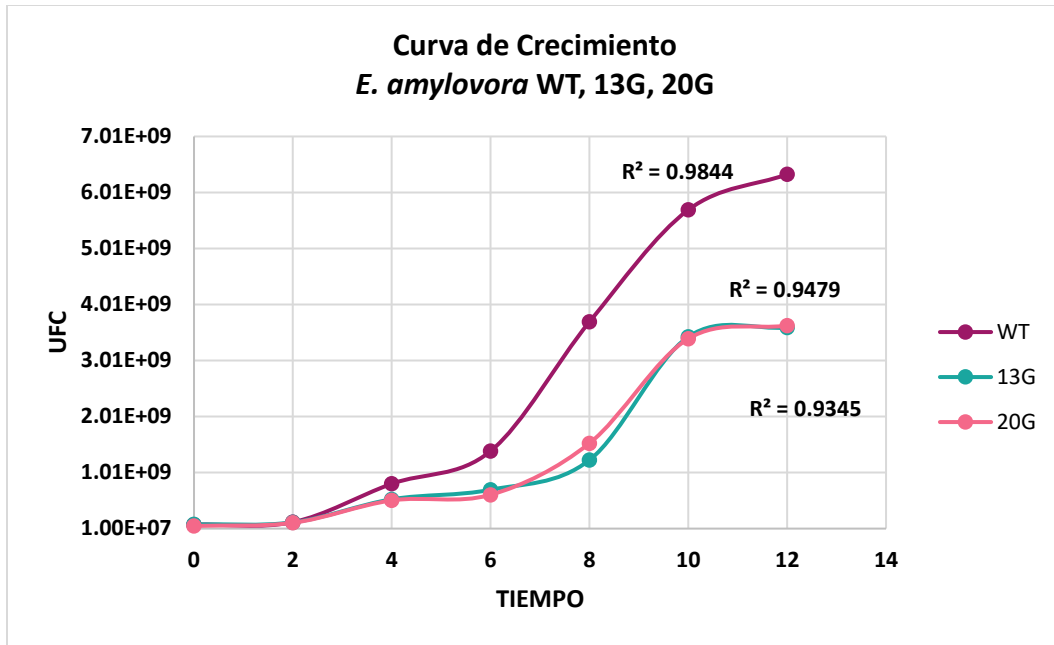


Figura 11. Curvas de crecimiento

Muestra las curvas de crecimiento de *E. amylovora* WT (Control) *E. amylovora* 13G y *E. amylovora* 20G.

5.7 Morfología de *E. amylovora*

La microscopía electrónica de barrido demostró cambios en el tamaño de las células bacterianas expuestas a ZnO-NP. Con base a lo observado en las micrografías que se obtuvieron en la figura 12, de las cepas *E. amylovora* WT, *E. amylovora* 13G y *E. amylovora* 20G se realizaron mediciones del tamaño en longitud y ancho para determinar los cambios morfológicos que la bacteria ha generado tras la presión selectiva con las Pt-ZnO. Como se aprecia en la sección A, las células de *E. amylovora* WT son más pequeñas con una longitud de $1.10 \mu\text{m} \pm 0.03$ y un ancho de $0.41 \mu\text{m}$; mientras que las células expuestas consecutivamente a Pt-ZnO presentan un incremento de tamaño celular y similitud entre ellas. Las células de *E. amylovora* 13G (sección B) presentaron una mayor longitud de $1.83 \pm 0.07 \mu\text{m}$ y un ancho de $0.46 \mu\text{m}$, sin embargo, *E. amylovora* 20G presenta una longitud de $1.73 \mu\text{m} \pm 0.01$ y un ancho de $0.50 \mu\text{m}$, siendo esta célula más robusta.

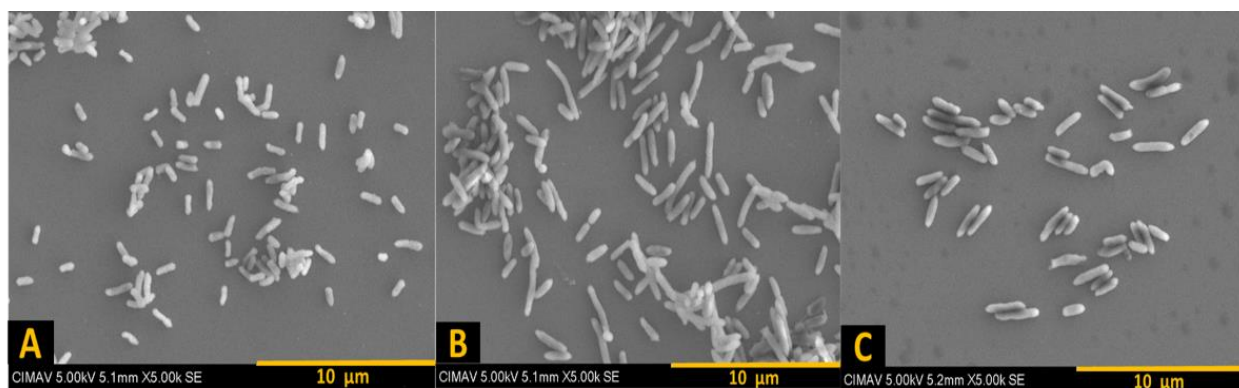


Figura 12. Micrografías de *E. amylovora* obtenidas en microscopía electrónica de barrido

La sección A corresponde a *E. amylovora* WT, la sección B Corresponde a *E. amylovora* 13G y la sección C corresponde a *E. amylovora* 20G.

Para su análisis se realizaron 300 conteos de las células bacterianas de longitud y ancho, generando los siguientes histogramas que se muestran en la figura 13.

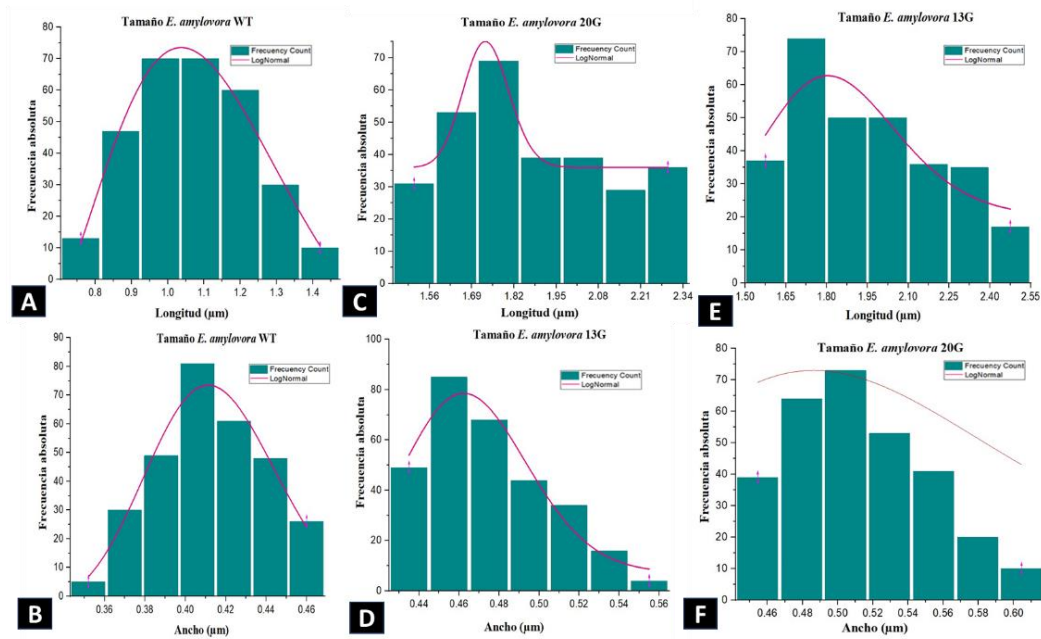


Figura 13. Histogramas de frecuencia de tamaño de *E. amylovora*

La (Sección A y B) muestran los histogramas de la longitud y ancho de *E. amylovora* WT, la (Sección C y D) muestran los histogramas de longitud y ancho *E. amylovora* 13G y la (Sección E y F) muestran los histogramas de longitud y ancho de *E. amylovora* 20G.

5.8 Mecanismo de acción de las Pt-ZnO

Se ha reportado que el mecanismo de acción antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO, está dado por los siguientes mecanismos: disociación y acumulación de iones en la membrana, especies reactivas de oxígeno y daño mecánico. Para dilucidar lo anterior, se realizaron suspensiones bacterianas de 5 mL ($\approx 4 \times 10^7$ UFC/mL) en caldo LB de las cepas de *E. amylovora* WT, *E. amylovora* 13G, *E. amylovora* 20G adicionado 0.2 mg/mL de Pt-ZnO, por triplicado. Así mismo, se colocó un control de una suspensión bacteriana sin adición de plateletas. Las suspensiones bacterianas por triplicado se dividieron en dos grupos de acuerdo con su colocación en la incubación, **con agitación** (CA) y el otro grupo **sin agitación** (SA). A los controles de ingreso (i) de cada cepa se les realizó un recuento por el método de microgota (UFC/mL) para verificar cuanto ingresó de cada cepa, verificando que en todos se inoculó la misma concentración. Ambos grupos se colocaron en las mismas condiciones de temperatura y tiempo 28°C y 24 horas, exceptuando la agitación. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó recuento por microgota de los controles que salieron de incubación (f) y las suspensiones bacterianas con plateletas de óxido de zinc.

Cabe resaltar que el mecanismo de acción de las Pt-ZnO se aprecia en *E. amylovora* WT, debido a que es la cepa susceptible a la concentración de 0.2 mg/mL. WTCA y WTSA corresponden a *E. amylovora* WT. Se observa que en ambas hay inhibición con respecto a la concentración que se inoculó inicialmente en el control (i), sin embargo, en la sección WTCA se aprecia que hay mayor descenso en la concentración (UFC/mL) cuando está en agitación puesto que la agitación promueve la distribución del nanomaterial y un daño mecánico a las células debido a la morfología e interacción de las plateletas, en comparación a cuando no hay agitación WTSA, sin

embargo, estadísticamente no es significativo.

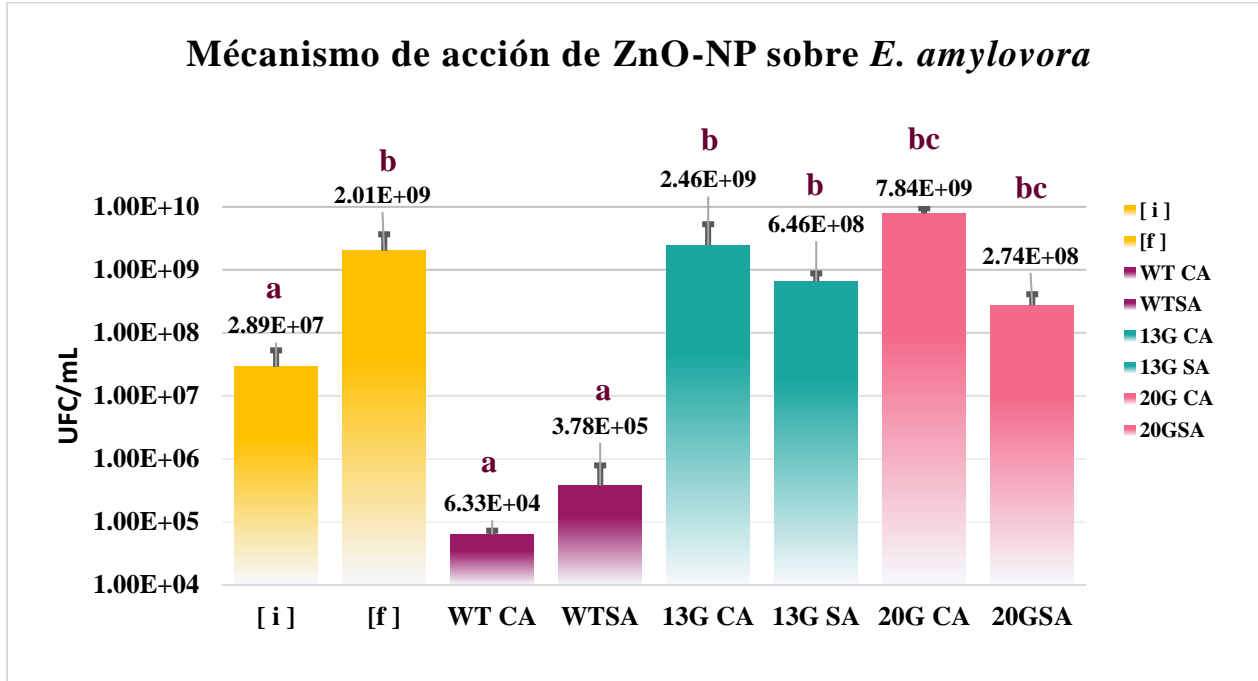


Figura 14. Mecanismo de acción de las ZnO-NP.

Las secciones A1 y A2 corresponden a la cepa *E. amylovora* WT susceptible a Pt-ZnO. Las secciones B1 y B2 corresponden a la cepa *E. amylovora* 13G. Y las secciones C1 y C2 corresponden a la cepa *E. amylovora* 20G.

(i) indica el control de concentración que se inoculó en cada suspensión bacteriana por cada cepa, (f) hace referencia al control de concentración que salió tras 24 horas de incubación. CA corresponde a la condición con agitación y SA corresponde a la condición sin agitación.

Por otro lado, en las cepas *E. amylovora* 13G y *E. amylovora* 20G se puede destacar que ambas cepas en condiciones de agitación y presencia de Pt-ZnO su crecimiento no es estadísticamente significativo en comparación con el control (f), pero si existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa *E. amylovora* WT, esto demuestra la pérdida de sensibilidad

de ambas cepas al ZnO

5.9 Determinación del metabolismo del uso de fuentes de carbono

Para la determinación del metabolismo del uso de fuentes de carbono se utilizaron 3 placas de 96 pozos de placas fenotípicas biológicas EcoPlate. Cada placa contiene 31 fuentes de carbono por triplicado y 3 pocillos asignados a un control negativo (solución salina o agua). Se utilizó una para cada cepa de *E. amylovora* WT, 13G y 20G respectivamente.

La exposición repetida de Pt-ZnO generó una presión selectiva en *E. amylovora* que provocó cambios fenotípicos y metabólicos en cuanto al consumo de fuentes de carbono. Como se observa en la figura 13, *E. amylovora* WT antes de la exposición repetida presentaba mayor consumo por el grupo de los misceláneos, sin embargo, tras la continua exposición se aprecia estadísticamente en *E. amylovora* 13G y 20G un descenso en el consumo de misceláneos con mayor afinidad por el consumo de aminoácidos y ácidos carboxílicos.

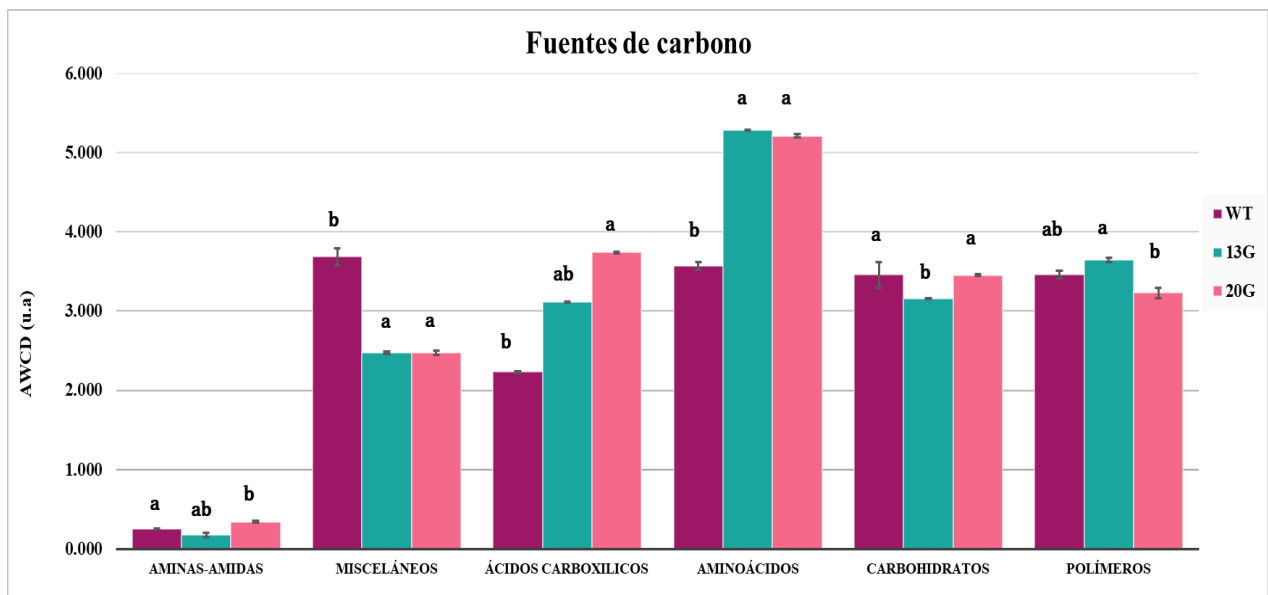


Figura 15. Metabolismo de *E. amylovora* (EcoPlate)

Muestra el consumo de las fuentes de carbono agrupados por grupo funcional, de las cepas *E. amylovora* 13G y 20G en comparación con respecto a *E. amylovora* WT, donde se aprecia el cambio en el uso de fuentes de carbono, se presentó un aumento en el consumo de aminoácidos y la pérdida del consumo de misceláneos por las cepas expuestas a ZnO.

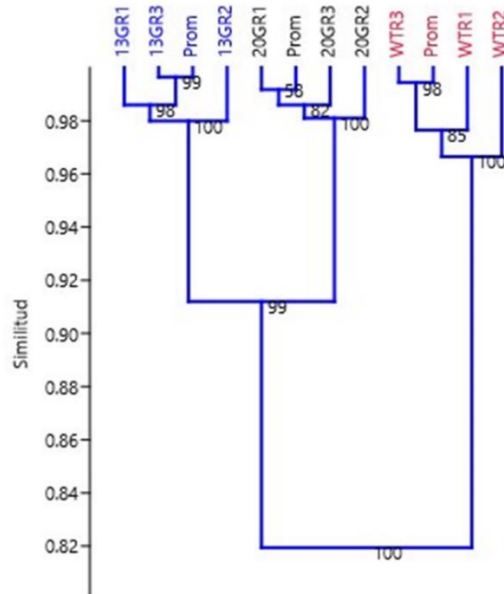


Figura 16. Diagrama de agrupamiento por similitud UPGMA

Muestra los grupos delimitados entre las cepas, se observa que hay mayor similitud entre los grupos expuestos al ZnO con respecto al control.

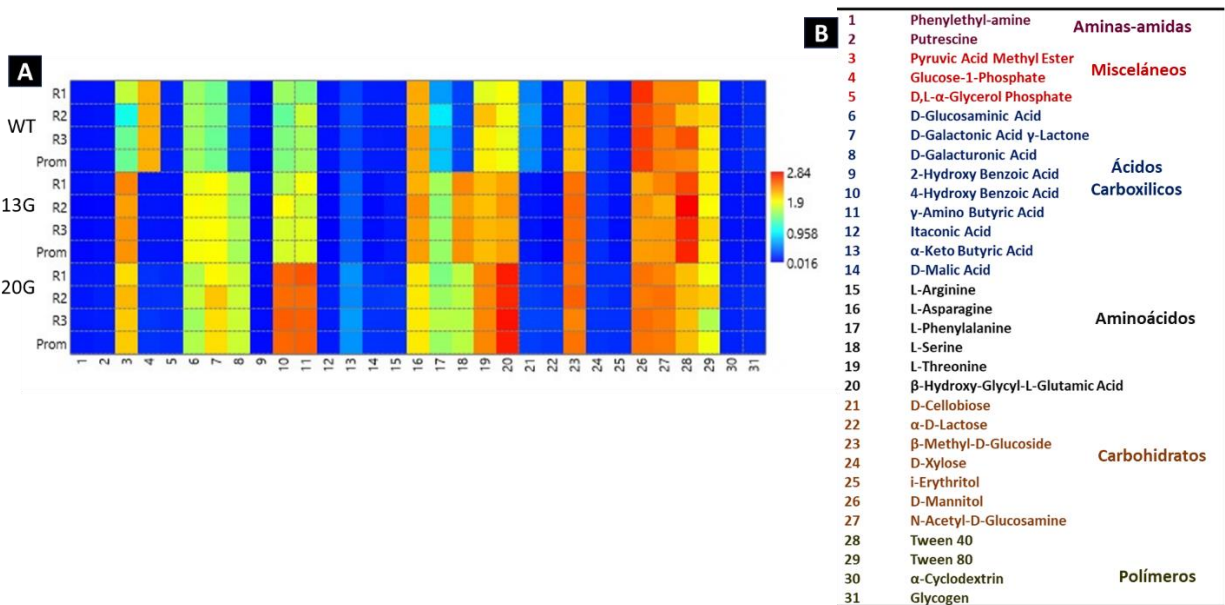


Figura 17. Mapa de calor del consumo de fuentes de carbono

La figura 14 muestra a través de un mapa de calor el aumento y la pérdida del consumo de las diferentes fuentes de carbono de las cepas *E. amylovora* 13G, 20G y WT. Colores cálidos (rojo) indican mayor consumo de las fuentes de carbono y colores fríos (azul) indican menor consumo de las fuentes de carbono (Sección A). por otro lado, se muestra una tabla con las 31 fuentes de carbono (sección B) que se probaron para determinar el metabolismo de las tres cepas, presentes en la placa fenotípica Biolog EcoPlate.

Como se puede apreciar en el mapa de calor el consumo de glucosa 1-fosfato en el grupo de los misceláneos (señalado con el número 4) muestra un color más cálido en *E. amylovora* WT, sin embargo, tras la presión selectiva de esta cepa al ZnO presentó menor consumo por parte de las cepas *E. amylovora* 13G y 20G el cual se aprecia con un cambio en el color, a un tono frío. Sin embargo, caso contrario ocurre con los aminoácidos como la serina, fenilalanina y el β -hidroxiglicil-L-ácido glutámico (señalados con el número 17, 18 y 20 respectivamente), estos

aminoácidos, no eran fuentes de consumo inicialmente de *E. amylovora* WT, sin embargo, las cepas 13G y 20G presentan mayor consumo por estas fuentes de carbono. Del mismo modo, se observa para el ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido aminobutírico (señalados con el número 10 y 11) pertenecientes al grupo de los ácidos carboxílicos, hay un aumento en el consumo por parte de la cepa *E. amylovora* 20G este cambio fue significativo conforme aumentó la exposición al ZnO.

5.10 Determinación de la sensibilidad colateral

Para la determinación de la sensibilidad colateral se probaron 216 agentes químicos distribuidos en 9 placas de microarreglos fenotípicos biología PM (PM 11-19). Se determinó la sensibilidad colateral o aumento en la resistencia a las cepas 13G y 20G fueron comparadas con respecto a la cepa control *E. amylovora* WT (la cual es una cepa que no fue expuesta a ZnO).

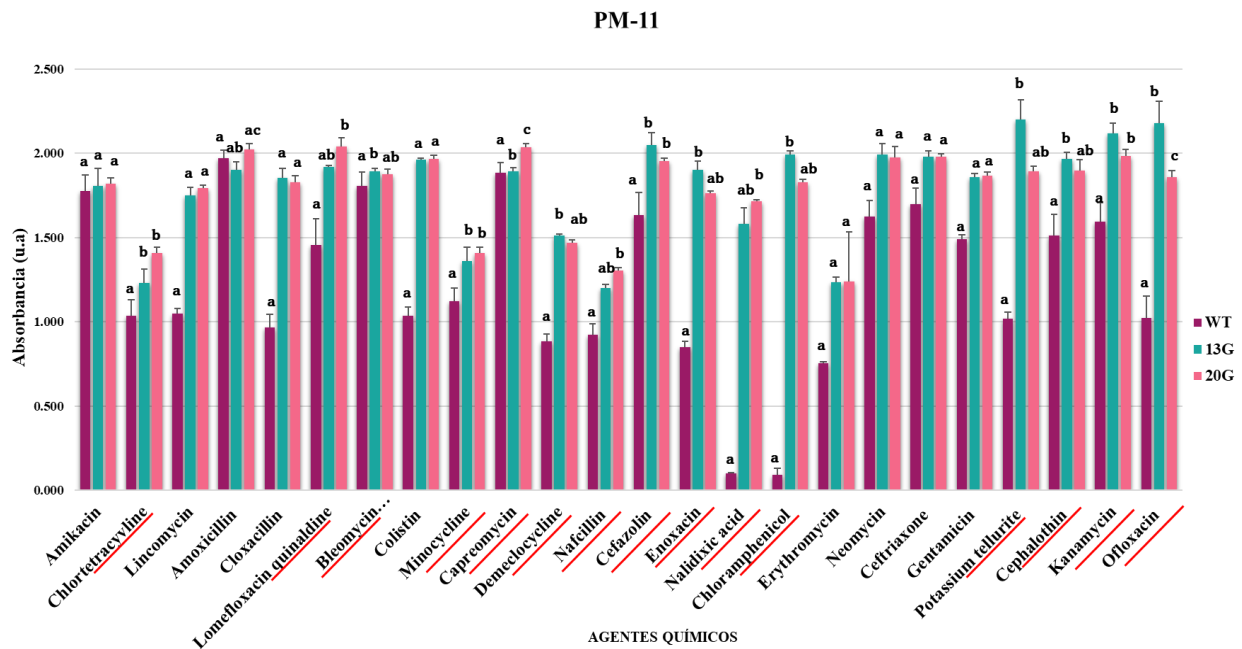


Figura 18. PM 11

Muestra los agentes químicos a los que las cepas *E. amylovora* 13G y/o 20G presentaron un aumento en la resistencia con respecto a la cepa *E. amylovora* WT señalados en color rojo, los cuales fueron: Clortetraciclina, Lomefloxacina, Bleomicina hidoxiquinolona, Minociclina, Capreomicina, Demeclociclina, Nafcilina, Cefazolina, Enoxacina, Ácido nalidíxico, Cloranfenicol, Telurito de potasio, Cefalotina, kanamicina y Ofloxacin.

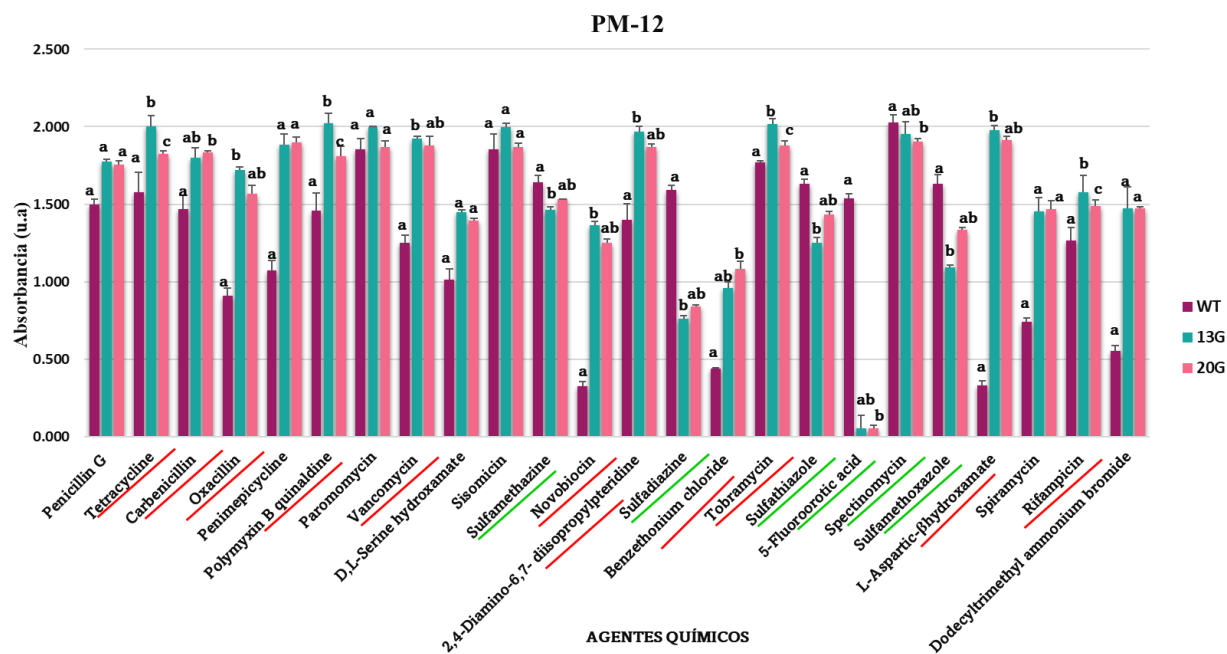


Figura 19. PM 12

Muestra los agentes químicos a los cuales las cepas *E. amylovora* 13G y/o 20G presentan sensibilidad colateral con respecto a la cepa WT señalados en color verde: sulfametazina, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametoxazol y ácido 5-fluoroorótico, espectinomicina, sulfametoxazol. Y en color rojo se indican los agentes químicos que presentaron un aumento en *la resistencia* como: tetraciclina carbenicilina, oxacilina, polymixina B quinaldina, novobiocina, 2,4-diamino-6,7-diisopropil pteridina, cloruro de bencetonio, L-aspartico beta hidroxamato, tobramicina y rifampicina.

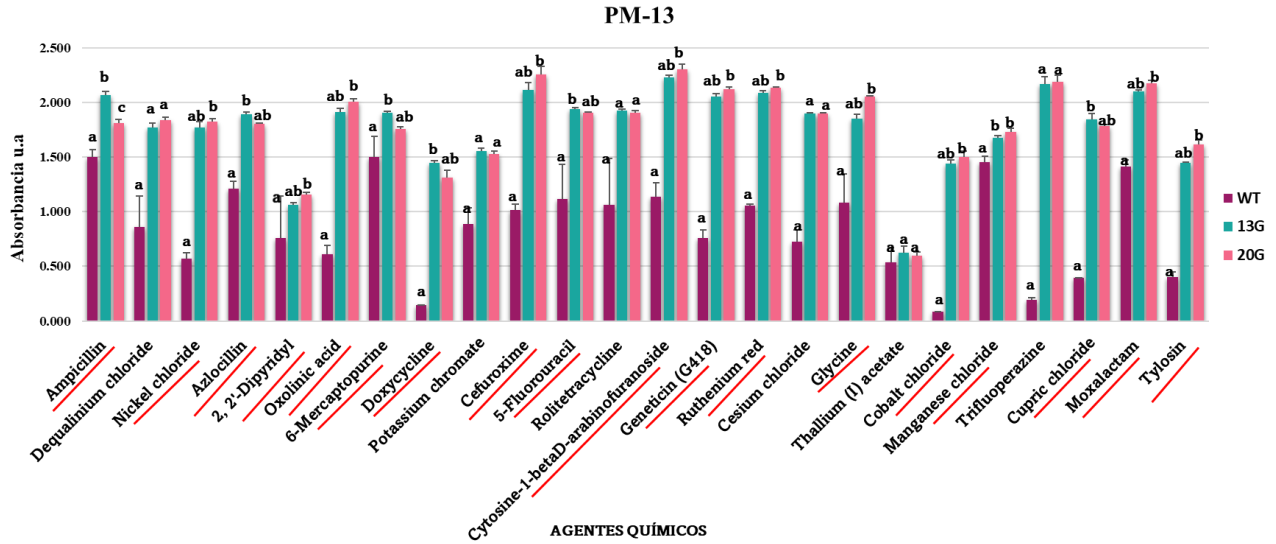


Figura 20. PM 13

Muestra los agentes químicos a los que las cepas *E. amylovora* 13G y/o 20G presentaron resistencia con respecto a la cepa WT señaladas en color rojo: ampicilina, cloruro de níquel, azlocilina, 2,2-dipiridil, ácido oxolínico, 6-mercaptopurina, doxiciclina, cefuroxima, 5-fluorouracil, citosina-1-beta D-arabinofuranosidasa, geneticin (G418), rojo de rutenio, glicina, cloruro de cobalto, cloruro de cobre, moxalactam y tilosina.

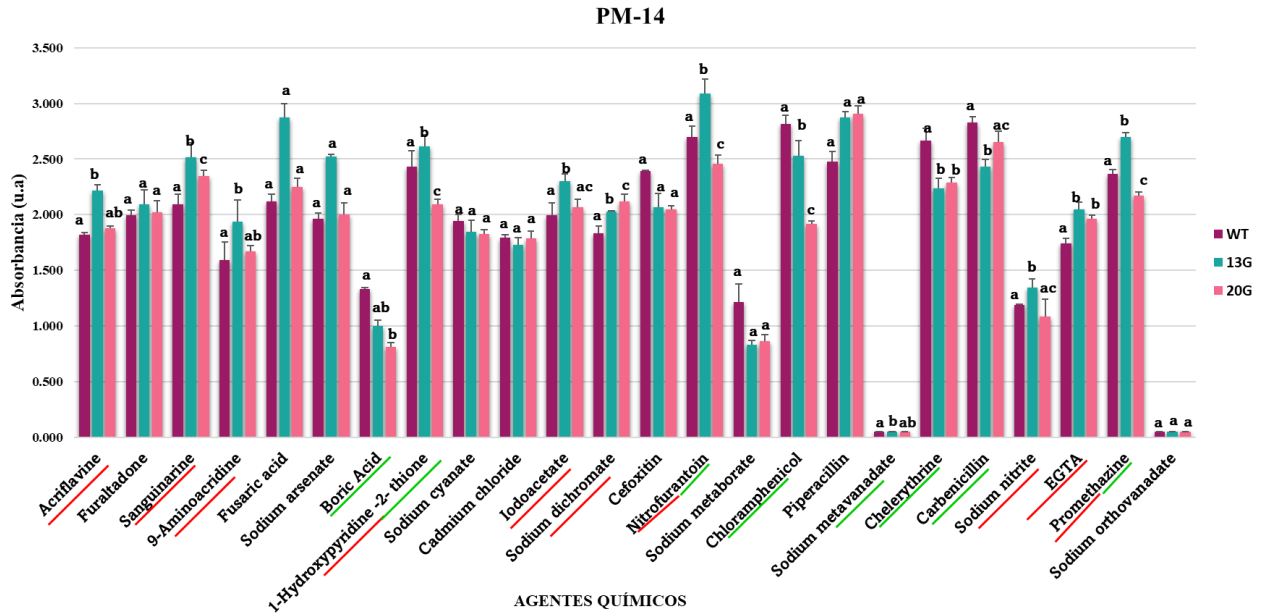


Figura 21. PM14

Muestran los agentes químicos a los cuales las cepas *E. amylovora* 13G y/o 20G presentan aumento en la sensibilidad con respecto a la cepa WT: ácido bórico, 1-hidroxipiridina-2-tiona, nitrofurantóina, cloranfenicol, metavanadato sódico, queleritrina, carbenicilina, prometazina. Así como también muestra los agentes químicos que presentaron pérdida en la sensibilidad: Acraflavina, sanguinarina, 9-aminoacridina, iodo acetato, dicromato de sodio, nitrato de sodio y EGTA.

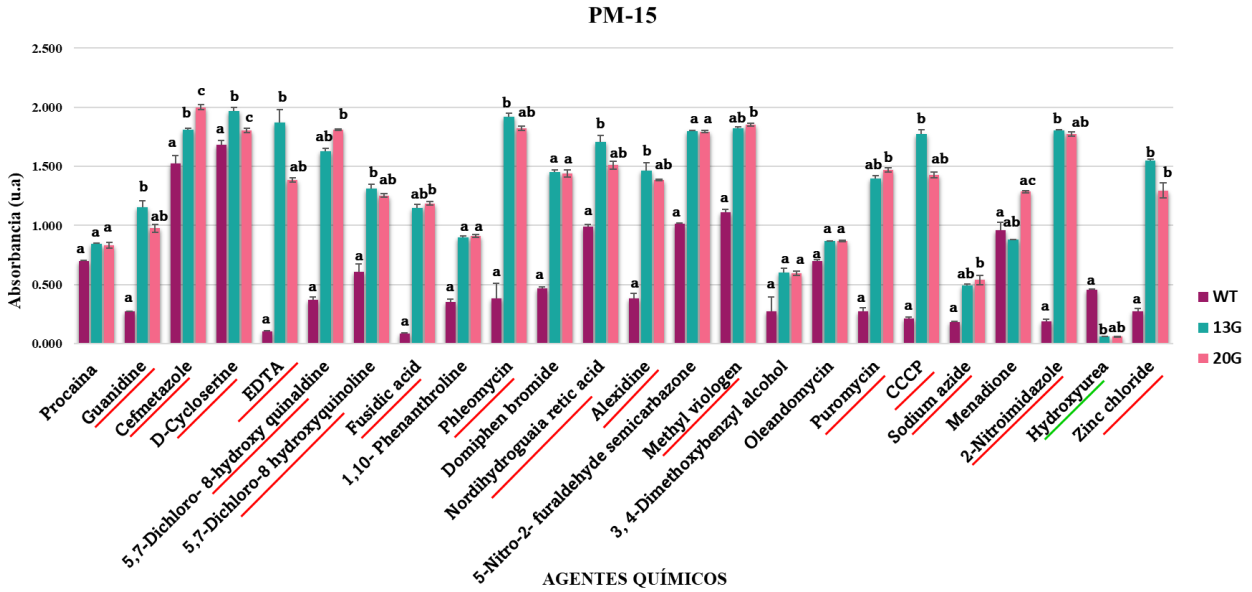


Figura 22. PM 15

Muestran los agentes químicos a los cuales las cepas *E. amylovora* 13G y/o 20G presentaron un aumento en la resistencia con respecto a la cepa WT Guanidina, cefmetazol, cicloserina, EDTA, 5,7-dicloro-8- hidroxiquinaldina, 5,7-dicloro- 8-hidroxiquinolina, ácido fusídico, Fleomicina, ácido nordihidroguaiarético, alexadina, metil viologen, puromicina, CCCP, azida de sodio, 2-Nitroimidazol y cloruro de zinc. Así mismo, las cepas 13G y 20G presentaron sensibilidad colateral a Hidroxiurea.

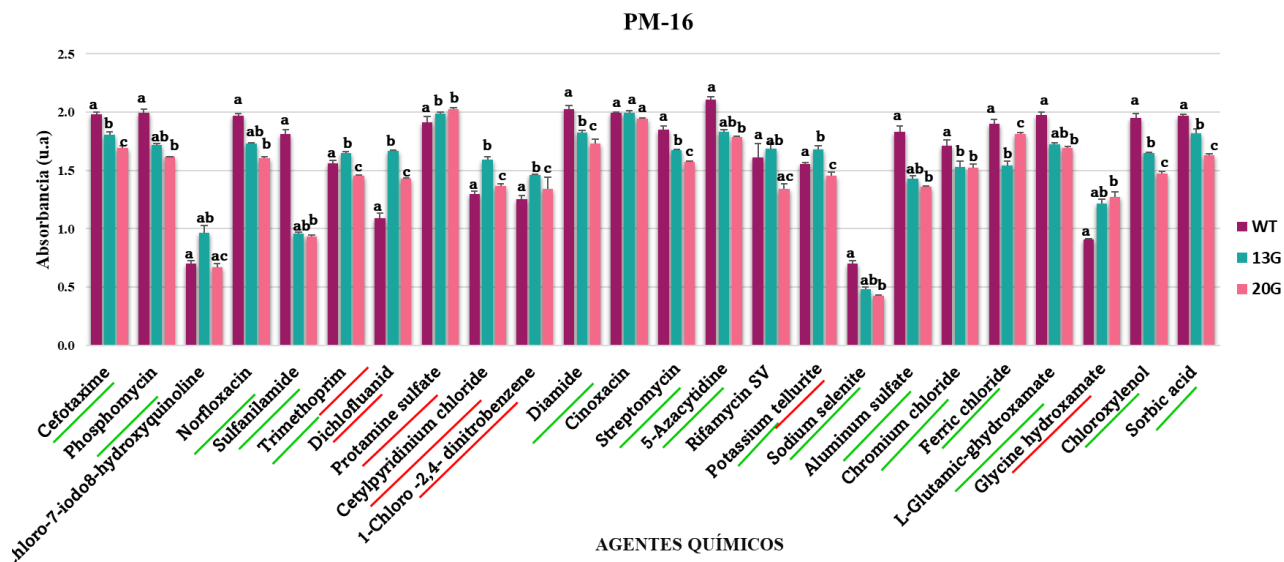


Figura 23. PM16

Muestra los agentes químicos a los que las cepas *E. amylovora* 13G y/o 20G presentaron sensibilidad colateral: cefotaxima, fosfomicina, norfloxacin, sulfanilamida, trimetoprima, diamida, estreptomycin, 5-azacitidina, telurito de potasio, selenito de sodio, sulfato de aluminio, cloruro de cromo, cloruro de hierro, L-glutamato-hidroxi, cloroxileno, ácido sórbico. Así mismo, indica se señalan en color rojo los agentes químicos que presentaron resistencia como: diclofluanida, sulfato de protamina, cloruro de cetilpiridinio, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e hidroxamato de glicina.

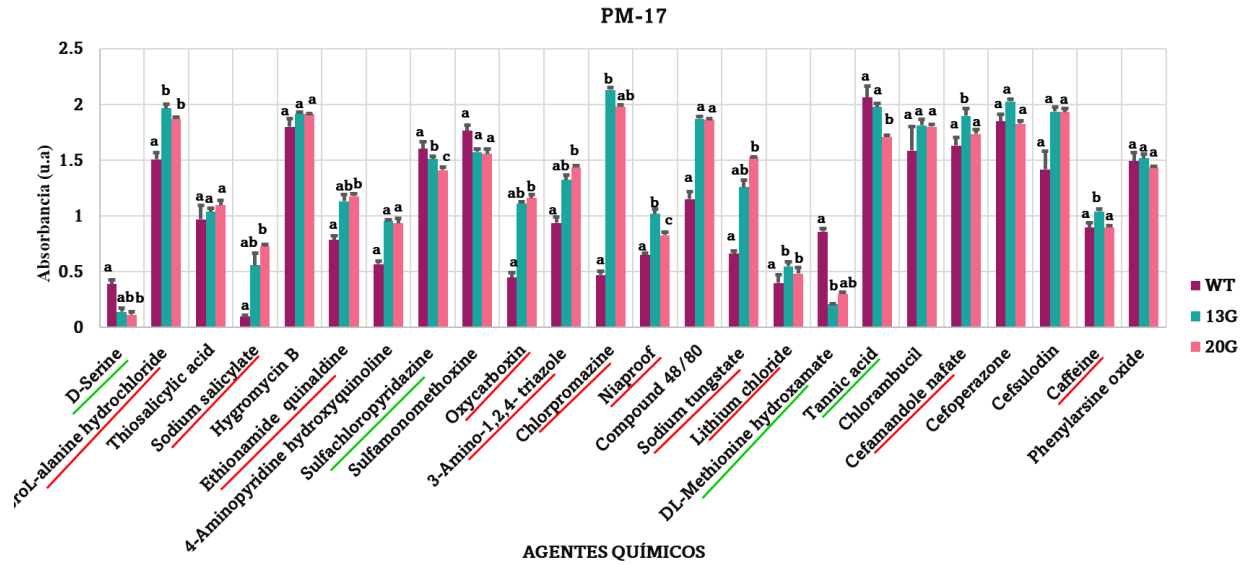


Figura 24. PM 17

Muestra los agentes químicos a los que las cepas *E. amylovora* 13G y/o 20G presentaron sensibilidad colateral: D-serina, sulfachloropiridazina, DL-hidroxamato de metionina y ácido tánico. Sin embargo, presentaron resistencia a clorhidrato de β-cloro-L-alanina, salicilato de sodio, etionamida quinaldine, oxicarboxina, 3-amino-1,2,4-triazol, clorpromazina, niaproof, tungstato sodico, cloruro de litio, cefamandole nafate y cafeína.

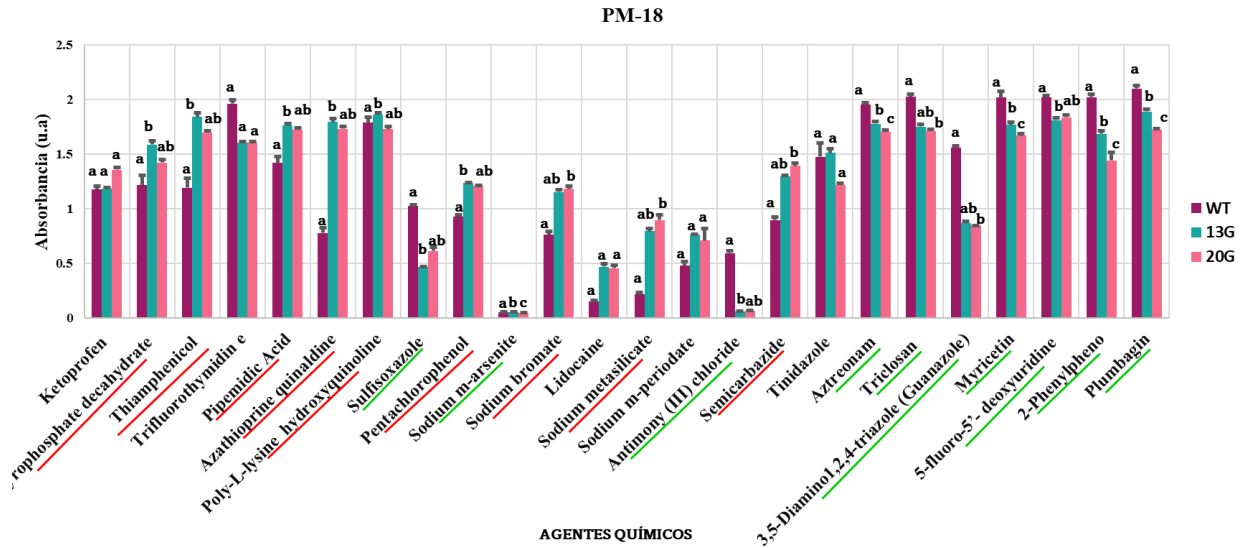


Figura 25. PM 18

Muestra los agentes químicos a los que las cepas *E. amylovora* 13G y/o 20G presentaron sensibilidad colateral: sulfisoxazol, meta arsenito de sodio, tricloruro de antimonio, aztreonam, triclosan, guanazol, miricetina, 5 fluoro-5´deoxyuridine, 2-fenilfeno, plumbagina. Y muestra los agentes químicos los cuales presentaron resistencia: tiamfenicol, ácido pipemídico, azatioprina quinaldina, poli-L-lisina hidroxiquinolina, pentaclorofenol, bromato de sodio, metasilicato de sodio, semicarbazida.

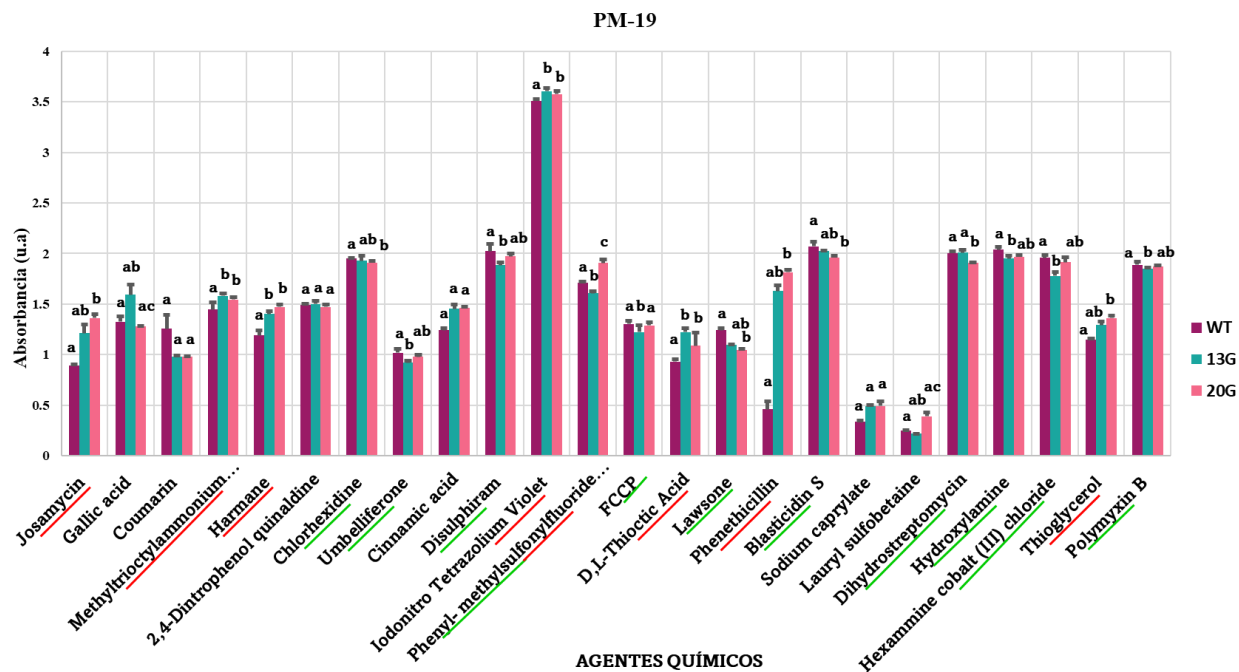


Figura 26. PM 19

Muestra los agentes químicos a los que las cepas *E. amylovora* 13G y/o 20G presentaron sensibilidad colateral señalado en color verde: clorohexadina, umbeliferona, disulfiram, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), FCCP, lawsona, blasticidina S, didroestreptomicima, hidroxilamina, cloruro de hexaaminocobalto polimixina B. Por otro lado, presentaron resistencia a josamicina, cloruro de metiltriocetilamonio, harmano, violeta de idonitrotetrazolio, ácido tióctico, feneticilina y tioglicerol señalado en color rojo.

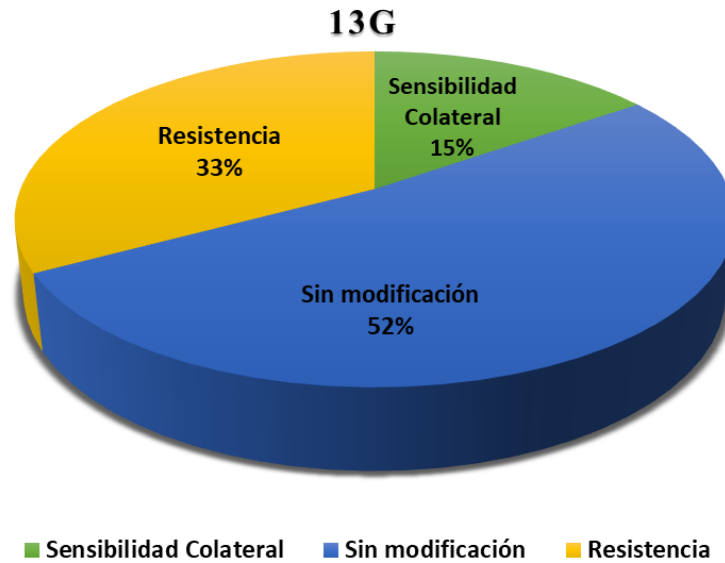


Figura 27. Consolidado de porcentajes de sensibilidad colateral y resistencia de *E. amylovora* 13G

La figura 26 muestra que de los 216 agentes químicos probados en la cepa *E. amylovora* 13G el 15% presentaron sensibilidad colateral, el 33% presentó un aumento en la resistencia y el 52% no presentó cambio.

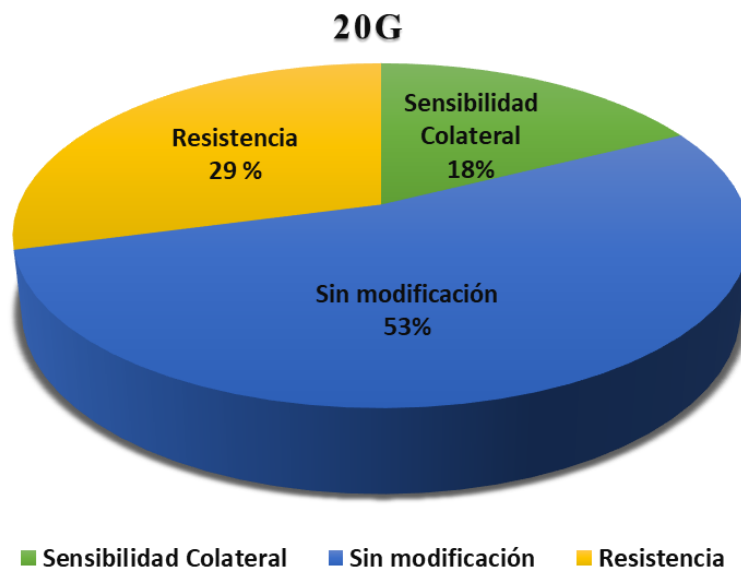


Figura 28. Consolidado de porcentajes de sensibilidad colateral y resistencia de *E. amylovora* 20G

La figura 29 muestra que de los 216 agentes químicos probados en la cepa *E. amylovora* 20G el 18% presentó sensibilidad colateral, el 29% presentó un aumento en la resistencia y el 52% no presentó cambio.

Con estos resultados se puede observar que tras aumentar las generaciones de *E. amylovora* (de la 13G a la 20G) a la presión selectiva de las ZnO-NP hubo un ligero aumento en el porcentaje de los agentes químicos que presentaron sensibilidad colateral y una ligera disminución en el porcentaje de los agentes químicos que presentaron resistencia. Sin embargo, el porcentaje de agentes que no presentaron sensibilidad ni resistencia, es decir, que permanecieron sin modificación continuó siendo el mismo.

Así mismo a continuación en las figuras 28 y 29 se presentan los siguientes diagramas de Venn o diagramas de conjuntos donde muestran el compartimiento y de manera independiente los agentes químicos que presentaron aumento en la resistencia y sensibilidad colateral entre las cepas 13G y 20G.

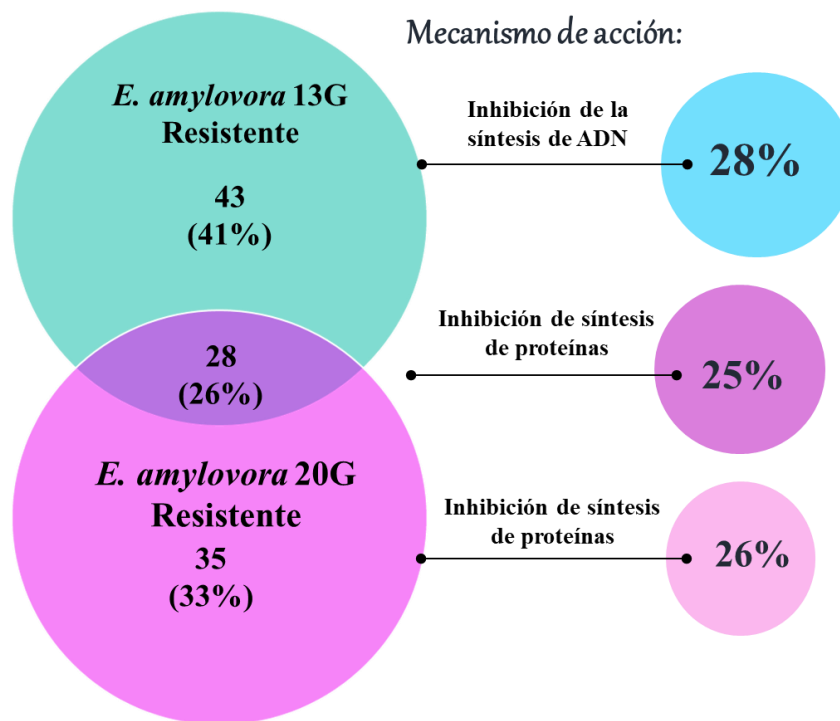


Figura 29. Diagrama de conjuntos de resistencia

Muestra a través de dos conjuntos los elementos independientes y que comparten similitud entre los agentes químicos que presentaron aumento en la resistencia en *E. amylovora* 13G y 20G, así como el mecanismo de acción que mayormente predomina entre estos agentes resistentes.

Como se observa en la figura 30 se muestran dos conjuntos, el primer conjunto correspondiente a la cepa *E. amylovora* 13G (en color azul) indica que 43 elementos (agentes químicos), es decir, el 41% únicamente presentaron resistencia en la cepa 13G y el 28% de estos 43 elementos su mecanismo de acción es el de interferir en la síntesis de ADN. Así mismo, en el segundo conjunto, que corresponde a la cepa *E. amylovora* 20G (en color rosa) indica que 35 elementos correspondiente al 33% únicamente presentaron resistencia en la cepa 20G de forma independiente y el 26% de estos 35 elementos su mecanismo de acción es el de

interferir en la síntesis de proteínas. Así mismo, las cepas *E. amylovora* 13G y 20G comparten similitud en 28 elementos, que presentaron resistencia en ambas cepas correspondientes a un 26% y el mecanismo de acción de estos agentes químicos que comparten actúa en la inhibición de síntesis de proteínas.

Los agentes químicos a los que las cepas *E. amylovora* 13G y 20G presentaron resistencia ostentan un mecanismo de acción predominante, el cual nos da la pauta para determinar que *E. amylovora* tras la presión selectiva a las ZnO-NP desarrolló un mecanismo de resistencia contra los agentes químicos que tienen como blanco de acción inhibir la síntesis de proteínas, por lo tanto, estos agentes químicos no son altamente eficaces para la inhibición de estas cepas.

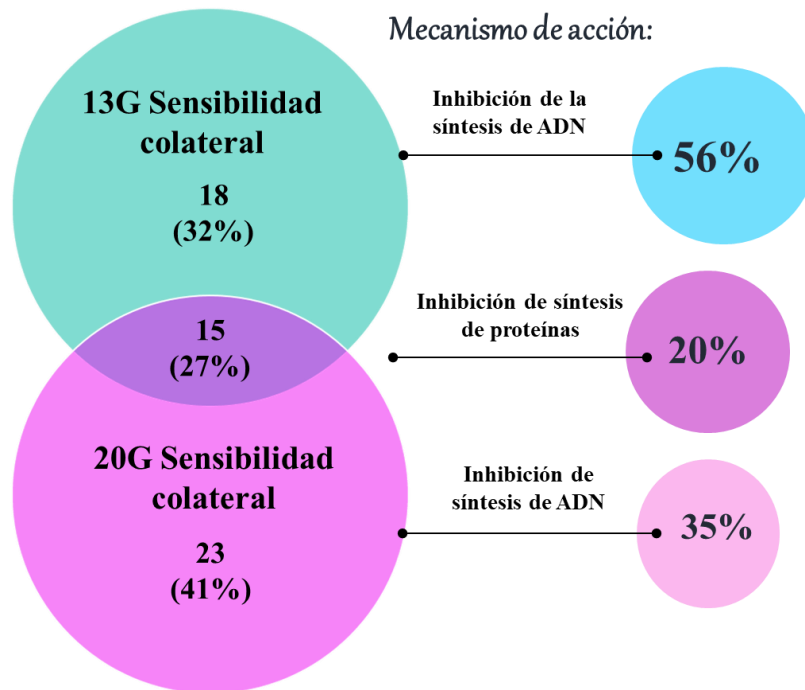


Figura 30. Diagrama de conjuntos de sensibilidad colateral

Muestra a través de dos conjuntos los elementos independientes y que comparten similitud entre los agentes químicos que presentaron sensibilidad colateral en *E. amylovora* 13G y 20G, así

como el mecanismo de acción mayormente predominante entre los agentes que exhiben sensibilidad colateral.

la figura 31 muestra dos conjuntos, el primer conjunto correspondiente a la cepa *E. amylovora* 13G (en color azul) el cual señala que 18 elementos es decir, el 32% únicamente presentaron sensibilidad colateral en la cepa 13G y el 56% de estos 18 elementos su mecanismo de acción es el de inhibir la síntesis de ADN. Así mismo, en el segundo conjunto, que corresponde a la cepa *E. amylovora* 20G (en color rosa) indica que 23 elementos correspondiente al 41% % únicamente presentaron sensibilidad colateral en la cepa 20G y el 35% de estos 23 elementos su mecanismo de acción es el de interferir en la síntesis de ADN. Así mismo, las cepas *E. amylovora* 13G y 20G comparten similitud en 15 elementos, que presentaron sensibilidad colateral en ambas cepas correspondientes a un 27% y el mecanismo de acción de estos agentes químicos que comparten actúa en la inhibición de síntesis de proteínas.

6. Discusión

Los picos de difracción de la muestra sintetizada en la figura 7 coinciden con los planos de reflexiones para una estructura de tipo wurtzita reportado por (Aquino, 2016; Narsin *et al* 2011). La morfología y los tamaños de plateletas de ZnO obtenida en las micrografías de TEM y SEM en las figuras 8 y 9 concuerdan a lo reportado por (Araiza-Campos *et al.*, 2023; Pariona *et al.*, 2020).

Por otro lado, una exposición prolongada en un determinado periodo de tiempo de bacterias a las nanopartículas de óxido de zinc induce significativas alteraciones en la morfología y fisiología bacteriana. Según (Rihacek *et al.*, 2023) reportaron que en células de *E. coli* expuestas repetidamente 40 generaciones a nanopartículas de óxido de zinc presentaron una morfología más gruesa, el promedio del ancho de las células de *E. coli* fue de 568 ± 15 nm, mientras que el ancho de las células del control fue de 451 ± 18 nm, misma característica de mayor grosor se observó tras la exposición de 13 y 20 generaciones de ZnO-NP en *E. amylovora* como se muestra en la figura 12. Además, observaron que tras la exposición la bacteria fue capaz de formar biopelículas. Sin embargo, tras una exposición consecutiva de 20 subcultivos en ausencia de zinc, después de la eliminación del óxido de zinc, el fenotipo bacteriano se revirtió a su estado original, según mencionan las células pierden las características de resistencia adquiridas y así eliminan los costos de aptitud (esta eventualidad puede o no presentarse en todos los casos), sin embargo, en este caso se presentó un restablecimiento y también permanecieron algunos cambios a nivel genómico.

De manera similar, según (Zhang *et al.*, 2018) al evaluar el efecto de la exposición de 25 generaciones de *E. coli* a las nanopartículas de ZnO, observaron que la bacteria podía crecer a altas concentraciones de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de NP-ZnO, sin embargo, cuando las NP-ZnO fueron

retiradas del medio de cultivo presentó una reversión de la sensibilidad antibacteriana cuando las bacterias ya no están expuestas a las NP. Según reportan la adquisición de esta resistencia momentánea es de origen adaptativo y no se debe a cambios genéticos sino a cambios en la morfología de las bacterias (Kumari & Kamat, 2023; Raza et al., 2021). En *Erwinia amylovora* el cambio en la morfología de una célula más pequeña como *E. amylovora* WT a una más alargada y robusta como las cepas *E. amylovora* 13G y 20G respectivamente, se puede atribuir a una resistencia temporal adaptativa y no a cambios genéticos, la morfología de estas cepas expuestas a la presión selectiva de Pts-ZnO pudiera ser reversible al inducir el crecimiento sin el estrés de las ZnO-NP, sin embargo, es una observación que no se ha probado, pero se sugiere evaluar. Según (Mitchell et al., 2023) mencionan que las interacciones de los metales y los microorganismos generan cambios como la disminución del crecimiento, cambios en la morfología e inhibición de procesos bioquímicos tanto en células individuales como a nivel comunitario.

Por otro lado, *E. coli* expuesta continuamente a 0,02 mg/L de nanopartículas de sulfuro de plata (AgNP recubiertas (s-AgNP), durante más de 100 subcultivos, desarrolló cambios fenotípicos y genotípicos que dieron lugar a su tolerancia y resistencia a distintos antibióticos. Estos cambios indujeron una disminución de la sensibilidad de antibióticos como la penicilina, kanamicina, ciprofloxacina y gentamicina. En consecuencia, el estrés oxidativo inició un efecto dominó que afectó la sobreexpresión de genes de porinas de membrana y genes de eflujo de MDR (marA y acrAB-tolC), promoviendo así la evolución patogénica adaptativa (Kumari & Kamat, 2023) (Raza et al., 2021).

Algunos de los mecanismos de resistencia antibacteriana a las nanopartículas involucran la repulsión electrostática, bombas de eflujo, biopelículas y mutaciones. Otro punto importante de

estos mecanismos de resistencia a las nanopartículas es que a menudo van acompañados de una mayor resistencia a los antibióticos.

Como se muestra en los resultados de las figuras 30 y 31 en los diagramas de conjuntos la bacteria *E. amylovora* se compensó en adquirir resistencia a la mayoría de los agentes químicos que actúan bajo el mecanismo de acción en la inhibición de la síntesis de proteínas, pero el costo fisiológico para adquirir esta ventaja adaptativa de resistencia dio origen a la descompensación, en ser susceptible a los agentes químicos con mecanismos de acción en la síntesis de ADN. Al adquirir esta resistencia y esta susceptibilidad tras la presión selectiva generada por las ZnO-NP hace referencia a la presencia de la sensibilidad colateral.

Existe relación entre la exposición a nanomateriales, la resistencia a los metales y la resistencia a los antibióticos y es importante enfocarse a comprender la toxicidad de estos materiales como su capacidad para alterar los organismos que se encuentran bajo exposición de estos (Mitchell et al., 2023). Algunas investigaciones revelan que los microbios desarrollan la capacidad de evolucionar y adaptarse a la toxicidad de los nanomateriales frecuentemente con los mismos mecanismos que utilizan para evadir la toxicidad de los antibióticos (Mitchell et al., 2023).

Los microorganismos utilizan sistemas de eflujo para eliminar los metales de la célula. Estos mecanismos bombean los iones tóxicos por ejemplo el zinc que han entrado hacia el interior de la célula mediante bombas denominadas ATPasa o bombas quimiosmóticas. Concentraciones relativamente bajas de metales pesados son suficientes para inducir resistencia bacteriana a los antibióticos, por otro lado, igual que en el caso de los antibióticos, la exposición prolongada a dosis subletales de nanopartículas de microbios puede contribuir al desarrollo de bacterias resistentes.

Los niveles de iones metálicos se detectan a través de sistemas de proteínas y riboswitches que

regulan la absorción, el almacenamiento o la salida de metales.(Mitchell et al., 2023) La primera barrera de defensa contra la toxicidad de los metales son los componentes citosólicos, como las proteínas que se unen a metales y el glutatión.(Mitchell et al., 2023)

Si el estrés del metal es extremo, se produce una regulación negativa de la maquinaria de importación, comienza la expresión de proteínas secuestradoras de metales adicionales como la ferritina, metalotioneína, proteínas que contienen hemo y un aumento de la salida de metales por ejemplo la división de resistencia-nodulación, salida de ATPasa tipo p, salida de cationes. transportadores de difusión mitigan la toxicidad de los metales (Mitchell et al., 2023).

Las bacterias forman biopelículas y sustancias poliméricas extracelulares como mecanismo de protección externa contra concentraciones de metales tóxicos (Mitchell et al., 2023). Si estos métodos de defensa se ven afectados, la intoxicación por metales compromete la funcionalidad de las proteínas. Los metales poseen alta afinidad por las biomoléculas que contienen el grupo tiol, alteran las enzimas dependientes del grupo hemo y pueden provocar una mala metalización de las proteínas, en consecuencia, inactivan o desnaturalizan enzimas (Mitchell et al., 2023).

Las altas concentraciones de metales pueden incluso afectar el metabolismo y la viabilidad microbiana antes de ingresar a la célula al alterar la cadena de transporte de electrones (Mitchell et al., 2023).

Las bacterias resistentes a los antibióticos requieren readaptar sus procesos metabólicos para mantener su capacidad de sobrevivencia. El adquirir resistencia a los antibióticos es un costo muy alto para la bacteria. Las bacterias modifican su metabolismo para compensar las desventajas que implican mantener la resistencia a los antibióticos (Olivares et al., 2014; Pacheco et al., 2017).

La resistencia al zinc en las bacterias se facilita por eflujo implicadas en el transporte del zinc al exterior de la célula (Rensing et al., 2018). Las bombas de eflujo resistentes a múltiples drogas (MDR) conforman uno de los mecanismos de resistencia más utilizados por las bacterias, gracias a la producción de estas proteínas capaces de expulsar los antimicrobianos al exterior, y así el microorganismo logra sobrevivir a la acción antimicrobiana. Se ha reportado que la sobreexpresión de bombas de eflujo MDR provoca cambios fisiológicos en la bacteria, por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* la sobreexpresión de bombas de eflujo (MexEF-OprN) se atribuye con un proceso al que denominan “recableado metabólico” que involucra una mayor expresión de la cadena respiratoria del nitrato (Olivares et al., 2014; Pacheco et al., 2017).

Según (Pacheco et al., 2017) la bacteria incrementa su respiración aerobia y anaerobia de este modo la bacteria reajusta sus procesos metabólicos para compensar las desventajas que conlleva adquirir resistencia a los antibióticos. Así mismo, proponen un mecanismo de compensación que consiste en reajustar el metabolismo microbiano. Se ha descrito que las bacterias resistentes a los antibióticos requieren readaptar sus procesos metabólicos para mantener su capacidad de sobrevivencia. El adquirir resistencia a los antibióticos es un costo muy alto para la bacteria. Las bacterias modifican su metabolismo para compensar las desventajas que implican mantener la resistencia a los antibióticos (Olivares et al., 2014; Pacheco et al., 2017).

7. Conclusión

La presión selectiva de ZnO-NP generó sensibilidad colateral y un aumento en la resistencia a los agentes antimicrobianos en *E. amylovora*.

Tras la presión selectiva la cepa 20G se compensa en adquirir resistencia a través del mecanismo de acción de síntesis de proteínas y la cepa 13G se compensa a través del mecanismo de síntesis de ADN, sin embargo, las cepas 13G y 20 ambas presentan sensibilidad colateral a los agentes antimicrobianos con mecanismo de acción de síntesis de ADN.

La presión selectiva a ZnO-NP generó una presión selectiva en *E. amylovora* que provocó cambios fenotípicos y genotípicos probablemente con el fin de generar una adaptación de la bacteria hacia materiales tóxicos. Entre esas adaptaciones se encuentra el aumento de tamaño celular, mayor diversidad en el uso fuentes de carbono especialmente por aminoácidos, e incremento y reducción en la susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos. Por otro lado, es importante resaltar que *E. amylovora* presentó sensibilidad colateral a estreptomicina y disminución de la sensibilidad a cloruro de zinc.

Las ZnO-NP pueden servir como agente antimicrobiano para *E. amylovora*, pero su uso repetitivo debe ser supervisado y controlado para evitar generar resistencia hacia antimicrobianos. El uso adecuado de ZnO-NP para el control de *E. amylovora* es viable, sin embargo, es necesario generar planes de manejo o rotación de antimicrobianos o agentes químicos a fin de evitar la resistencia antimicrobiana de este fitopatógeno a mediano y corto plazo a ZnO-NP o nano pesticidas comerciales que contenga este tipo de elemento.

8. Recomendaciones

Se recomienda realizar el análisis de transcriptoma y del genoma de las cepas 13G y 20G.

Y también se recomienda realizar cultivos consecutivos *de E. amylovora* 13G y 20G sin exposición al ZnO-NP con la finalidad de revertir los efectos del zinc evaluando características fenotípicas y de susceptibilidad.

9. Bibliografía

- Aquino, G. P. A. (2016). *UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA*.
- Araiza-Campos, A., Herrera-Pérez, G., Salas-Leiva, J. S., Chávez-Beltrán de Río, M., Aguirre-Hernández, A., Luna-Velasco, A., Salas-Leiva, D., Campos-Chávez, E., Tovar-Ramírez, D., Romo-Chacón, A., Orrantia-Borunda, E., & Paraguay-Delgado, F. (2023). Quasi-Diamond Platelet-Shaped Zinc Oxide Nanostructures Display Enhanced Antibacterial Activity. *ChemBioChem*. <https://doi.org/10.1002/cbic.202300542>
- Ardell, S. M., & Kryazhimskiy, S. (2021). The population genetics of collateral resistance and sensitivity. *ELife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/eLife.73250>
- Barbosa, C., Roemhild, R., Rosenstiel, P., & Schulenburg, H. (2019). Evolutionary stability of collateral sensitivity to antibiotics in the model pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.51481>
- Camacho, S. L. A. (2023). *Resistencia Bacteriana una crisis actual*.
- Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *23*. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Chillo, H. J. P. (2019). *Evaluación de defoliantes químicos en el cultivo de manzana (malus domestica Borkh.) cv. Anna en la granja El Romeral*.
- Cuenca, D. (2021). *Nanopartículas Antimicrobianas en Odontología: Estado del arte*.
- Dagher, F., Olishvskaya, S., Philion, V., Zheng, J., & Déziel, E. (2020). Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *Heliyon*, *6*(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05222>
- de León Door, A. P., Romo Chacón, A., & Acosta Muñoz, C. (2013). Detection of streptomycin resistance in *Erwinia amylovora* strains isolated from apple orchards in Chihuahua, Mexico. *European Journal of Plant Pathology*, *137*(2), 223–229. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0241-4>
- De los Santos, J. L., & Picazzo, H. N. (2016). *Propiedades antimicrobianas de Nanopartículas de ZnO para aplicaciones antisépticas*.
- Díaz, L. E. O. (2016). *Determinación de los flujos de vapor de agua (H₂O) y bióxido de carbono (CO₂) de una huerta de Manzano (Malus domestica Borkh) en la sierra de Arteaga, Coahuila*.
- Dolz, Z. P. (2008). *Evaluación de la calidad de fruto en manzano: estudio de métodos no destructivos de análisis*.
- Donat, L. M. V. (2004). Caracterización fenotípica y genotípica de aislados españoles de *Erwinia amylovora*. *Doctor*.
- Doolotkeldieva, T., Bobushova, S., Carnal, S., & Rezzonico, F. (2021). Genetic characterization of *Erwinia amylovora* isolates detected in the wild walnut-fruit forest of South Kyrgyzstan. *Journal of Plant Pathology*, *103*, 109–120. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00752-1>
- Dunkley, E. J., Chalmers, J. D., Cho, S., Finn, T. J., & Patrick, W. M. (2019a). Assessment of Phenotype Microarray plates for rapid and high-throughput analysis of collateral sensitivity networks. *PLoS ONE*, *14*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219879>
- Dunkley, E. J., Chalmers, J. D., Cho, S., Finn, T. J., & Patrick, W. M. (2019b). Assessment of Phenotype Microarray plates for rapid and high-throughput analysis of collateral sensitivity networks. *PLoS ONE*, *14*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219879>
- Feng, R., Wang, H., Liu, T., Wang, F., Cai, L., Chen, X., & Zhang, S. (2023). Response of

- microbial communities in the phyllosphere ecosystem of tobacco exposed to the broad-spectrum copper hydroxide. *Frontiers in Microbiology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1229294>
- FIPRODEFO. (2020). *Tizón de fuego bacteriano (Erwinia amylovora)*.
- García, P. J., Aviña, M. G. N., De los Santos, V. S., García, M. A. M., Alejandre, I. D., & Rubio, R. B. (2020). *Biological Control of Erwinia Amylovora in Apple Trees Employing Antibacterial Biological Control of Erwinia Amylovora in Apple Trees Employing Antibacterial Agents*. November.
- Gill, J. J., Svircev, A. M., Smith, R., & Castle, A. J. (2003). Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2133–2138.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2133-2138.2003>
- Herencias, C., Rodríguez-Beltrán, J., León-Sampedro, R., Del Valle, A. A., Palkovičová, J., Cantón, R., & Millán, Á. S. (2021). Collateral sensitivity associated with antibiotic resistance plasmids. *ELife*, 10, 1–13. <https://doi.org/10.7554/eLife.65130>
- Hernando-Amado, S., Laborda, P., & Martínez, J. L. (2023). Tackling antibiotic resistance by inducing transient and robust collateral sensitivity. *Nature Communications*, 14(1), 1723.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-37357-4>
- Hernando-Amado, S., Laborda, P., Ram on Valverde, J., Luis Mart inez, J., & Member Bruce Levin, B. R. (2022). *Mutational background influences P. aeruginosa ciprofloxacin resistance evolution but preserves collateral sensitivity robustness*.
<https://doi.org/10.1073/pnas>
- Holguín, H., Amariles, P., & Ospina, W. (2017). *Interacciones evolutivas como un posible mecanismo de interacción medicamentosa: una aproximación para el control de la resistencia bacteriana*. www.sochinf.cl
- Jałowiecki, Ł., Chojniak, J., Dorgeloh, E., Hegedusova, B., Ejhed, H., Magnér, J., & Płaza, G. (2017). Using phenotype microarrays in the assessment of the antibiotic susceptibility profile of bacteria isolated from wastewater in on-site treatment facilities. *Folia Microbiologica*, 62(6), 453–461. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0516-9>
- Kumari, M., & Kamat, S. (2023). *Emergence of microbial resistance against nanoparticles: Mechanisms and strategies*. <https://www.who.int/news/item/-----sustaining-action-against-antimicrobial-resistance-a>
- Mann, A., Nehra, K., Rana, J. S., & Dahiya, T. (2021). Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. In *Current Research in Microbial Sciences* (Vol. 2). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100030>
- Marques, G. N., Moreira, A. J., Nóbrega, E. T. D., Braga, S., Argentin, M. N., da Cunha Camargo, I. L. B., Azevedo, E., Pereira, E. C., Bernardi, M. I. B., & Mascaro, L. H. (2024). Selective inhibitory activity of multidrug-resistant bacteria by zinc oxide nanoparticles. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12(1).
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111870>
- Martínez-Alcalá, I., Soto, J., & Lahora, A. (2020). Antibiotics as emerging pollutants. Ecotoxicological risk and control in wastewater and reclaimed water. *Ecosistemas*, 29(3).
<https://doi.org/10.7818/ECOS.2070>
- Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2021). Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 37, Issue 6). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03070-x>
- Mesa, D. Y. M. (2021). *Nanopartículas de plata para el control de bacterias fitopatógenas*.
- Mitchell, S. L., Hudson-Smith, N. V., Sharan, D., Haynes, C. L., & Carlson, E. E. (2023). Modern materials provoke ancient behavior: bacterial resistance to metal nanomaterials. In *Environmental Science: Nano*. Royal Society of Chemistry.

- <https://doi.org/10.1039/d3en00420a>
- Moreno, C., González E, R., & Beltrán, C. (2009). *Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios* Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens.
- Nagy, J. K., Király, L., & Schwarczinger, I. (2012). Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Central European Journal of Biology*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0093-x>
- Olivares, J., Álvarez-Ortega, C., & Martínez, J. L. (2014). Metabolic compensation of fitness costs associated with overexpression of the multidrug efflux pump MexEF-OprN in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3904–3913. <https://doi.org/10.1128/AAC.00121-14>
- Pacheco, J. O., Alvarez-Ortega, C., Rico, M. A., & Luis Martínez, J. (2017). *Metabolic Compensation of Fitness Costs Is a General Outcome for Antibiotic-Resistant Pseudomonas aeruginosa Mutants Overexpressing Efflux Pumps*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.009>
- Pál, C., Papp, B., & Lázár, V. (2015). Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. In *Trends in Microbiology* (Vol. 23, Issue 7, pp. 401–407). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.009>
- Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., Dyčka, F., Šebela, M., Pucek, R., Tomanec, O., & Zbořil, R. (2018). Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology*, 13(1), 65–71. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>
- Pariona, N., Paraguay-Delgado, F., Basurto-Cereceda, S., Morales-Mendoza, J. E., Hermida-Montero, L. A., & Mtz-Enriquez, A. I. (2020). Shape-dependent antifungal activity of ZnO particles against phytopathogenic fungi. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 10(2), 435–443. <https://doi.org/10.1007/s13204-019-01127-w>
- Patiño, C. D. (2023). Porqué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos. *Red de Revistas de América Latina, España y Portugal*, 48–56.
- Piqué, N., Miñana-Galbis, D., Merino, S., & Tomás, J. M. (2015). Virulence factors of *Erwinia amylovora*: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12836–12854. <https://doi.org/10.3390/ijms160612836>
- Raza, S., Matuła, K., Karoń, S., & Paczesny, J. (2021). Resistance and adaptation of bacteria to non-antibiotic antibacterial agents: Physical stressors, nanoparticles, and bacteriophages. In *Antibiotics* (Vol. 10, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040435>
- Razo, S. C., Safenkova, I. V., Drenova, N. V., Kharchenko, A. A., Tsymbal, Y. S., Varitsev, Y. A., Zherdev, A. V., Pakina, E. N., & Dzantiev, B. B. (2021). New lateral flow immunoassay for on-site detection of *Erwinia amylovora* and its application on various organs of infected plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101637>
- Rensing, C., Moodley, A., Cavaco, L. M., & Mcdevitt, S. F. (2018). *Resistance to Metals Used in Agricultural Production*. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA>
- Rihacek, M., Kosaristanova, L., Fialova, T., Kuthanova, M., Eichmeier, A., Hakalova, E., Cerny, M., Berka, M., Palkovicova, J., Dolejska, M., Svec, P., Adam, V., Zurek, L., & Cihalova, K. (2023). Zinc effects on bacteria: insights from *Escherichia coli* by multi-omics approach. *MSystems*. <https://doi.org/10.1128/msystems.00733-23>
- Rivas, R. L. K., & Torres, P. I. (2021). *Nanopartículas: nuevas aliadas de la agricultura*. 19–27.
- Romo, C. A., Berlanga, R. D. I., Guerrero, P. V. M., & Martínez, C. R. (2011). Manejo de *Erwinia amylovora* con aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) y estudio de resistencia a estreptomocina en arboles de manzano cv. “Golden Delicious.” *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29, 119–132.
- Romo Chacón, A., Berlanga Reyes, D. I., Guerrero Prieto, V. M., Martínez Campos, R.,

- Romero Gómez, S., & Ramírez Legarreta, M. R. (2011). Management of *Erwinia amylovora* with oregano (*Lippia berlandieri*) essential oil and resistance study to streptomycin on apple trees cv. "Golden Delicious". *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(2), 119–132.
http://www.sociedadmexicanadefitopatologia.org/archives/rmf_29_2_art_4.pdf
- Salas Orozco, M. F., Niño-Martínez, N., Martínez-Castañón, G. A., Méndez, F. T., & Ruiz, F. (2019). Molecular mechanisms of bacterial resistance to metal and metal oxide nanoparticles. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20112808>
- Santander, R. D., & Biosca, E. G. (2017). *Erwinia amylovora* psychrotrophic adaptations: Evidence of pathogenic potential and survival at temperate and low environmental temperatures. *PeerJ*, 2017(10). <https://doi.org/10.7717/peerj.3931>
- Santos-Lopez, A., Marshall, C. W., Haas, A. L., Turner, C., Rasero, J., & Cooper, V. S. (2021). The roles of history, chance, and natural selection in the evolution of antibiotic resistance. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.70676>
- Shea, A., Wolcott Mark, D., Daeffler, S., & Rozak, D. A. (2012). *Biolog phenotype Microarrays Chapter 12*. <http://www.springer.com/series/7651>
- Suzuki, S., Horinouchi, T., & Furusawa, C. (2016). Phenotypic changes associated with the fitness cost in antibiotic resistant *Escherichia coli* strains. *Molecular BioSystems*, 12(2), 414–420. <https://doi.org/10.1039/c5mb00590f>
- Svircev, A., Roach, D., & Castle, A. (2018). Framing the future with bacteriophages in agriculture. In *Viruses* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v10050218>
- Toranzo, J. O. (2016). *Producción mundial de manzanas y peras Programa Nacional Frutales*. www.inta.gob.ar/altovalle
- Troncoso, C., Mónica Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., & Barrientos, L. (2017). Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica Structural and Physiological Implications of Bacterial Cell in Antibiotic Resistance Mechanisms. In *Int. J. Morphol* (Vol. 35, Issue 4).
- Udekwi, K. I., & Weiss, H. (2018). Pharmacodynamic considerations of collateral sensitivity in design of antibiotic treatment regimen. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 2249–2257. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S164316>
- UNAM. (2019). *Cómo las bacterias casi muertas por los antibióticos pueden recuperarse y ganar resistencia | UNAM Global*. <https://unamglobal.unam.mx/como-las-bacterias-casi-muertas-por-los-antibioticos-pueden-recuperarse-y-ganar-resistencia/>
- Vázquez, O. A. R., Vega, J. A. L., & Paz, D. B. (2018). Mecanosíntesis y efecto antimicrobiano de óxidos metálicos nanoestructurados. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología*, 11(21), 29. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.21.62545>
- Zavaleta Espejo, G. (2019). Efecto antibacteriano de nanopartículas de ZnO sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*. *Arnaldoa*, 26(1). <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26122>
- Zavaleta, G., Saldaña, J., Jauregui, S., Pacherez, D., Rivera, M., Samanamud, F., & Perales, O. (2019). Efecto antibacteriano de nanopartículas de ZnO sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* Antibacterial effect of ZnO nanoparticles on *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*. *Arnaldoa*, 26(1), 421–430. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26122>
- Zerón, A. (2010). *Biotipos, fenotipos y genotipos. ¿De qué tipo somos?* (Vol. 1, Issue 1). www.medigraphic.org.mx
- Zhang, R., Carlsson, F., Edman, M., Hummelgård, M., Jonsson, B. G., Bylund, D., & Olin, H. (2018). *Escherichia coli* Bacteria Develop Adaptive Resistance to Antibacterial ZnO Nanoparticles. *Advanced Biosystems*, 2(5). <https://doi.org/10.1002/adbi.201800019>

