



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES
AVANZADOS, S.C.
POSGRADO**

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

**Tesis
para obtener el Grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental**

Presenta:

L.Q. Diana Laura Aboites Quiriarte

**Director: Dr. Joan Sebastián Salas Leiva
Co-Director: Dr. Eduardo Quiroz Guzmán**

CHIHUAHUA, CHIH. 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, causada por la bacteria *Erwinia amylovora*, en consecuencia, genera pérdidas económicas significativas. Para su control y tratamiento se han empleado distintos antibióticos, sin embargo, debido al mal uso y abuso, 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); no obstante, se han reportado cepas resistentes a las nanopartículas. Para hacer frente a esta problemática, 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 del 90% (IC₉₀) y se llevó a cabo una presión selectiva, es decir, se expuso continuamente a la cepa control *E. amylovora* WT a 0.2 mg/mL de ZnO-NP. Tras la exposición se obtuvieron las generaciones de *E. amylovora* 13G y 20G con mayor resistencia a las ZnO-NP, con respecto a *E. amylovora* WT. Para determinar la sensibilidad colateral de *E. amylovora* 13G y 20G, se probaron 216 agentes antimicrobianos distribuidos en las placas de Microarreglo de fenotipo Biolog PM de la 11 a la 19. También se determinaron los cambios en el metabolismo del carbono mediante el uso de placas 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.

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, caused by the bacteria *Erwinia amylovora*, consequently generating significant economic losses. Different antibiotics have been used for its control and treatment; however, due to misuse and abuse, 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); However, strains resistant to nanoparticles have been reported. To address this problem, the objective of this research was to determine the existence of collateral sensitivity in *E. amylovora* exposed to zinc oxide nanoparticles. To do this, the growth inhibitory concentration of 90% (IC₉₀) was determined and selective pressure was carried out, that is, the control strain *E. amylovora* WT was continuously exposed to 0.2 mg/mL of ZnO-NP. After exposure, the generations of *E. amylovora* 13G and 20G with greater resistance to ZnO-NP were obtained, compared to *E. amylovora* WT. To determine the collateral sensitivity of *E. amylovora* 13G and 20G, 216 antimicrobial agents distributed on Biolog PM Phenotype Microarray plates 11 to 19 were tested. Changes in carbon metabolism were also determined using plates from 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.

Contenido

Resumen	2
Abstract	3
INTRODUCCIÓN	9
1.MARCO TEÓRICO	11
1.1. Importancia del cultivo de manzana	11
1.2 <i>Erwinia amylovora</i> como fitopatógeno del manzano.....	11
1.3 Mecanismos de control de <i>Erwinia amylovora</i>	13
1.3.1 Antibióticos	13
1.3.2 Nanopartículas metálicas.....	14
1.4 Mecanismos de resistencia antimicrobiana	16
1.4.1 Resistencia a Antibióticos	19
1.4.2 Resistencia a Nanopartículas	22
1.5 Sensibilidad colateral	26
1.6 Métodos de evaluación de actividad antibacteriana	30
1.6.1 Ensayo azul alamar en microplaca (MABA).....	30
1.6.2 Concentración inhibitoria al 90% (IC ₉₀).....	30
1.7 Métodos de evaluación de sensibilidad colateral (Biolog® PM)	31
1.8 Determinación del metabolismo de carbono (Biolog® EcoPlate)	32
2. Hipótesis.....	33
3. Objetivo General	33
3.1 Objetivos Específicos	33
4. METODOLOGÍA	34
4.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP)	34
4.2 Caracterización de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP).....	34
4.3 Cultivo de <i>Erwinia amylovora</i>	35
4.4 Determinación de la IC ₉₀	35
4.4.1 Preparación de dispersión stock de ZnO-NP	35

4.4.2 Ensayo azul alamar en microplaca (MABA).....	36
4.5 Presión selectiva mediante la determinación de la dosis letal (IC ₉₀).....	36
4.6 Determinación de la curva de crecimiento	37
4.7 Determinación del mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas de óxido de zinc por daño mecánico	38
4.8 Preparación cepas bacterianas para microscopía electrónica de barrido MEB	39
4.8 Determinación del metabolismo de carbono	40
4.9 Determinación de la sensibilidad colateral.....	42
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
5.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP).....	45
5.2 Estructura de nanopartículas por difracción de rayos x.....	46
5.3 Morfología de nanopartículas por MET y MEB	47
5.4 Determinación de IC ₉₀	49
5.5 Curvas de Crecimiento de <i>E. amylovora</i>	50
5.6 Morfología de <i>E. amylovora</i>	52
5.7 Evaluación del mecanismo de acción antimicrobiano de las ZnO-NP por daño mecánico ..	56
5.8 Determinación del metabolismo del uso de fuentes de carbono	57
5.9 Determinación de la sensibilidad colateral.....	63
6 CONCLUSIONES	83
RECOMENDACIONES	83
BIBLIOGRAFIA.....	84

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo de acción de las nanopartículas	16
Figura 2. Mecanismo de resistencia a los antimicrobianos.....	18
Figura 3. Mecanismos de resistencia vertical y horizontal	19
Figura 4. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.....	20
Figura 5. Sensibilidad colateral.....	28
Figura 6. Programas de rotación de antimicrobianos.....	29
Figura 7. Síntesis de ZnO-NP.	45
Figura 8. Patrón de difracción de rayos X.	46
Figura 9. Micrografías de la morfología de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP) obtenidas por MET y MEB.	48
Figura 10. Determinación de IC ₉₀ de <i>E. amylovora</i>	49
Figura 11. Curvas de crecimiento de <i>E. amylovora</i> WT, 13G y 20G.....	51
Figura 12. Características morfológicas de <i>E. amylovora</i>	53
Figura 13. Mecanismo de acción de las ZnO-NP.	57
Figura 14. Metabolismo de <i>E. amylovora</i> (EcoPlate).....	58
Figura 15. Diagrama de agrupamiento por similitud UPGMA.....	60
Figura 16. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS).....	61
Figura 17. Mapa de calor del consumo de fuentes de carbono.	61
Figura 18. placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 11.	64
Figura 19. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 12.....	65
Figura 20. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 13.....	66
Figura 21. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 14.....	67
Figura 22. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 15.....	68
Figura 23. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 16.....	69
Figura 24. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 17.....	70
Figura 25. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 18.....	71

Figura 26. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 19.....	72
Figura 27. Consolidado de porcentaje de sensibilidad colateral y resistencia de <i>E. amylovora</i> 13G.....	73
Figura 28. Consolidado de porcentaje de sensibilidad colateral y resistencia de <i>E. amylovora</i> 20G.....	74
Figura 29. Diagrama de conjuntos de resistencia.	76
Figura 30. Diagrama de conjuntos de sensibilidad colateral.	77

Índice de tablas

Tabla 1. Desarrollo de resistencia a nanopartículas antimicrobianas tras presión selectiva.....	25
---	----

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)** por su apoyo financiero durante todo el posgrado. Su respaldo económico fue fundamental para realizar la investigación y los experimentos necesarios para completar este trabajo.

Así mismo, al **Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV)** por proporcionar el espacio, las instalaciones, los equipos, el material y la calidad de sus docentes, que fueron esenciales para mi formación.

En el ámbito académico y profesional, extiendo mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el **Dr. Joan Sebastián Salas Leiva**, por todo el apoyo, la asesoría, los recursos, las oportunidades y el aprendizaje adquirido durante el desarrollo de este proyecto de tesis. Su guía ha sido invaluable a lo largo de este viaje llamado maestría. Además, quiero expresar mi admiración y alta estima hacia él.

Agradezco a mi codirector, el **Dr. Eduardo Quiroz Guzmán**, por su disposición, tiempo, dedicación y esfuerzo en llevar a cabo la estancia necesaria para el desarrollo de la propuesta de tesis.

A mis evaluadores, la **Dra. María Antonia Luna Velazco**, el **Dr. Francisco Paraguay Delgado**, la **Dra. Yuridia Ortiz Rivera** y el **Dr. Guillermo Manuel Herrera Pérez**, por fungir como guías y por sus valiosas asesorías, recomendaciones y aportaciones, que sin duda han dado lugar y forma a esta investigación.

A **Aurora Araiza, Mariana Ninffert y Reina Vela**, quienes colaboraron, dedicaron tiempo y esfuerzo a este proyecto.

En lo personal, quiero agradecer principalmente a **Dios** por proveer todos los medios. A **mis padres**, la **Sra. Guadalupe Quiriarte** y el **Sr. Juan Aboites**, por su amor y apoyo incondicional, quienes se esforzaron para que yo pudiera seguir avanzando. En especial, a mi mamá, mi luna del cielo, a quien dedico este peldaño.

Del mismo modo, agradezco a mi novio **Uriel Valdivia** por su amor, apoyo, paciencia, motivación, ayuda y acompañamiento en el desarrollo de esta tesis.

Y como lo mencioné alguna vez, un posgrado y una tesis no se realizan únicamente con la asesoría y el apoyo académico, sino también con el respaldo moral y emocional de personas que estuvieron para motivar, escuchar, aconsejar y alentar a continuar. Entre ellos, el **M.C. Luis Lozoya**, la **Dra. Gabriela Valenzuela**, el **M.S.C. Rubén Castañeda**, el **M.C. Benjamín Hernández**, la **Ing. Kimberly Enríquez**, el **Dr. Guillermo González**, el **M.C. Cesar Condori**, la **M.C. Susana Perrusquía** y la **Ing. María Dolores Lujan**.

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 originarla 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, Berlanga, 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. Estreptomina 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 et al., 2011; Serra, 2017). Así mismo, se han utilizado compuestos de cobre (i.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 Espejo,

2019). Sin embargo, se han reportado cepas resistentes a nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, por ejemplo: las 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 *A. baumannii* multirresistentes que contenían un gen que altera la biosíntesis de la membrana externa de lipopolisacáridos, una vez adquirida la resistencia al antibiótico colistina 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 han 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-NP). 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 (i.e. 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, Berlanga, 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, Berlanga, 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).

E. amylovora exhibe varios factores de virulencia que contribuyen a su patogenicidad. Uno de los más importantes es el sistema de secreción tipo III (T3SS). Además, *E. amylovora* produce un exopolisacárido (EPS) conocido como amilovorano, que bloquea el sistema vascular del árbol, impidiendo el flujo de nutrientes y agua, lo que contribuye a la enfermedad. La bacteria también tiene la capacidad de formar biopelículas, que son comunidades de bacterias protegidas por una matriz que las hace más resistentes a las condiciones adversas y a los tratamientos. Por último, *E. amylovora* muestra motilidad, lo que le permite desplazarse y colonizar nuevas áreas del huésped, facilitando la propagación de la infección (Santander & Biosca, 2017).

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 estreptomicina, 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. estreptomicina, 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 extractos orgánicos de plantas como (i.e. orégano, tomillo y canela), sin embargo, el uso indiscriminado ha generado problemas de resistencia principalmente a estreptomicina (Dagher et al., 2020; García et al., 2020). En Canadá y EE. UU., se aplican

estreptomicina 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 estreptomicina (Svircev et al., 2018). Esto dificulta el control de la enfermedad puesto que se ha estimado que la estreptomicina 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 y la membrana, por tanto, 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)

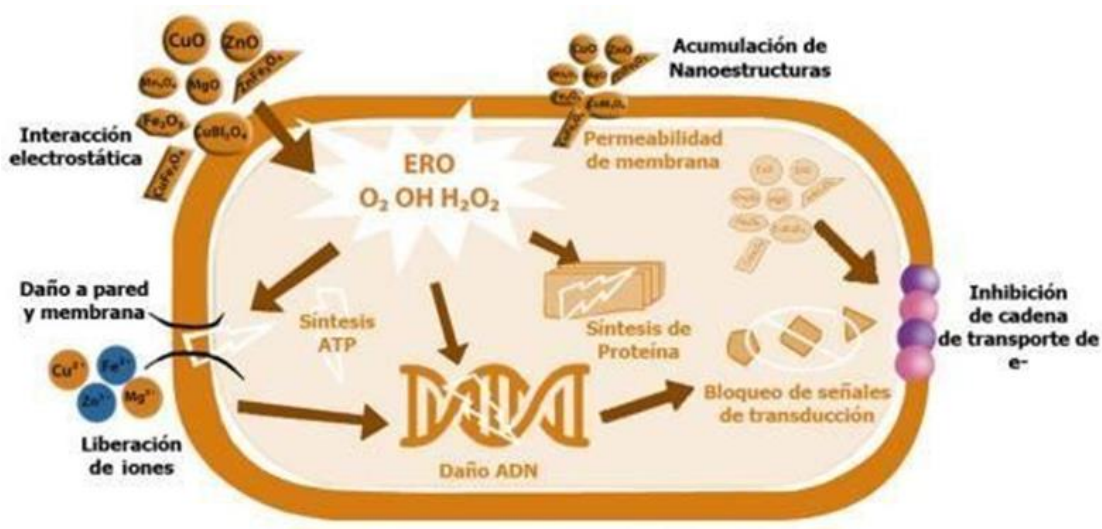


Figura 1. Mecanismo de acción de las nanopartículas (Vázquez et al., 2018).

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, es decir, 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 antimicrobiano 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 las enzimas 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.

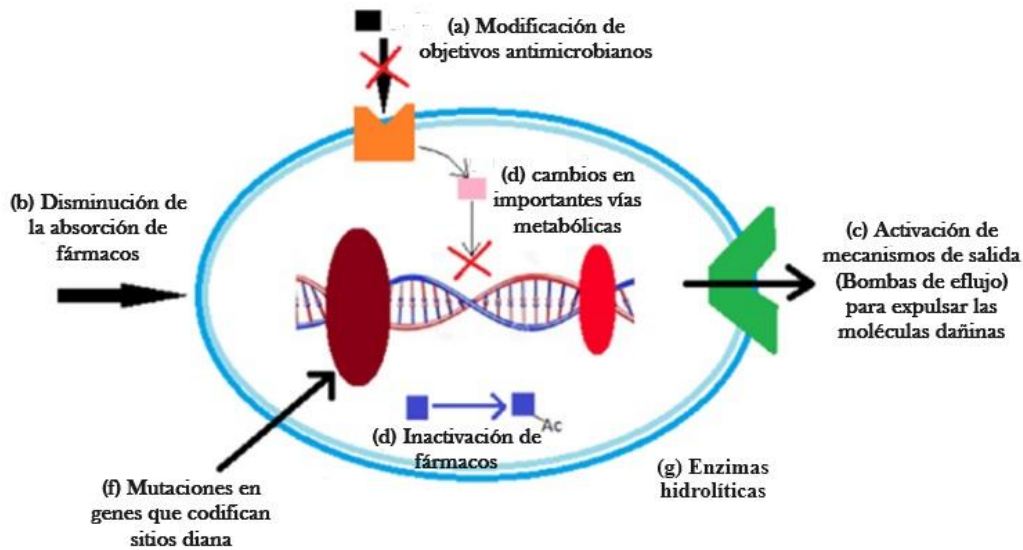


Figura 2. Mecanismo de resistencia a los antimicrobianos (Mann et al., 2021).

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, el cual 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; Hillman, 2022; Moreno et al., 2009).

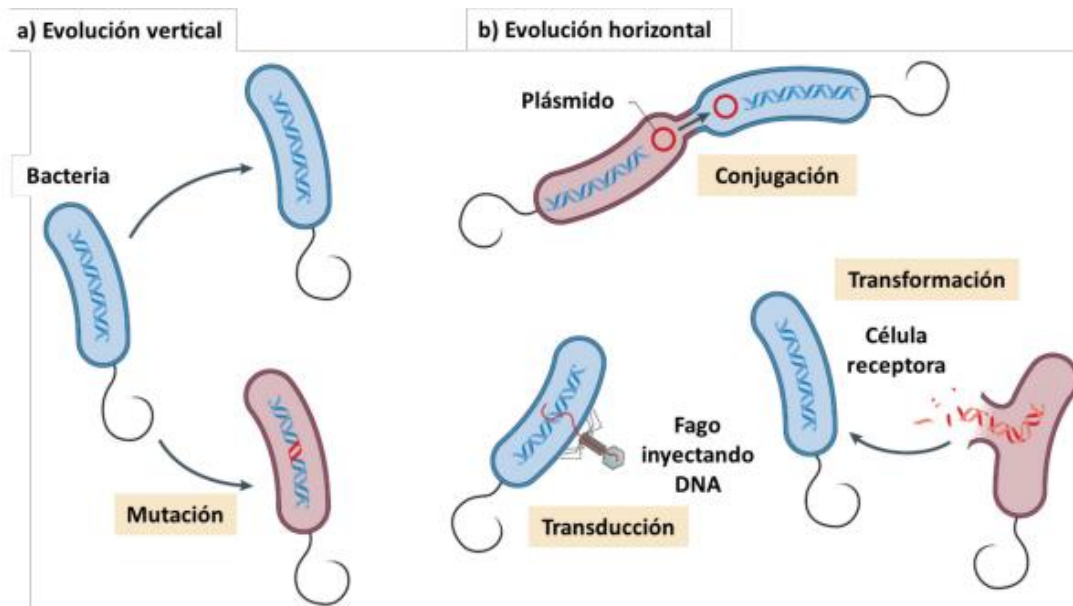


Figura 3. Mecanismos de resistencia vertical y horizontal (Chávez-Jacobo, 2020).

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).

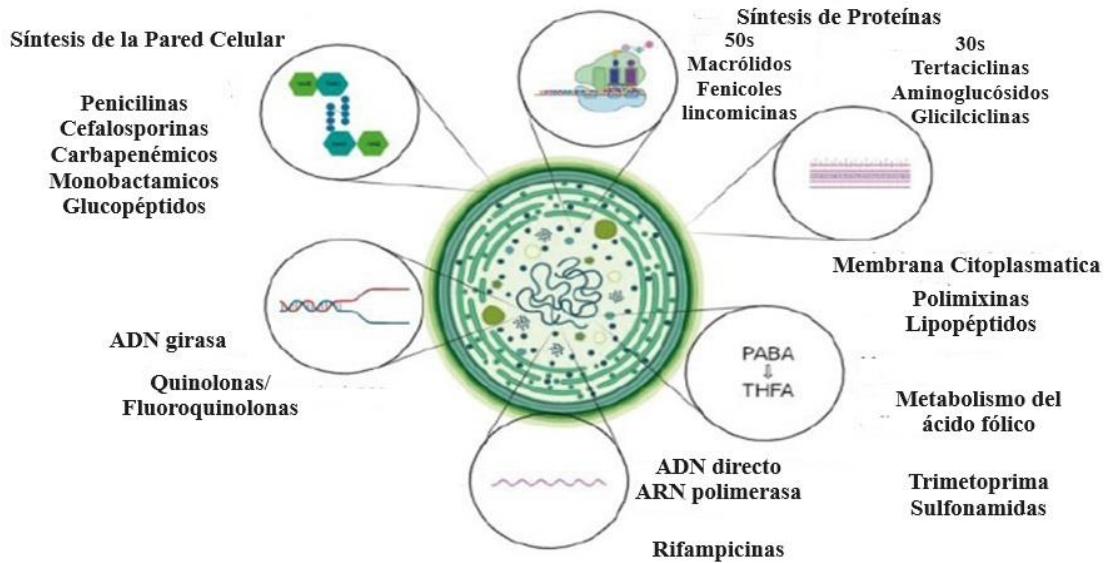


Figura 4. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción (Camacho, 2023).

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). Por otra parte, la aparición de resistencia se debe a mutaciones que confieren una ventaja competitiva a subpoblaciones mutantes cuando están bajo la presión selectiva de los agentes antimicrobianos. Este proceso evolutivo ocurre debido al uso prolongado de dichos agentes, lo que promueve la adaptación y proliferación de cepas resistentes (Yekani et al., 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).

La adquisición de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias a menudo conlleva una disminución en su aptitud física, conocida como "costo de aptitud física" (Suzuki et al., 2016). A pesar de que la resistencia a los antimicrobianos puede ser ventajosa para los microorganismos, varios estudios señalan que esta resistencia implica un significativo costo de aptitud para ellos (Yekani et al., 2023).

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 (Jałowicki 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 si no a otras bacterias de diferente género y especie (Moreno et al., 2009).

Por otro lado, se ha reportado que el fitopatógeno *E. amylovora* ha desarrollado 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, Berlanga, et al., 2011) Salas-Leiva (comunicación personal). Estos plásmidos se han encontrado en cepa *E. amylovora* de huertos manzaneros de la ciudad 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 *P. aeruginosa* (Panáček et al., 2018).

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; Hernando-Amado, Laborda, et al., 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). El aumento de la resistencia a un antibiótico se asocia con una mayor susceptibilidad a segundos agentes antimicrobianos (Yekani et al., 2023).

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, mediante las cuales 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, mediante las cuales 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 5.

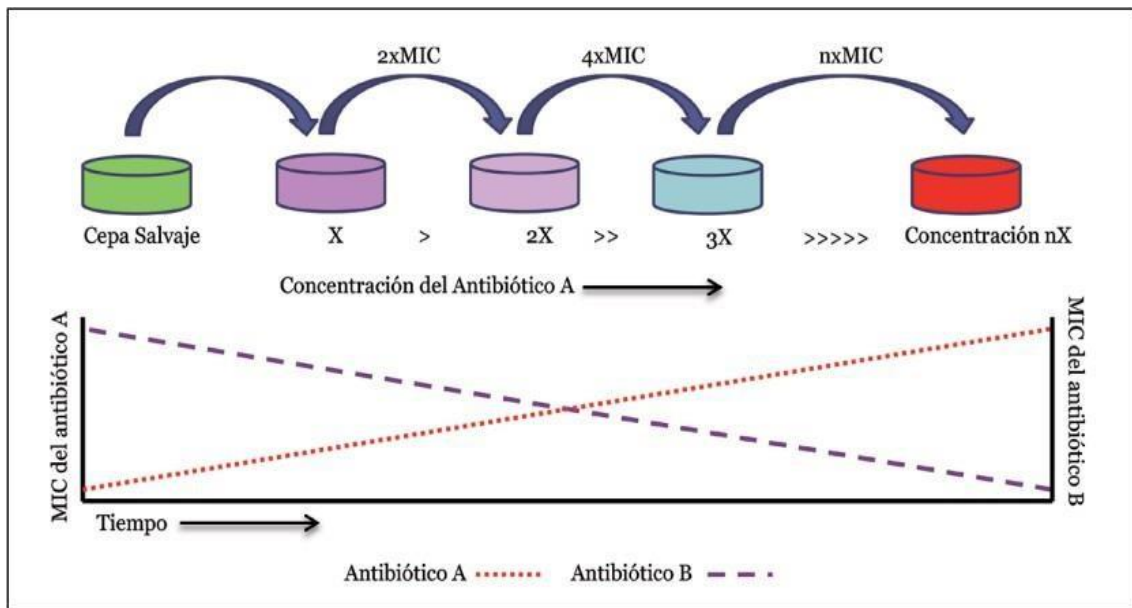


Figura 5. Sensibilidad colateral (Holguín et al., 2017).

La figura 5 ilustra el proceso in vitro de la sensibilidad colateral en una cepa bacteriana expuesta a concentraciones crecientes de antimicrobianos. En este proceso inverso, el aumento de la MIC para el antimicrobiano A resulta en la disminución de la MIC para el antimicrobiano de interés B (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

en la que 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 y 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).

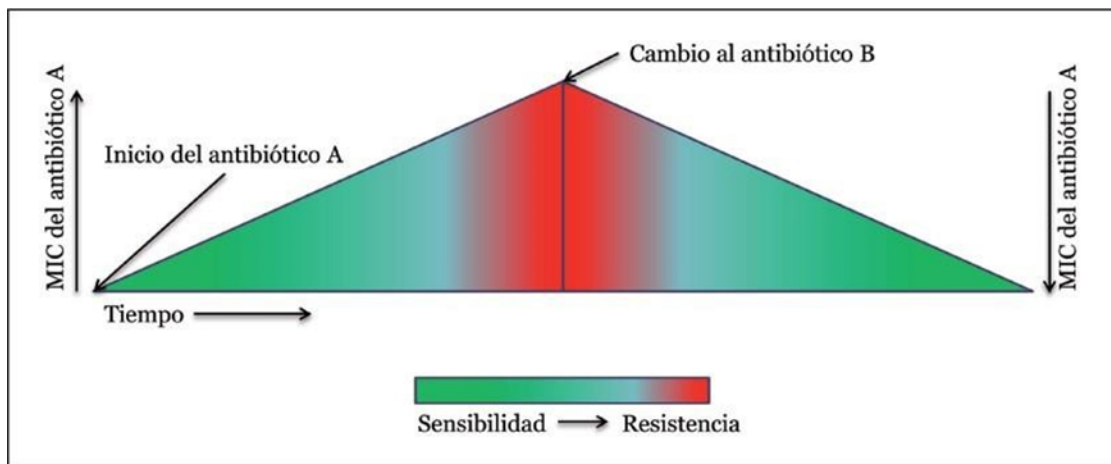


Figura 6. Programas de rotación de antimicrobianos (Holguín et al., 2017).

1.6 Métodos de evaluación de actividad antibacteriana

1.6.1 Ensayo azul alamar en microplaca (MABA)

El ensayo azul alamar en microplaca (MABA) ha sido una herramienta ampliamente empleada en la investigación de la viabilidad del crecimiento, la citotoxicidad y el metabolismo celular, en diversos sistemas biológicos y ambientales. Además, han sido aplicados de manera exitosa en el monitoreo de la susceptibilidad a antimicrobianos y en la evaluación de la viabilidad de biopelículas microbianas (Costa et al., 2021).

El ensayo MABA utiliza un colorante redox como indicador que se basa en la conversión del colorante azul no fluorescente resazurina (forma oxidada) a través de la conversión en resorufina de color rosa fluorescente (forma reducida) en presencia de células metabólicamente activas (Costa et al., 2021; de Jesús Alba et al., 2012; Salinas-Pérez et al., 2023). La NADPH deshidrogenasa es probablemente la responsable de la transferencia de electrones de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a resazurina, que se reduce a resorufina (Costa et al., 2021). Esta conversión se cuantifica en unidades relativas de fluorescencia no obstante el viraje en el color se puede detectar mediante la observación visual (Costa et al., 2021; de Jesús Alba et al., 2012; Salinas-Pérez et al., 2023).

1.6.2 Concentración inhibitoria al 90% (IC₉₀)

La concentración inhibitoria al 90% (IC₉₀), se refiere a la concentración de un agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento de un microorganismo en un 90%. Y se ha utilizado para establecer la concentración de un fármaco necesaria para alcanzar un determinado nivel de inhibición, en este caso del 90% (Prieto & Zamorano, 2002).

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

El fenotipo abarca 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 de “Microarreglos 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 decir, 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., 2019; 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., 2019; Jałowiecki et al., 2017).

1.8 Determinación del metabolismo de carbono (Biolog® EcoPlate)

Biolog EcoPlate, es una técnica dependiente del cultivo basada en un análisis multivariado del patrón de utilización de sustratos de carbono. Es un método de detección rápido para comparar cambios metabólicos en comunidades microbianas (Chavan & Nadanathangam, 2020). Las placas Biolog EcoPlate contienen fuentes de carbono comúnmente utilizadas por la mayoría de los microorganismos. Estas incluyen 31 fuentes de carbono, incluidos carbohidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, misceláneos, polímeros y aminas (Feng et al., 2023). 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 (Feng et al., 2023). También, se ha empleado ampliamente para estudiar y analizar el perfil fisiológico, la diversidad funcional y el cambio en el consumo de fuentes de carbono en comunidades microbianas de plantas y suelo tras el efecto a la exposición por nanopartículas de plata, dióxido de titanio y óxido de zinc entre otras (Chavan & Nadanathangam, 2020; Macůrková et al., 2021; Németh et al., 2021). Sin embargo, recientemente, se ha estudiado en comunidades bacterianas acuáticas. Según algunos estudios recientes se han evaluado, comparado y caracterizado los efectos de las nanopartículas de óxidos metálicos como ZnO-NP y TiO₂-NP en las comunidades microbianas de agua dulce (Németh et al., 2021).

2.Hipótesis

La presión selectiva generada por la exposición repetida del fitopatógeno *Erwinia amylovora* a nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP) 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 (ZnO-NP).
- Determinar la concentración inhibitoria de crecimiento (IC₉₀) de *E. amylovora* expuesta a nanopartículas de óxido de ZnO-NP.
- Obtener mediante presión selectiva aislados de *E. amylovora* con mayor resistencia a las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP) con respecto al control.
- Determinar si la presión selectiva a las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP) genera cambios metabólicos en *E. amylovora*.
- Determinar la sensibilidad colateral de aislados *E. amylovora* resistentes a las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP).

4. METODOLOGÍA

4.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP)

Para la síntesis de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP) con morfología de plateletas se seleccionó la morfología con base a lo reportado por Araiza et al. (2023), lo cual señala que las ZnO-NP presentaron mayor efectividad antimicrobiana frente a *E. amylovora*, *E. Coli* y *S. 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 ($\text{Zn O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (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 las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP)

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 versión 2.4.7. 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 (MET) 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 de Petri con medio semi-selectivo cristal violeta-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 la IC₉₀

4.4.1 Preparación de dispersión stock de ZnO-NP

Se realizó una dispersión stock de 0.2 mg/mL de ZnO-NP en agua destilada estéril y se sonicaron por 20 minutos para lograr una óptima dispersión. Se formó así una dispersión 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 IC₉₀. 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 ZnO-NP calculada para alcanzar las concentraciones a evaluar para el primer ajuste fueron de 0.050, 0.140 y 0.200 mg/mL. 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 µL de cada tubo y se adicionaron 10 µL 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 IC₉₀.

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) a condiciones de estrés continuo a ZnO-NP. Esta cepa que se utilizó como control fue aislada de los cultivos de manzana que previamente no había sido expuesta a ZnO-NP. Para inducir el estrés, se empleó una concentración de 0.2 mg/mL de ZnO-NP, que corresponde a una IC₉₀. Este

procedimiento se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Sniegowski (1997), con algunas modificaciones para adaptarla a nuestro experimento. Para ello, se realizaron suspensiones bacterianas 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 0.5 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 procedimiento 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). Cada generación obtenida, se sembró en medio semi-selectivo CCT para identificar y mantener la pureza del cultivo. Así mismo, fueron enriquecidas y conservadas en glicerol al 40%.

4.6 Determinación de la curva de crecimiento

Se llevaron a cabo las curvas de crecimiento de las cepas *E. amylovora* control (WT), y las cepas expuestas a ZnO-NP 13 y 20 veces *E. amylovora* 13G y *E. amylovora* 20G respectivamente. Se realizaron ajustes de concentración inicial para alcanzar uniformidad de aproximadamente 8×10^7 UFC/mL para las tres cepas al inicio (tiempo cero). Se ajustaron las densidades ópticas (OD) de cada cepa. Para lograr una concentración de 8×10^7 UFC/mL de *E. amylovora* WT se ajustó a una OD de 0.065. Sin embargo, para obtener la misma concentración de 8×10^7 UFC/mL en las cepas

E. amylovora 13G y 20G se requirió una OD de 0.100. Una vez ajustadas en el tiempo cero, se procedió a incubarlas en agitación constante a 120 rpm a 28°C y se tomaron lecturas de absorbancia cada dos horas. Para la determinación de la curva de crecimiento se utilizó el método de recuento en placa. La metodología de recuento en placa por plaqueo, ampliamente utilizada, implica la realización de diluciones seriadas 1:10 y la extensión de 100 µl de cada dilución en una placa. Estas placas se incuban hasta que las colonias sean visibles para su posterior recuento. Esta metodología tiene la ventaja de contar con un buen límite de detección, sin embargo, requiere mucho tiempo durante el proceso (Corral et al., 2012).

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

La evaluación del mecanismo de acción antimicrobiano de las ZnO-NP mediante daño mecánico por la morfología de plateletas, con el propósito de evaluar si las nanopartículas inducen un efecto antimicrobiano debido al daño mecánico que existe entre la morfología de la nanopartícula y su interacción con la bacteria, así como también debido a la disociación de iones Zn^{+2} presentes en la dispersión.

Para efectuar el mecanismo de acción antimicrobiano de las ZnO-NP sobre *Erwinia amylovora* 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. Para este proceso, se adicionaron 0.050 µL del cultivo bacteriano (de cada cepa respetivamente), 0.500 mL de una dispersión stock de 0.2 mg/mL y 4.450 mL de caldo LB en un volumen final de 5 mL a 28 °C.

Para evaluar el efecto antimicrobiano causado por el daño mecánico, debido a la exposición a las ZnO-NP, se dividieron las suspensiones bacterianas triplicadas en dos grupos. El primer grupo con

agitación (CA) y el segundo grupo **sin agitación (SA)**. Así mismo, se colocaron suspensiones bacterianas de cada cepa de *E. amylovora* como controles de ingreso **[i] El control de concentración bacteriana inicial**. Para ello, se realizaron diluciones seriadas (en PBS a pH 7.4) y se utilizó el método de conteo en placa para determinar la concentración bacteriana inicial de cada cepa esto con la finalidad de verificar que se inoculó la misma concentración bacteriana. Las condiciones de crecimiento para ambos grupos fueron las mismas (28°C por 24 horas) exceptuando la agitación (constante a 150 rpm). Transcurrido el tiempo de incubación se realizó recuento por método de microgota de los controles que salieron de incubación **[f] El control de concentración bacteriana final** y las suspensiones bacterianas expuestas a las ZnO-NP. Y se realizó una comparación del crecimiento de las cepas que fueron expuestas a las ZnO-NP con agitación y sin agitación con respecto a los controles sin exposición a las ZnO-NP.

4.8 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. Cada placa contenía 96 pozos con 31 sustratos de carbono diferentes, triplicados y agrupados según grupos funcionales como carbohidratos, misceláneos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, aminos-amidas y polímeros. Además, la placa contiene un pozo asignado como control negativo en cada replica sin sustrato de carbono que se inoculó con solución salina o agua destilada según sea el caso.

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 de solución salina estéril y se centrifugaron a 3200 rcf por 8 minutos. Luego se resuspendieron en 15 mL de solución salina; de esta resuspensión 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. Los pozos control se inocularon con solución salina estéril. 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.

La capacidad de los microorganismos para utilizar distintas fuentes de carbono se determinó mediante la fórmula del desarrollo promedio del color del pozo (AWCD, average well color development, por sus siglas en inglés), se expresa con las siguientes ecuaciones:

$$\sum_{i=1}^n \frac{(C_i - R)}{n} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

C_i = Es el valor de la absorbancia de cada fuente de carbono

R = Es el valor de la absorbancia del control

n = es el número total de fuentes de carbono (31 fuentes de carbono)

$$P_i = \frac{(C_i - R)}{\sum (C_i - R)} \quad (\text{Ec. 2})$$

Para determinar el consumo de fuentes de carbono por grupo funcional se determinó con la ecuación Ec. (1) sustituyendo n por el número de sustratos que pertenecen a cada grupo funcional. Los resultados del uso de fuentes de carbono se trazaron por grupo funcional (suma de AWCD por grupo) e individualmente (AWCD) utilizando mapas de calor (heat map) en los que los colores cálidos y fríos se asocian con un mayor o menor consumo de las fuentes de carbono, respectivamente.

Por otro lado, se empleó el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) junto con el índice de similitud Bray-Curtis y el análisis filogenético UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages, por sus siglas en inglés) para representar la similitud bacteriana taxonómica entre las cepas expuestas a la presión selectiva por el ZnO-NP *E. amylovora* 13G y 20G en comparación con *E. amylovora* WT. Se elaboró un diagrama de matriz para identificar y comparar

las principales fuentes de carbono utilizadas por las tres cepas de *E. amylovora*. Además, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés).

Por último, se determinó el análisis estadístico, por lo cual 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 en el software (Statistica v.10). Los análisis estadísticos, NMDS, UPGMA, PCA y mapa de calor, se realizaron utilizando el paquete estadístico integral PAST 4.

4.9 Determinación de la sensibilidad colateral

Las placas del microarreglo fenotípico Biolog 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 el análisis estadístico se realizó un promedio de las cuatro lecturas obtenidas de viabilidad por triplicado de cada agente antimicrobiano 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. Se utilizó el software Past 4 para este propósito.

De los 216 agentes antimicrobianos que se evaluaron para determinar su efecto antimicrobiano sobre las cepas de *E. amylovora* 13G y 20G. Se identificó cuántos de estos agentes presentaron sensibilidad colateral, resistencia o no produjeron cambios, en comparación con la cepa *E. amylovora* WT.

Para esta determinación se utilizó como base el análisis estadístico y las gráficas de las PM en las figuras 18-26.

El porcentaje de sensibilidad colateral se calculó considerando los 216 agentes antimicrobianos como el 100%. Se contabilizó, de forma independiente para cada cepa *E. amylovora* 13G y 20G, cuántos agentes mostraron sensibilidad colateral en comparación con la cepa *E. amylovora* WT a través de la siguiente fórmula:

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

Donde:

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

TAA = Total de agentes antimicrobianos (216) (es una constante)

Para calcular el porcentaje de resistencia, también se consideraron los 216 agentes antimicrobianos como el 100%. Se cuantificó el número de agentes que mostraron resistencia para cada cepa 13G y 20G, respectivamente, en comparación con la cepa *E. amylovora* WT mediante la siguiente fórmula:

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

Donde:

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

TAA = Total de agentes antimicrobianos (**216**)

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

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

Donde:

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

TAA = Total de agentes antimicrobianos (**216**)

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP)

Para la obtención de las ZnO-NP se empleó el método de síntesis hidrotermal y se obtuvieron seis muestras pulverizadas de color blanco fino, las cuales se identificaron como LZP01-6 como se muestra en la figura 7. 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-NP.

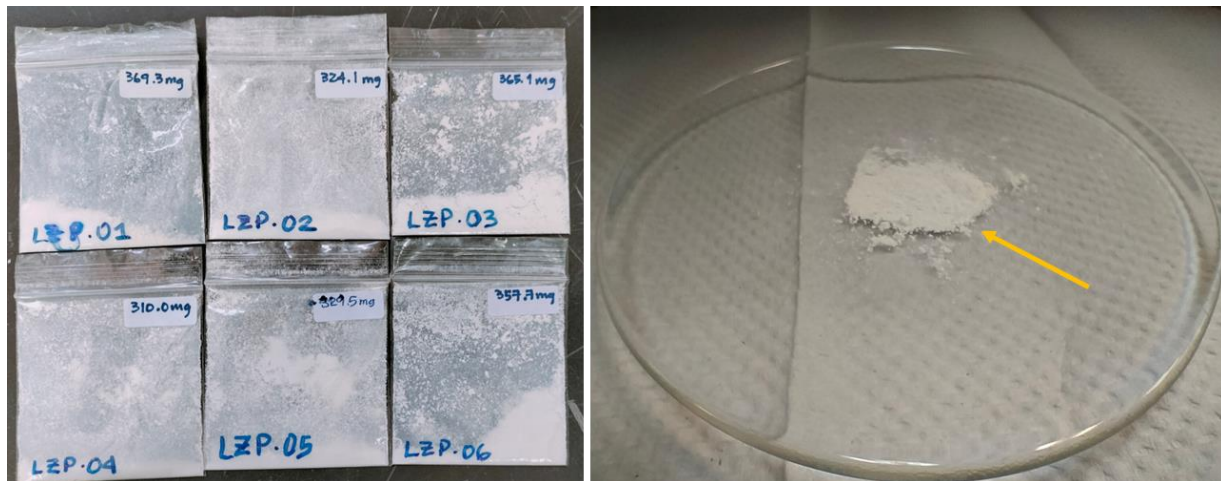


Figura 7. Síntesis de ZnO-NP.

La figura 7 presenta el pulverizado blanco y fino de ZnO-NP obtenido mediante el método de síntesis hidrotermal.

5.2 Estructura de nanopartículas por difracción de rayos x

La determinación de la pureza de fase de las ZnO-NP se analizó a través de Difracción de Rayos X (DXR). La figura 7 muestra los patrones de difracción de rayos X en los cuales 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 indexada JCPDS 00-036-1451.

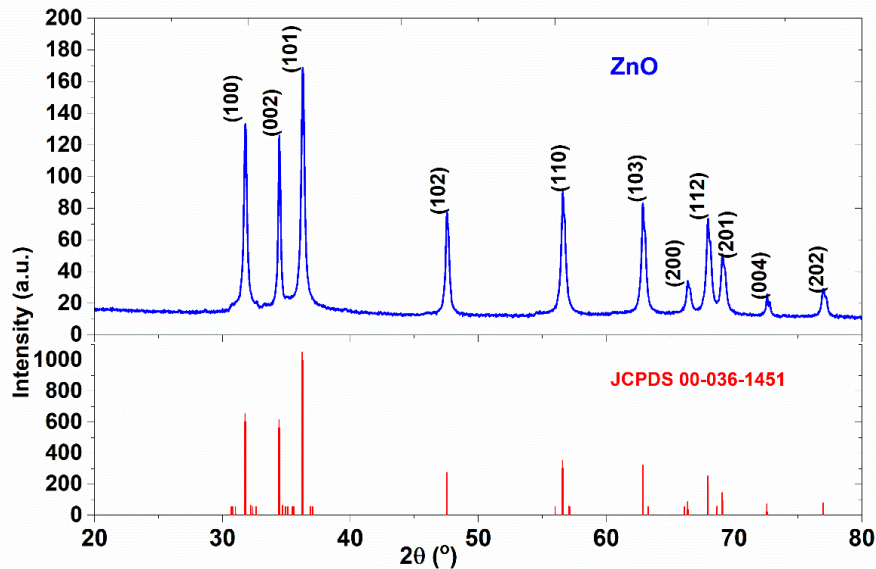


Figura 8. Patrón de difracción de rayos X.

Los picos de difracción de síntesis de ZnO-NP (figura 8) coinciden con los planos de reflexiones para una estructura de tipo wurtzita reportado por Aquino. (2016) y Narsin et al. (2011). Se ha reportado que los planos (002) de ZnO-NP tienen actividad antimicrobiana (Pariona et al., 2020).

5.3 Morfología de nanopartículas por MET y MEB

En la figura 9 se muestran las micrografías en campo claro obtenidas mediante MET y MEB para elucidar las características morfológicas de las ZnO-NPs. Así como, sus respectivos histogramas de frecuencias para la determinación de sus dimensiones.

En la figura 9A se observa una micrografía tomada en la escala de 200 nm la cual muestra y confirma la morfología más detallada y definida de tipo plateletas de ZnO; en la figura 9B se ilustra una micrografía magnificada con una escala de 500 nm con el fin de apreciar más los detalles, indica una longitud de 362 ± 10 nm, una anchura de 253 ± 6 nm. Y en la figura 9C se pueden apreciar formas poligonales por el traslape de ZnO-NPs, indicando 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. En la figura 9D se observa una micrografía de MEB muestra la influencia del método de síntesis hidrotermal en la morfología de plateletas de ZnO con una distribución heterogénea y aglomerada. Por lo que la figura 9 E, F y G muestran los histogramas de frecuencia de longitud, ancho y espesor respectivamente.

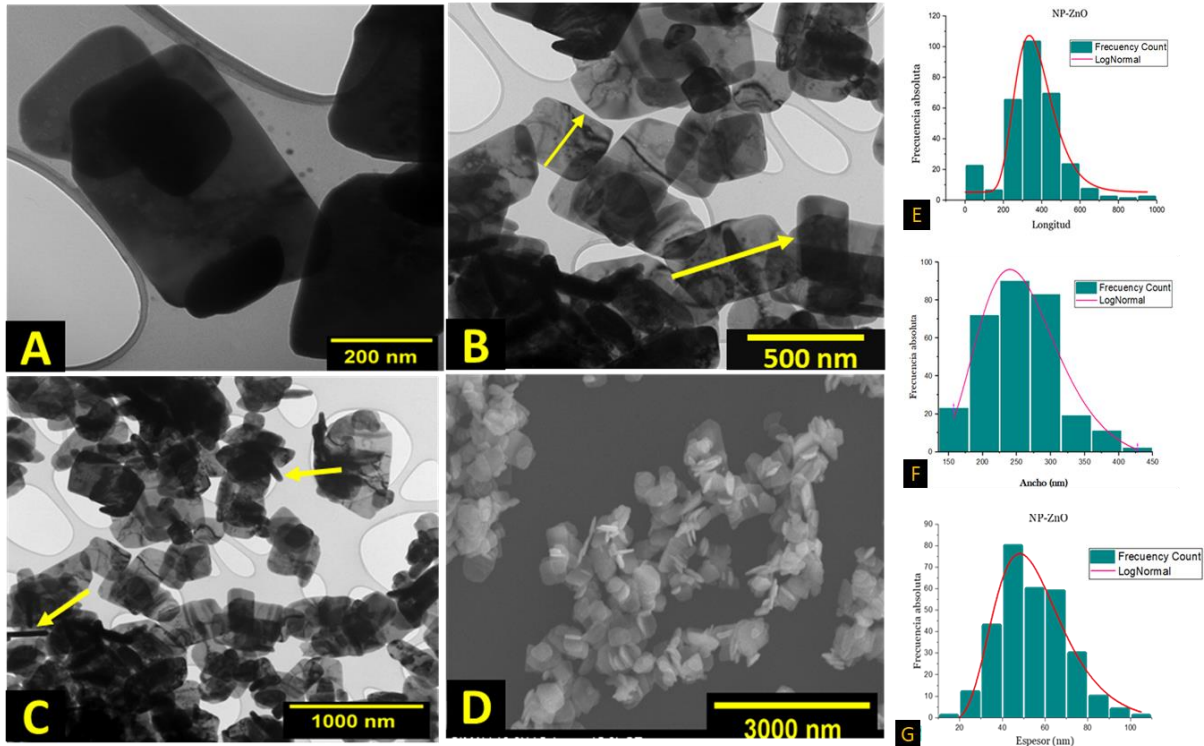


Figura 9. Micrografías de la morfología de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP) obtenidas por MET y MEB.

En la figura 9 se observan diferentes magnificaciones que muestran la morfología, el tamaño, la aglomeración y la heterogeneidad de las ZnO-NP, así como, los histogramas de distribución del tamaño de partículas y ajuste log-normal. La morfología y los tamaños de las ZnO-NP que se obtuvieron en las micrografías de TEM y SEM en la figura 9 coinciden a lo reportado por Araiza-Campos et al. (2023 y Pariona et al. (2020). Estos resultados muestran que el método de síntesis hidrotérmal juega un papel importante en la obtención de la morfología de plateletas.

5.4 Determinación de IC₉₀

A través de un ensayo MABA y un análisis Probit se determinó que las ZnO-NP tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. amylovora* a una IC₉₀ de 0.200 mg/mL.

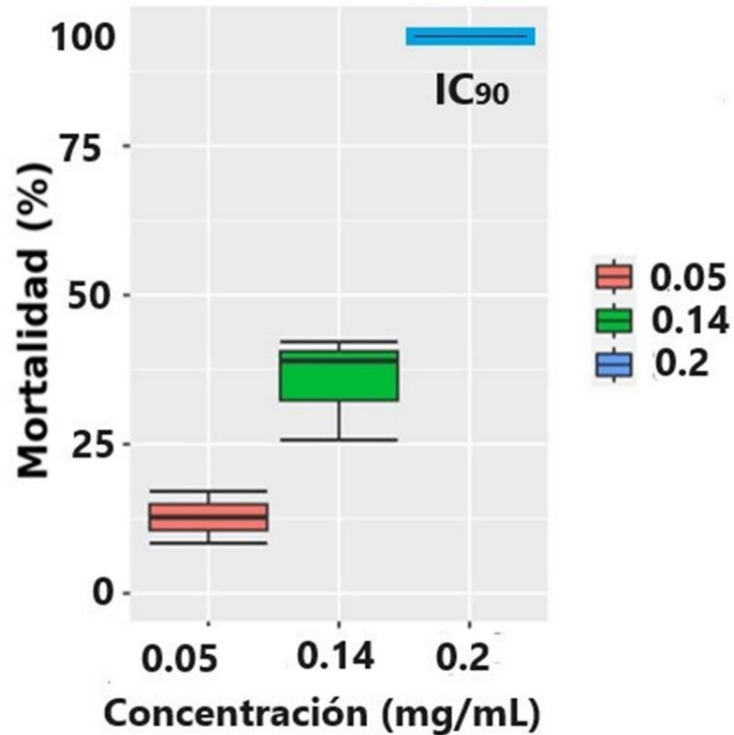


Figura 10. Determinación de IC₉₀ de *E. amylovora*

En la figura 10 se señala con base al porcentaje de mortalidad y a las concentraciones evaluadas en un rango de 0.050 a 0.2 mg/mL que a una concentración de 0.2 mg/mL ($P < 0.05$) inhibe el 90% del crecimiento de *E. amylovora*. Con esta concentración se desarrolló la presión selectiva de *E. amylovora* a las ZnO-NP. No obstante, hasta la obtención de la cepa *E. amylovora* 13G (décimo tercera generación) se hizo un corte para reevaluar la IC₉₀ y se obtuvo que esta cepa evolucionada presentó un incremento en la IC₉₀ de 1.7 mg/mL. Sin embargo, esta concentración no es factible

aplicar en campo y se continuo la presión selectiva de *E. amylovora* 13G a 0.2 mg/mL hasta la obtención de la cepa *E. amylovora* 20G.

De manera similar, en *Enterococcus faecalis*, se demostró que una exposición prolongada a concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de tetraciclina resultó en un aumento de cuatro veces en la CMI de tetraciclina. Esto sugiere que la bacteria ganó resistencia a la tetraciclina después de estar expuesta a este antibiótico durante un tiempo prolongado (Ma & Chua, 2022).

5.5 Curvas de Crecimiento de *E. amylovora*

En la figura 11 se pueden apreciar las curvas de crecimiento de 12 horas de *E. amylovora* WT, *E. amylovora* 13G y *E. amylovora* 20G. De acuerdo con la tasa de crecimiento especifica (μ) los valores para cada cepa fueron: *E. amylovora* WT (μ)= 0.252, *E. amylovora* 13G (μ)= 0.272, *E. amylovora* 20G (μ)= 0.296. Las curvas de crecimiento y la tasa de crecimiento específico de las cepas expuestas a ZnO-NP *E. amylovora* 13G y 20G presentan similitud entre ellas en comparación a la cepa sin exposición a *E. amylovora* WT, lo cual, con base a los valores de (μ) indica que las cepas expuestas a ZnO-NP presentan mayor velocidad de duplicación, sin embargo, en términos de crecimiento (UFC/mL) son menores, siendo la cepa *E. amylovora* WT quien alcanza mayor crecimiento.

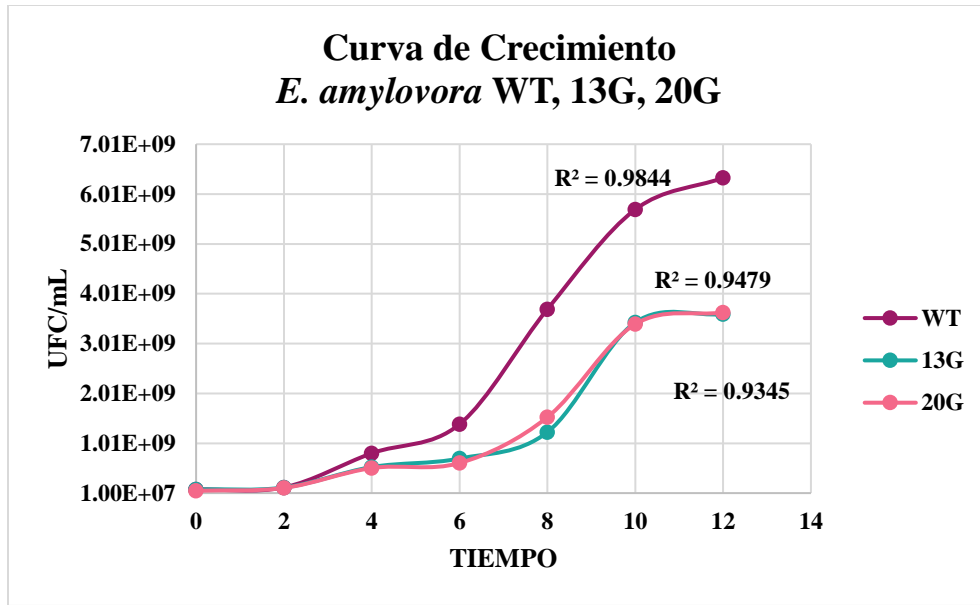


Figura 11. Curvas de crecimiento de *E. amylovora* WT, 13G y 20G.

La cepa *E. amylovora* en términos de tamaño, es una célula con menor longitud, como se muestra en la figura 12 en comparación con las cepas expuestas a ZnO-NP. Por lo tanto, su tiempo de duplicación es más rápido, por el contrario, las cepas expuestas a las ZnO-NP pueden requerir mayor energía para mantener la resistencia y la reparación celular, lo que reduce los recursos disponibles para su crecimiento y reproducción. Además, investigaciones previas han demostrado que la expresión de genes de resistencia o mutaciones puntuales está asociada con una menor tasa de crecimiento en las cepas resistentes. Así mismo, se ha observado que los antibióticos afectan el estado fisiológico de las bacterias, incluyendo su tasa de crecimiento, tamaño y morfología, dependiendo de su mecanismo de acción (Yekani et al., 2023).

5.6 Morfología de *E. amylovora*

En la figura 12 se pueden observar las micrográficas y los histogramas de frecuencia para el análisis del tamaño y morfología de las cepas de *E. amylovora* expuestas a ZnO-NP con respecto a la cepa control (*E. amylovora* WT). La MEB reveló cambios significativos en el tamaño de las células bacterianas en respuesta a la presión selectiva ejercida por las ZnO-NP. Los histogramas de frecuencia proporcionaron datos cuantitativos sobre la distribución del tamaño celular en cada cepa. Se observaron cambios en la distribución del tamaño celular en las cepas expuestas a ZnO-NP en comparación con la cepa control, lo que respalda las observaciones cualitativas realizadas en las micrográficas. Al analizar las micrográficas de la figura 12, se observó que las células de *E. amylovora* WT (figura 12 A) eran notablemente más pequeñas, con una longitud promedio de $1.10 \mu\text{m} \pm 0.03$ y un ancho de $0.41 \mu\text{m}$. Por el contrario, las células expuestas repetidamente a ZnO-NP mostraron un aumento en su tamaño celular, así como una mayor uniformidad morfológica entre ellas.

En la figura 12B las células de *E. amylovora* 13G presentaron una longitud significativamente mayor, con un promedio de $1.83 \pm 0.07 \mu\text{m}$, y un ancho de $0.46 \mu\text{m}$. Por su parte, las células de *E. amylovora* 20G (figura 12C) mostraron una longitud de $1.73 \mu\text{m} \pm 0.01$, pero un ancho mayor de $0.50 \mu\text{m}$, lo que sugiere una morfología más robusta en comparación con las otras cepas.

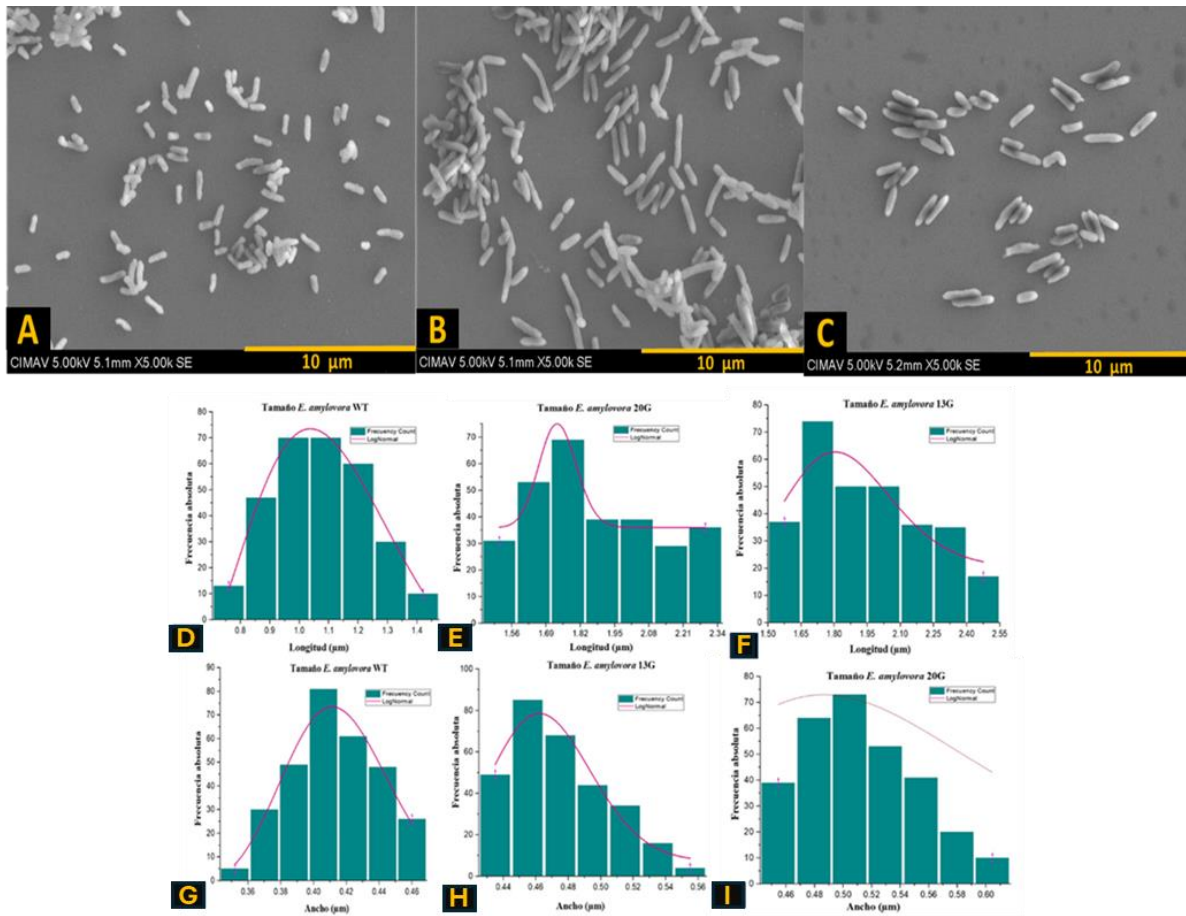


Figura 12. Características morfológicas de *E. amylovora*.

Estos hallazgos indican una respuesta adaptativa de las bacterias frente a la presencia continua de ZnO-NP, manifestada en cambios significativos en su tamaño celular, los cuales podrían estar relacionados con mecanismos de resistencia o adaptación a esta presión ambiental. Así mismo, investigaciones similares han reportado que la exposición prolongada de bacterias a ZnO-NP puede causar alteraciones significativas en su morfología y fisiología. Por ejemplo, Según Rihacek et al. (2023) informaron que *E. coli* expuesta repetidamente durante 40 generaciones a ZnO-NP y al compuesto ZnO presentaron un aumento en el ancho de la célula bacteriana siendo esta morfología más robusta. En el estudio el ancho de las células expuestas de *E. coli* fue de 568 ± 15

nm, mientras que el ancho de las células del control fue de 451 ± 18 nm. Este aumento en el grosor también se observó en *E. amylovora* 13G y 20G en respuesta a la exposición a las ZnO-NP como se muestra en la figura 12. No obstante, cabe resaltar, que las cepas de *E. amylovora* 13G y 20G no solo presentaron un aumento en el ancho de la célula bacteriana si no también en la longitud, característica que no presentaron las cepas de *E. coli* tras la exposición. Por otro lado, también reportaron que tras una exposición consecutiva de 20 subcultivos en ausencia del ZnO, 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 en el fenotipo bacteriano, sin embargo, también permanecieron algunos cambios a nivel genómico (Rihacek et al., 2023). De manera similar, Zhang et al. (2018) al evaluar el efecto de la exposición de *E. coli* a ZnO-NP, durante 25 generaciones, observaron que la bacteria podía crecer incluso a concentraciones elevadas de hasta 1000 $\mu\text{g/mL}$ de NP-ZnO. Además, se notó un cambio en la morfología de las células de *E. coli* que pasaron de ser bacilos a cocos. Según anunciaron, esta condición puede ser reversible, lo que implica que la bacteria tiene la capacidad de perder la resistencia adquirida y regresar a su morfología natural, cuando las ZnO-NP son retiradas del medio de cultivo y sugieren que estos cambios no son genéticos, sino adaptaciones fenotípicas reversibles. Así mismo, según Kumari & Kamat. (2023) y Raza et al. (2021) los cambios en la morfología bacteriana y la resistencia antimicrobiana no se deben a cambios genéticos permanentes, sino que se consideran fenómenos adaptativos, transitorios y temporales. Esto implica que las bacterias pueden ajustar su morfología y desarrollar resistencia frente a condiciones ambientales desafiantes, como la exposición a ZnO-NP, como una respuesta inmediata y adaptativa para sobrevivir. Estos cambios son temporales y no necesariamente resultan en

alteraciones permanentes en el material genético bacteriano. En *E. amylovora* este cambio morfológico en las cepas expuestas a la presión selectiva de ZnO-NP podría ser reversible al inducir su crecimiento sin la presencia de estrés de las ZnO-NP. Sin embargo, esta observación aún no ha sido probada, por lo que se sugiere su evaluación en futuros estudios. Por otro lado, según Panáček et al. (2018) tras una presión selectiva de cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* a Ag-NP señalan que la resistencia evoluciona con cambios en el fenotipo y tras una secuenciación del genoma no presentaron cambios en el genoma, sin embargo, esta resistencia la han atribuido a la producción de flagelina, una proteína del flagelo, que actúa aglomerando las Ag-NP lo que dificulta la actividad antimicrobiana de las nanopartículas.

Estudios evaluados con antibióticos, señalan que aun y cuando las bacterias son capaces de adaptarse y sobrevivir al estrés de estos, su morfología se ve afectada por la acción directa del antibiótico o por una respuesta fisiológica adaptativa a la inhibición del crecimiento. Algunas bacterias pueden alterar su forma para evitar el ingreso de los antimicrobianos o para expulsarlos más eficientemente. Bajo la influencia de diferentes antibióticos, las células bacterianas sufren cambios morfológicos que incluyen variaciones en tamaño, curvatura, relación de aspecto y relación superficie-volumen. Estos cambios pueden servir como indicadores del mecanismo de acción antibacteriano (Callaghan et al., 2022; Ojkic et al., 2022)

5.7 Evaluación del mecanismo de acción antimicrobiano de las ZnO-NP por daño mecánico

En la figura 13 se presenta una comparación del efecto antimicrobiano por el mecanismo de acción del daño mecánico en las tres cepas de *E. amylovora* expuestas a ZNO-NP, bajo dos condiciones: con agitación y sin agitación, (manteniendo constantes las condiciones del tiempo y la temperatura de incubación). Esta comparación permitió evaluar cómo la presencia o ausencia de agitación interviene en el efecto antimicrobiano de las nanopartículas en las tres cepas bacterianas, proporcionando información sobre su respuesta a estas condiciones de tratamiento.

El mecanismo de acción antimicrobiano de las ZnO-NP se evidencia en la cepa de *E. amylovora* WT, ya que esta cepa es susceptible a una concentración de 0.2 mg/mL de ZnO-NP. Esto destaca la eficacia de las ZnO-NP en la inhibición del crecimiento de esta cepa específica como se muestra en la gráfica en la sección A se observa que, en ambas condiciones, tanto con agitación (WTCA) como sin agitación (WTSA), hay una inhibición del crecimiento bacteriano en comparación con la concentración final en el control [f]. Sin embargo, en la sección WTCA, donde se aplica agitación, se observa mayor inhibición (6.33×10^4 UFC/mL) en comparación con WTSA (3.78×10^5 UFC/mL). La sugerencia se basa en la posibilidad de que la agitación facilite la dispersión del nanomaterial, lo que aumentaría su interacción con el medio de cultivo bacteriano. Además, las nanopartículas que tienen bordes y esquinas numerosos ofrecen más sitios de superficie reactivos, lo que podría contribuir a su capacidad para causar daño mecánico en sistemas biológicos (Rivas & Torres, 2021).

Por otro lado, en las cepas *E. amylovora* 13G y *E. amylovora* 20G se puede destacar que ambas cepas en condiciones de agitación y exposición a ZnO-NP 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 sugiere una posible resistencia o adaptación de estas cepas a la presencia del tratamiento antimicrobiano.

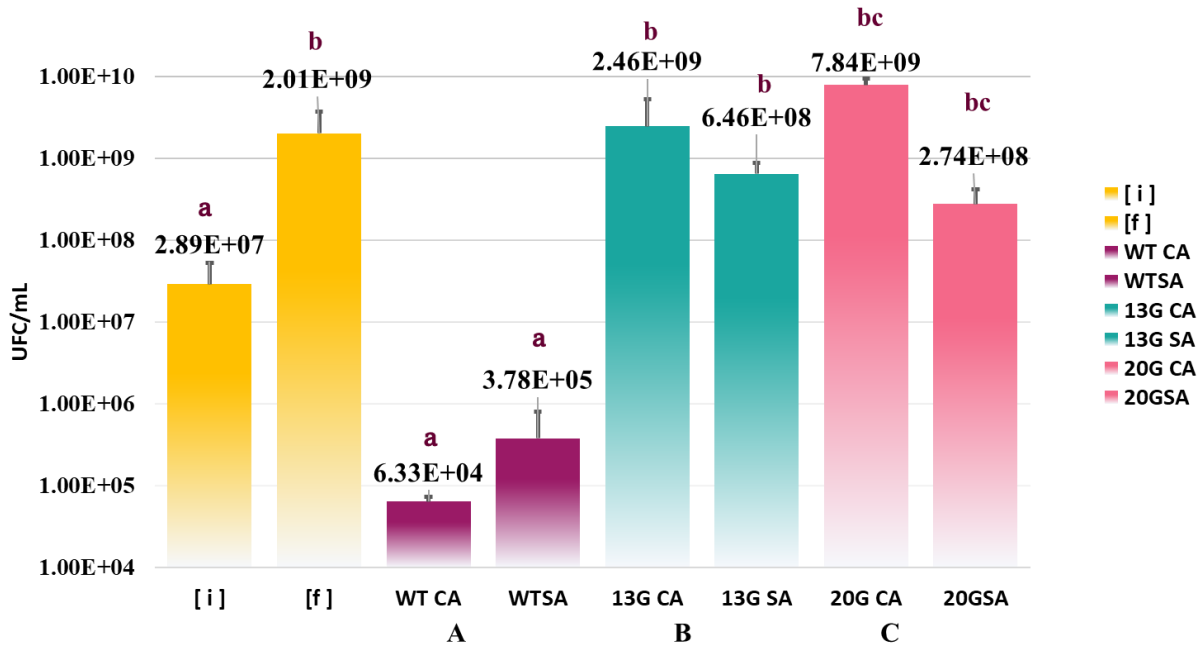


Figura 13. Mecanismo de acción de las ZnO-NP.

5.8 Determinación del metabolismo del uso de fuentes de carbono

El estudio del metabolismo de las bacterias expuestas a una presión selectiva a ZnO-NP en comparación con la cepa que no ha sido expuesta puede proporcionar información sobre los cambios metabólicos asociados con la adquisición de resistencia a las ZnO-NP. Al analizar el metabolismo de bacterias resistentes, es posible identificar vías metabólicas o el tipo de fuente de carbono que se está utilizando en comparación con las bacterias sensibles y así identificar un posible mecanismo de acción en defensa a las ZnO-NP. En la figura 14 se observa que hay un cambio significativo en el consumo de fuentes de carbono (organizadas por grupo funcional) entre

las cepas *E. amylovora* 13G y 20G en comparación con la cepa *E. amylovora* WT. Y se observa un aumento en el uso de fuentes de carbono, especialmente aminoácidos, y una disminución en el consumo de fuentes por los misceláneos por parte de las cepas expuestas a ZnO-NP. Este cambio en el perfil metabólico sugiere una adaptación de las cepas a la presencia de ZnO-NP, con un ajuste en la utilización de fuentes de carbono para mantener su metabolismo en condiciones estresantes ya que la exposición repetida de ZnO-NP generó una presión selectiva en *E. amylovora* que provocó cambios fenotípicos y metabólicos en cuanto al consumo de fuentes de carbono.

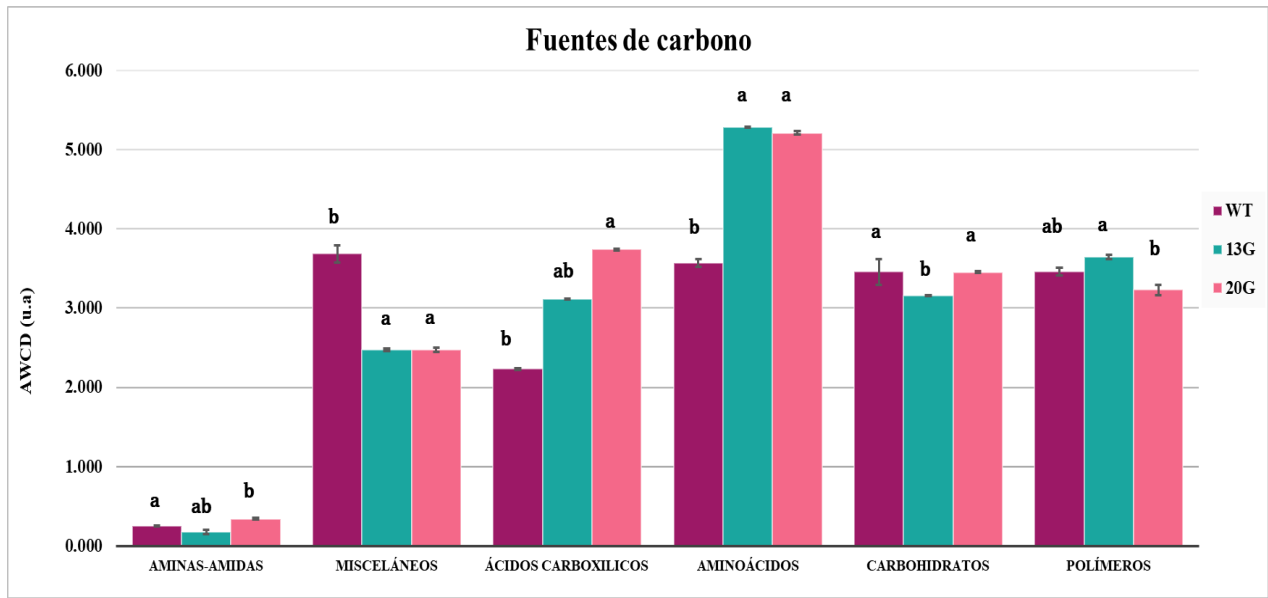


Figura 14. Metabolismo de *E. amylovora* (EcoPlate).

En comparación con los resultados obtenidos en *E. amylovora* según un análisis detallado por Németh et al. (2021) reveló que la exposición transitoria a las de TiO₂-NP y ZnO-NP influyó en la actividad metabólica de diversas maneras y a través de distintos mecanismos de acción. Las TiO₂-NP tuvieron un impacto menor en el perfil metabólico, de un 30% de inhibición. En contraste, las de ZnO-NP mostraron un efecto inhibitor mucho más fuerte, alcanzando el 99%, con

respuestas claramente dependientes de la concentración, el grupo de sustratos más afectado en términos de uso por las ZnO-NP fue el grupo de los ácidos carboxílicos el consumo inicial oscilaba en el rango de 15–17%, aumentando a 30–57%. Por otro lado, según Mitchell et al. (2023) mencionan que las interacciones de los metales como lo es el zinc y las bacterias generan cambios como la disminución del crecimiento, cambios en la morfología e inhibición de procesos bioquímicos tanto en células individuales como a nivel comunitario. En resumen, mismos que se han observado en *E. amylovora*, como la disminución del crecimiento, un aumento en el tamaño de las células expuestas, un aumento en el consumo de aminoácidos y pérdida del consumo de los misceláneos, por ejemplo.

La figura 15 muestra el análisis de similitud en el uso de fuentes de carbono basado en el algoritmo UPGMA reveló tres grupos bien delimitados entre las cepas, mostrando una mayor similitud entre las cepas expuestas a ZnO-NP, *E. amylovora* 13G y 20G, en comparación con la cepa *E. amylovora* WT.

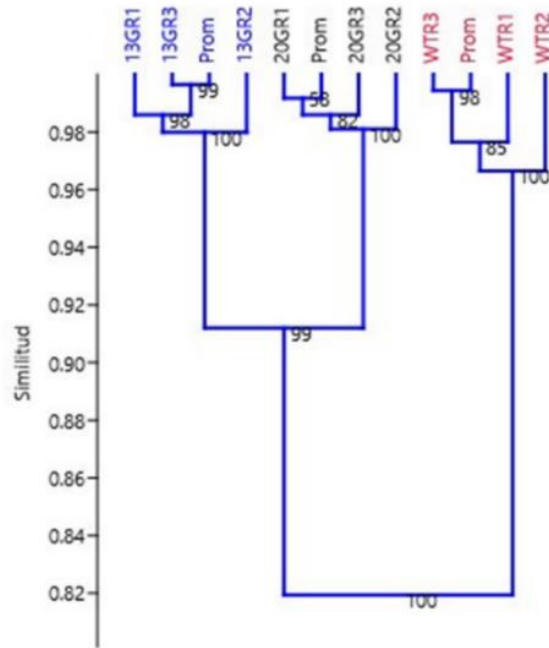


Figura 15. Diagrama de agrupamiento por similitud UPGMA.

Para complementar lo anterior, la figura 16 ilustra el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) junto con el índice de similitud Bray-Curtis proporciona una representación clara de la distribución y afinidad de las cepas *E. amylovora* WT, 13G y 20G hacia diferentes fuentes de carbono. Los ejes 1 y 2 explican el 97.95% de la variabilidad del sistema. Se observa que las cepas 13G y 20G presentan una afinidad específica y una mayor similitud en su patrón de consumo de fuentes de carbono, con un consumo significativamente mayor en comparación con la cepa *E. amylovora* WT.

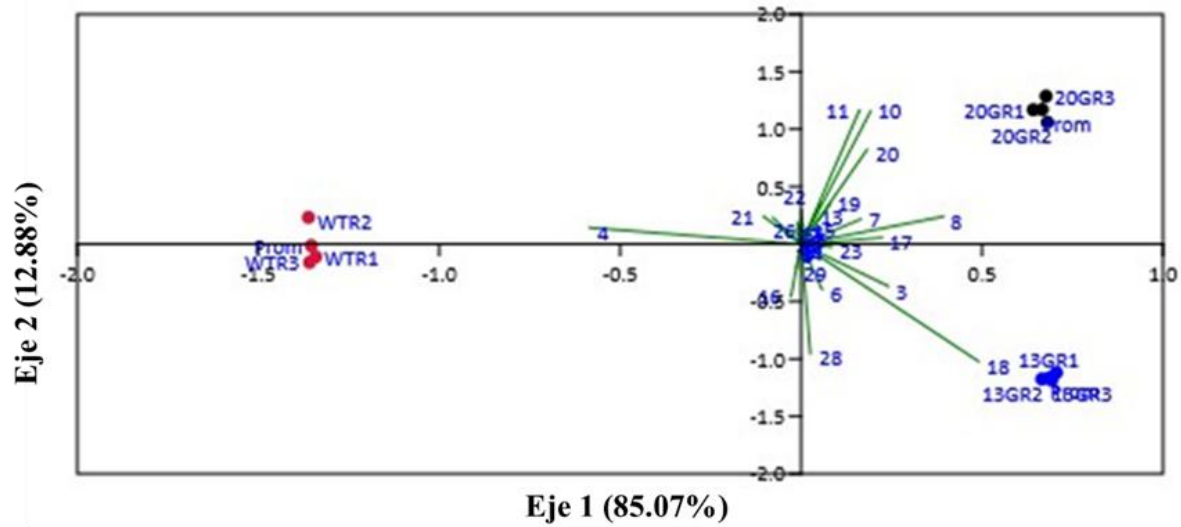


Figura 16. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS).

Para apreciar mejor los cambios en el metabolismo y consumo de las 31 fuentes de carbono, la figura 17 presenta un mapa de calor que muestra el aumento y disminución en el consumo de estas fuentes por parte de las cepas *E. amylovora* WT, 13G y 20G.

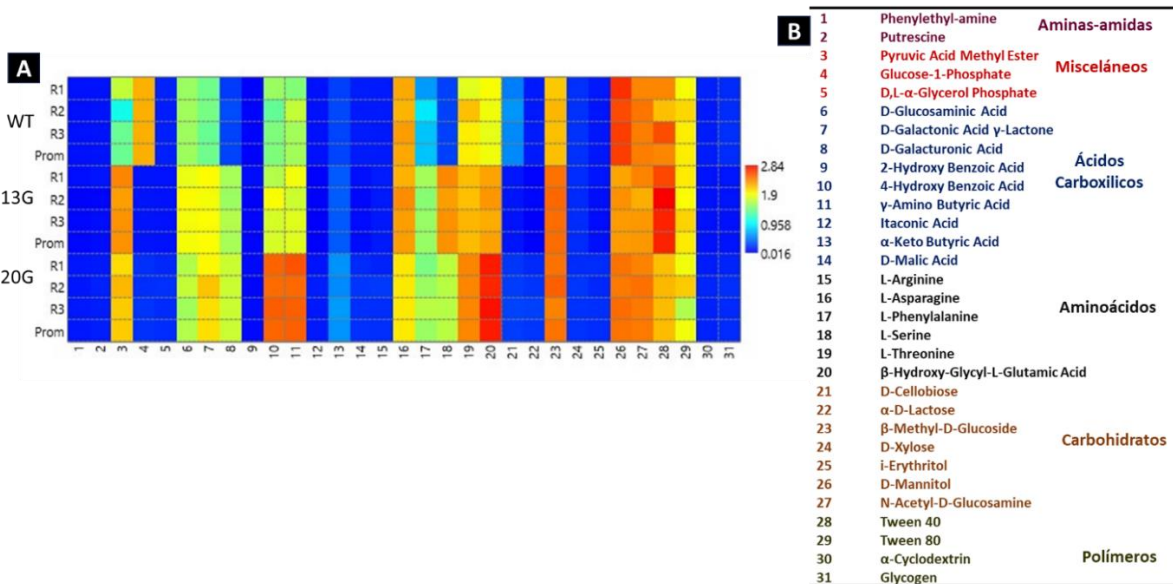


Figura 17. Mapa de calor del consumo de fuentes de carbono.

En la figura 17 se puede apreciar el consumo diferencial de diversas fuentes de carbono por parte de las cepas *E. amylovora* WT, 13G y 20G. Se presenta un mapa de calor (figura 17A) para ilustrar estos cambios, donde los tonos cálidos (rojo) indican un mayor consumo y los tonos fríos (azul) señalan un menor consumo. Además, se proporciona una tabla que enumera las 31 fuentes de carbono utilizadas para evaluar el metabolismo de estas cepas (figura 17B), clasificadas por grupo funcional, mediante la placa fenotípica Biolog EcoPlate. Se observa por ejemplo que, en el grupo de los misceláneos, el consumo de glucosa 1-fosfato (señalado con el número 4) disminuyó en las cepas 13G y 20G después de la exposición a ZnO-NP, como se indica por un cambio de color a tonos más fríos. Sin embargo, las cepas 13G y 20G mostraron un aumento en el consumo de aminoácidos como la serina, que no era una fuente de carbono inicialmente consumida por la cepa *E. amylovora* WT. En general, el análisis reveló un aumento del 35% en el consumo de las fuentes de carbono por parte de las cepas expuestas a la presión selectiva de ZnO-NP, mientras que la cepa WT experimentó una disminución del 10% en el consumo de estas fuentes después de la exposición. En resumen, la presión selectiva de ZnO-NP resultó en un aumento generalizado en el consumo de fuentes de carbono por parte de las cepas estudiadas.

Se ha reportado que las bacterias resistentes a los antibióticos ajustan sus procesos metabólicos para garantizar su supervivencia, lo cual implica un costo considerable (Olivares et al., 2014; Pacheco et al., 2017). Este ajuste metabólico incluye un aumento en la respiración aeróbica y anaeróbica, como lo señalan Pacheco et al. (2017). Además, se ha observado que las bacterias resistentes a los antibióticos pueden verse afectadas por exposiciones prolongadas a metales pesados o esenciales, lo que altera su metabolismo y viabilidad microbiana al afectar la cadena de transporte de electrones (Mitchell et al., 2023). Este proceso de adaptación metabólica es una estrategia comúnmente observada en bacterias resistentes a los antibióticos para contrarrestar las

desventajas asociadas con la resistencia (Mitchell et al., 2023; Olivares et al., 2014; Pacheco et al., 2017)

5.9 Determinación de la sensibilidad colateral

Para determinar la sensibilidad colateral, se evaluaron 216 agentes químicos utilizando 9 placas de microarreglos de fenotipo Biolog PM (PM 11-19). Se examinó la presencia de sensibilidad colateral o resistencia en las cepas *E. amylovora* 13G y 20G en comparación con la cepa *E. amylovora* WT. Cada uno de los 24 agentes antimicrobianos presentes en las placas PM fue analizada individualmente, considerándola como el 100% en cada placa.

En la figura 18 se revelan los 24 agentes antimicrobianos que contiene la placa PM 11; de las cuales las cepas *E. amylovora* 13G y 20G presentaron resistencia frente a un 63% de agentes químicos en comparación con la cepa *E. amylovora* WT. Estos agentes químicos con resistencia, señalados en color rojo, incluyeron una variedad de antibióticos y compuestos químicos con diferentes mecanismos de acción. Antibióticos como: Clortetraciclina, Lomefloxacin, Minociclina, Demeclociclina, Nafcilina, Cefazolina, Enoxacina, Ácido nalidixico, Cloranfenicol, Cefalotina, Kanamicina, Ofloxacin, Capreomicina y otros compuestos como Bleomicina, un compuesto que interfiere con la síntesis de ADN y el Telurito de potasio: un compuesto (sal) utilizado en pruebas de identificación bacteriana.

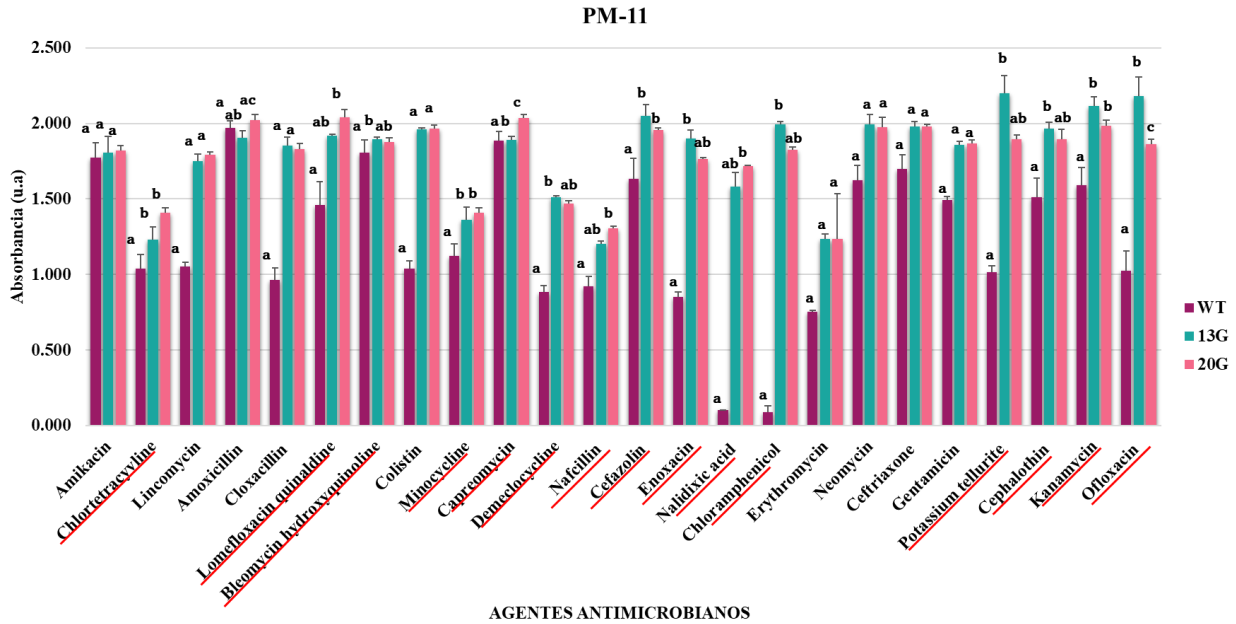


Figura 18. placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 11.

En la figura 19 se ilustra la placa de microarreglo de fenotipo Biolog PM 12 utilizada para evaluar la sensibilidad colateral o resistencia de las cepas *E. amylovora* 13G y/o 20G a los 24 agentes antimicrobianos específicamente dispuestos en esta placa, muestra que estas cepas presentaron sensibilidad colateral al 29% de los agentes antimicrobianos, los cuales están marcados con una línea color verde. Entre estos agentes antimicrobianos se encuentran la Sulfametazina, Sulfadiazina, Sulfatiazol, Sulfametoxazol, Ácido 5-fluoroorótico, Espectinomicina y Sulfametoxazol. Por lo tanto, el 17% de estos agentes pertenecen a los antibióticos de la familia de las sulfonamidas, cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición del ácido fólico, una molécula crucial para la síntesis de ADN, con este resultado se puede destacar que el mecanismo de acción por el cual *E. amylovora* presenta sensibilidad colateral tras la presión selectiva es por la inhibición se síntesis de ADN. Esto sugiere que los antimicrobianos que actúan mediante este

mecanismo pueden ser efectivos para el control y tratamiento de este patógeno resistente a las ZnO-NP.

En contraste, las cepas *E. amylovora* 13G y 20G mostraron resistencia ante el 42% de los agentes antimicrobianos marcados con una línea roja en la figura 19. Dentro de este grupo se incluyen la Tetraciclina, Carbenicilina, Oxacilina, Polimixina B quinaldina, Vancomicina, Novobiocina, 2,4-diamino-6,7-diisopropil pteridina, Cloruro de bencetonio, Tobramicina, L-aspartico beta hidroxamato, y Rifampicina. Cada uno de estos antimicrobianos actúa mediante mecanismos específicos que afectan diferentes procesos vitales en las bacterias, desde la síntesis de proteínas y ADN hasta la integridad de la membrana celular como la sal cuaternaria de Cloruro de bencetonio.

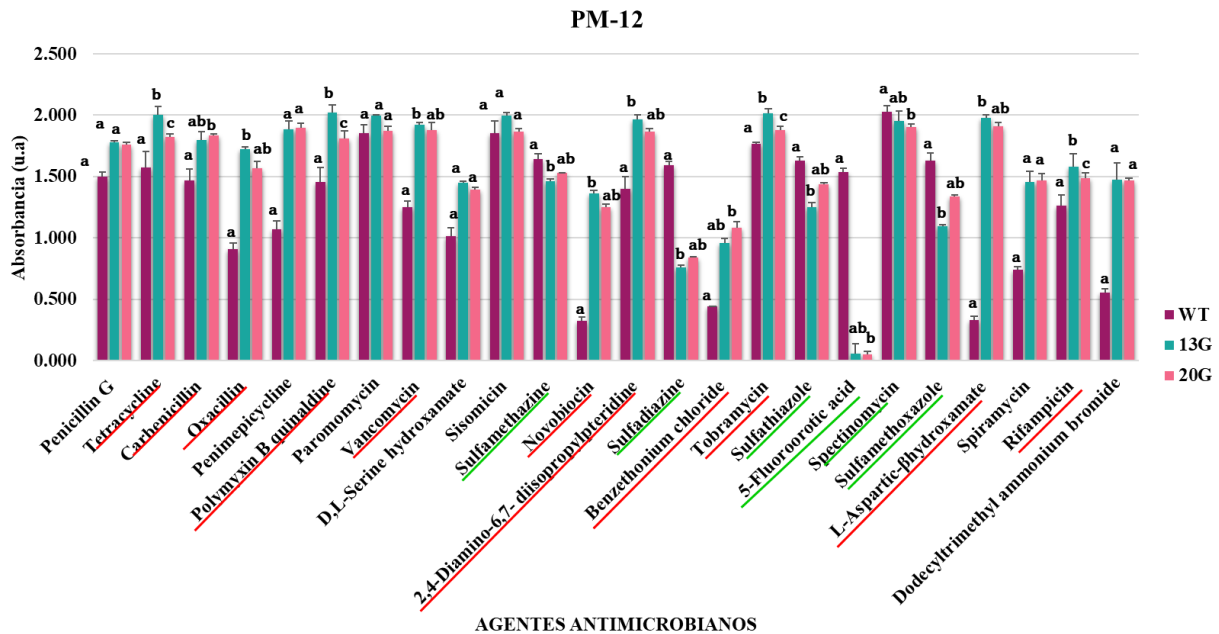


Figura 19. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 12.

En la figura 20 se destacan los 24 agentes antimicrobianos evaluados en la placa de microarreglo de fenotipo PM 13, de los cuales las cepas *E. amylovora* 13G y 20G presentaron resistencia al 75% de estos agentes, señaladas en color rojo: Ampicilina, Cloruro de níquel, Azlocilina, 2,2-Dipiridil, Ácido oxolínico, 6-Mercaptopurina, Doxiciclina, Cefuroxima, 5-Fluorouracil, Citosina-1-beta D-arabinofuranoisidasa, Geneticin (G418), Rojo de rutenio, Glicina, Cloruro de cobalto, Cloruro de cobre, Cloruro de manganeso, Moxalactam y Tilosina. El 51% de estos agentes antimicrobianos su mecanismo de acción distribuye uniformemente en inhibir la síntesis de proteínas, pared celular y la síntesis de ADN.

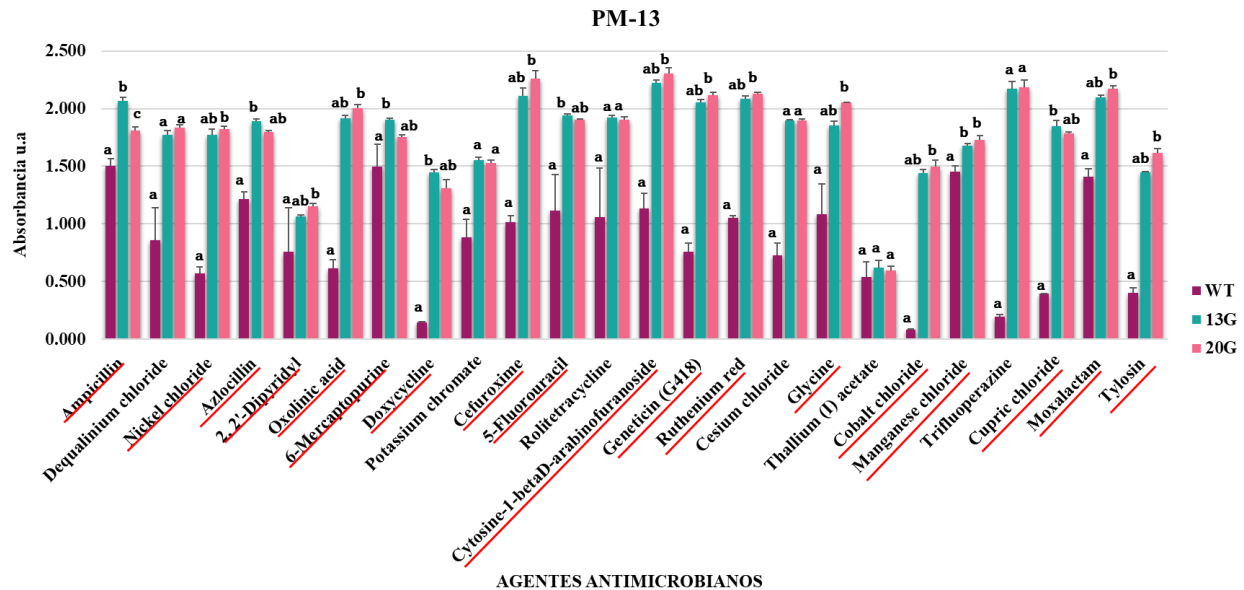


Figura 20. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 13.

La figura 21 presenta la placa de microarreglo de fenotipo PM 14, donde las cepas *E. amylovora* 13G y 20G mostraron diferentes respuestas a los agentes antimicrobianos contenidos en la placa. Se observó que presentaron sensibilidad colateral al 33% de los agentes, incluyendo Ácido bórico, 1-Hidroxipiridina-2-tiona, Nitrofurantoína, Cloranfenicol, Metavanadato sódico, Queleritrina,

Carbencilina y Prometazina. Por otro lado, exhibieron resistencia en ambas cepas al 42% de los agentes, entre los que se encuentran Acraflavina, Sanguinarina, 9-aminoacridina, Iodo acetato, Dicromato de sodio, Nitrato de sodio y EGTA. El 14% de estos agentes antimicrobianos actúan inhibiendo importantes procesos enzimáticos que interrumpen procesos vitales en las bacterias desde su síntesis de ADN, síntesis de proteínas o la estructura de la bacteria.

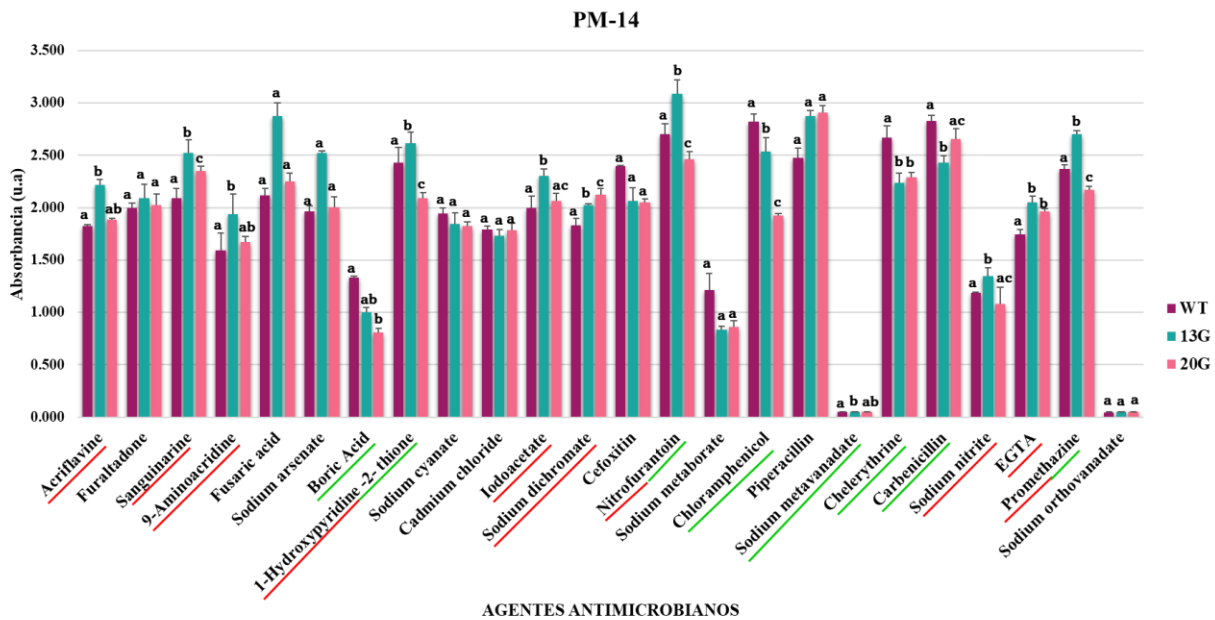


Figura 21. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 14.

La figura 22 hace alusión a la placa de microarreglo de fenotipo PM 15 donde en esta placa se encuentran distribuidos 24 diferentes agentes antimicrobianos de los cuales las cepas *E. amylovora* 13G y 20G presentaron sensibilidad colateral únicamente a Hidroxiurea un medicamento indicado contra el cáncer que actúa sobre la inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa, crucial en la síntesis de ADN (García, 2004). Por el contrario, presentaron resistencia al 67% de los agentes antimicrobianos en esta placa distribuidos tales como: Guanidina, Cefmetazol, Cicloserina, EDTA, 5,7-dicloro-8-hidroxiqualdina, 5,7-dicloro- 8-hidroxiquinolina, Ácido fusídico, Fleomicina,

Ácido nordihidroguaiarético, Alexadina, Metil viologen, Puromicina, CCCP, Azida de sodio, 2-Nitroimidazol y Cloruro de zinc. Es importante destacar que las cepas de *E. amylovora* 13G y 20G mostraron resistencia al cloruro de zinc. Esto sugiere que la exposición al ZnO-NP convierte estas cepas en resistentes a diversos compuestos que contienen zinc, como los antimicrobianos, fertilizantes o pesticidas. Este hallazgo resalta la importancia de considerar la resistencia bacteriana al zinc al utilizar productos que lo contengan. 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).

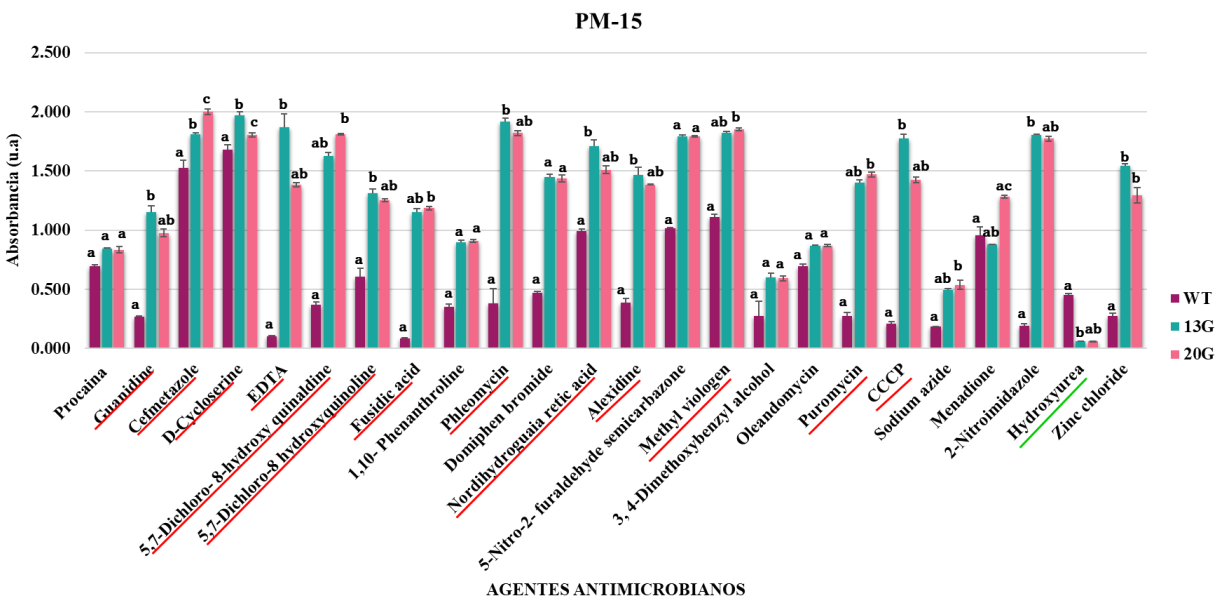


Figura 22. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 15.

La figura 23 ilustra la placa de microarreglo de fenotipo Biolog PM 16, la cual mostró el mayor porcentaje de agentes antimicrobianos con sensibilidad colateral en comparación con otras placas evaluadas. Las cepas *E. amylovora* 13G y 20G exhibieron un 66% de sensibilidad colateral. Entre los antimicrobianos se incluyen: 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-hidroxiato, Cloroxileno y Ácido sórbico. Cabe destacar que estas cepas mostraron sensibilidad colateral al antibiótico estreptomicina, comúnmente utilizado para controlar y tratar la enfermedad causada por *E. amylovora*. Además, la cepa *E. amylovora* WT, como se mencionó con anterioridad es una cepa resistente a estreptomicina debido a un plásmido de resistencia, desarrolló susceptibilidad tras la presión selectiva ejercida por las ZnO-NP, lo que indicó sensibilidad colateral. En contraste, las cepas *E. amylovora* 13G y 20G presentaron resistencia en un 29% de los agentes químicos de esta placa, señalados en rojo, como: Diclofluanida, Sulfato de protamina, Cloruro de cetilpiridinio, 1-Cloro-2,4-dinitrobenzenu e Cidroxamato de glicina.

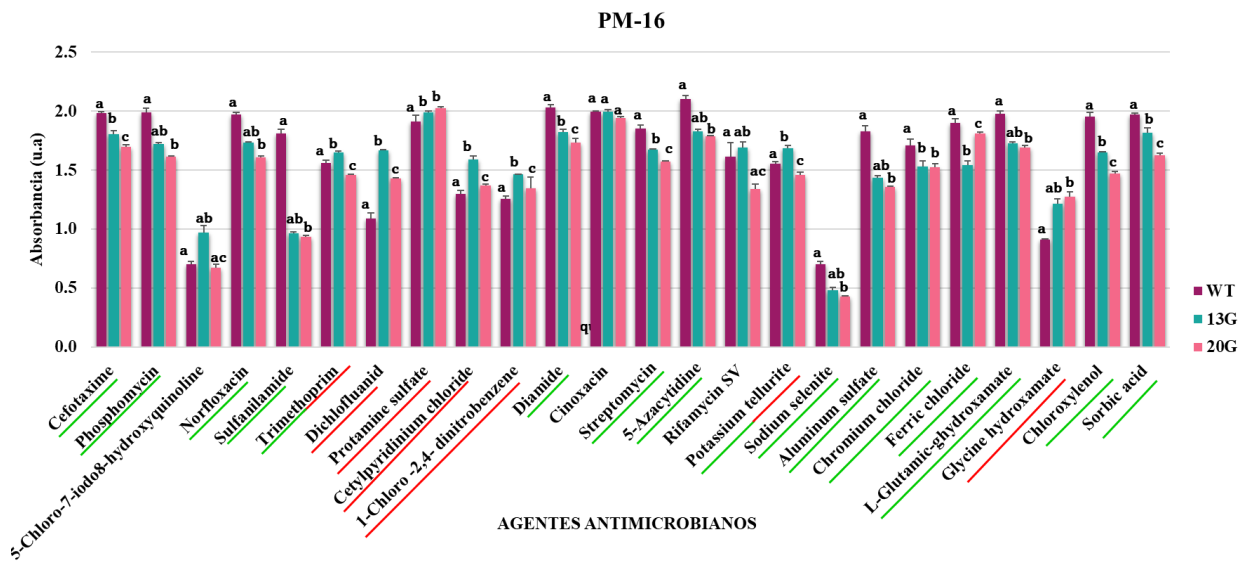


Figura 23. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 16.

En la figura 24 se evidencian los agentes antimicrobianos presentes en la placa de microarreglo de fenotipo PM 17 e indica con una línea color verde los agentes antimicrobianos a los que las cepas *E. amylovora* 13G y 20G presentaron sensibilidad colateral. Se observa que el 17% de estos

presentaron sensibilidad colateral tales como: D-serina, Sulfacloropiridazina, DL-hidroxamato de metionina y Ácido tánico, cada uno difiere en cuanto a su mecanismo de acción sin embargo interfieren con la función celular bacteriana, ya sea a través de la inhibición de procesos metabólicos o la alteración de estructuras celulares clave. 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.

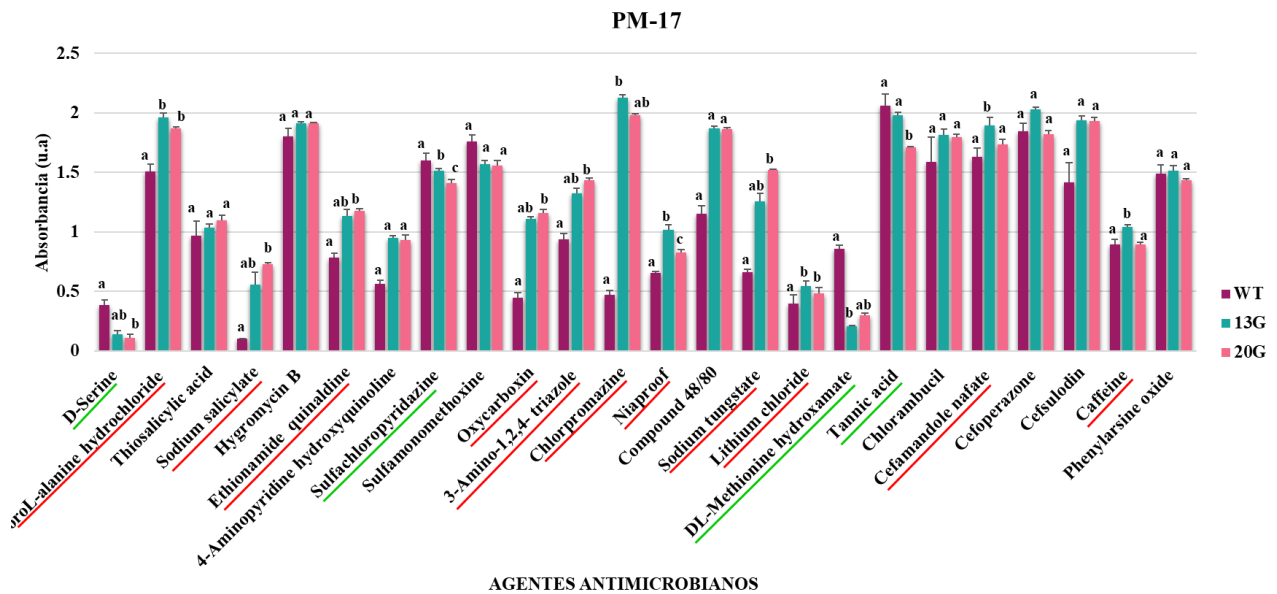


Figura 24. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 17.

En la figura 25 se presentan los 24 agentes antimicrobianos incluidos en la placa de microarreglo de fenotipo PM 18. Las cepas *E. amylovora* 13G y 20G mostraron sensibilidad colateral y resistencia, respectivamente, en comparación con la cepa control. Del total de agentes antimicrobianos evaluados en esta placa, el 42% mostró sensibilidad colateral en ambas cepas, señalados con una línea verde. Estos agentes fueron: Sulfisoxazol, Meta arsenito de sodio,

Tricloruro de antimonio, Aztreonam, Triclosán, Guanazol, Miricetina, 5-Fluoro-5´deoxiuridina, 2-Fenilfenol y Plumbagina. El mecanismo de acción predominante entre estos agentes es la inhibición de la síntesis de ADN, presente en el 10% de los agentes antimicrobianos que mostraron sensibilidad colateral. Así mismo, presentó resistencia al 33% de los agentes antimicrobianos evaluados en esta placa señalados con una línea color rojo los cuales fueron: Tiamfenicol, Ácido pipemídico, Azatioprina quinaldina, Poli-L-lisina hidroxiquinolona, Pentaclorofenol, Bromato de sodio, Metasilicato de sodio, Semicarbazida; del mismo modo el mecanismo de acción que predomina entre estos agentes antimicrobianos es la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) tal es el caso del Ácido pipemídico, Azatioprina quinaldina y Tiamfenicol.

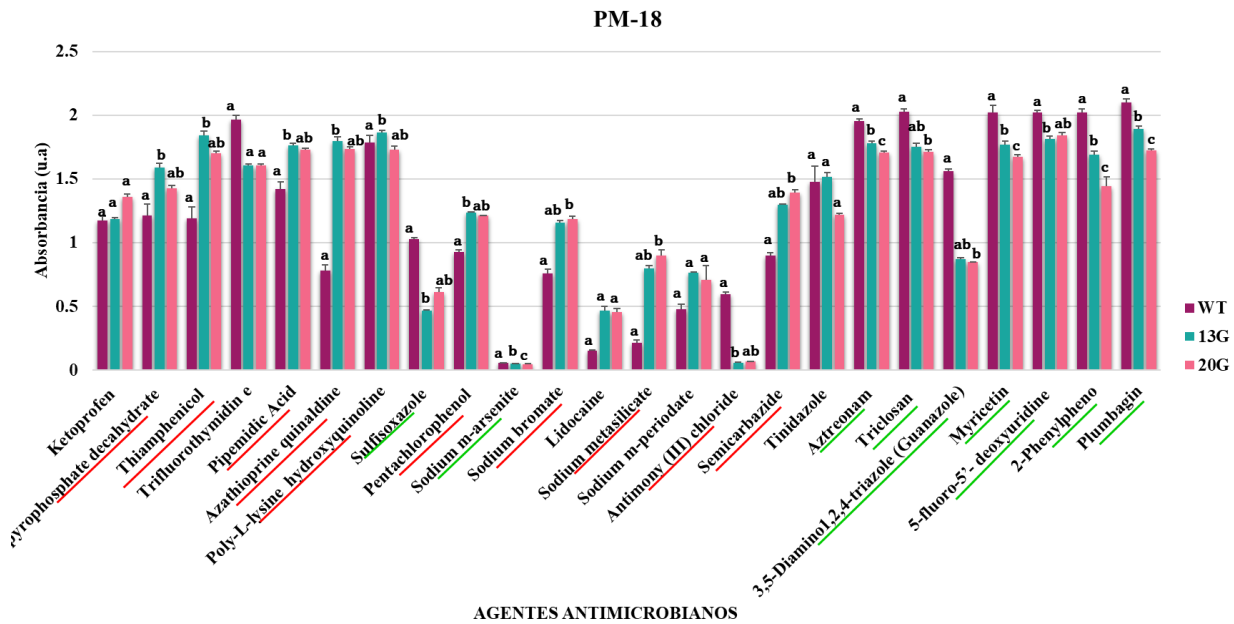


Figura 25. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 18.

Luego, en la figura 26 se indican los agentes antimicrobianos que presentaron susceptibilidad y resistencia de las cepas *E. amylovora* 13G y 20G en comparación con la cepa control, frente a los 24 agentes antimicrobianos evaluados, presentes en esta placa PM 19. Así mismo, El 46% de estos

agentes mostraron sensibilidad colateral, indicada con una línea en color verde de los cuales los agentes que presentaron sensibilidad colateral fueron: Clorohexidina, Umbeliferona, Disulfiram, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), FCCP, Lawsona, Blastidina S, Didroestreptomicina, Hidroxilamina, Cloruro de hexaaminocobalto y Polimixina B, del cual el mecanismo de acción al que es susceptible mayoritariamente es la inhibición de síntesis de proteínas. Por otro lado, presentaron resistencia al 29% de estos agentes antimicrobianos los cuales fueron: Josamicina, Cloruro de metiltrioctilamonio, Harmano, Violeta de iodonitrotetrazolio, Ácido tióctico, Feneticilina y Tioglicerol señalado con una línea en color rojo.

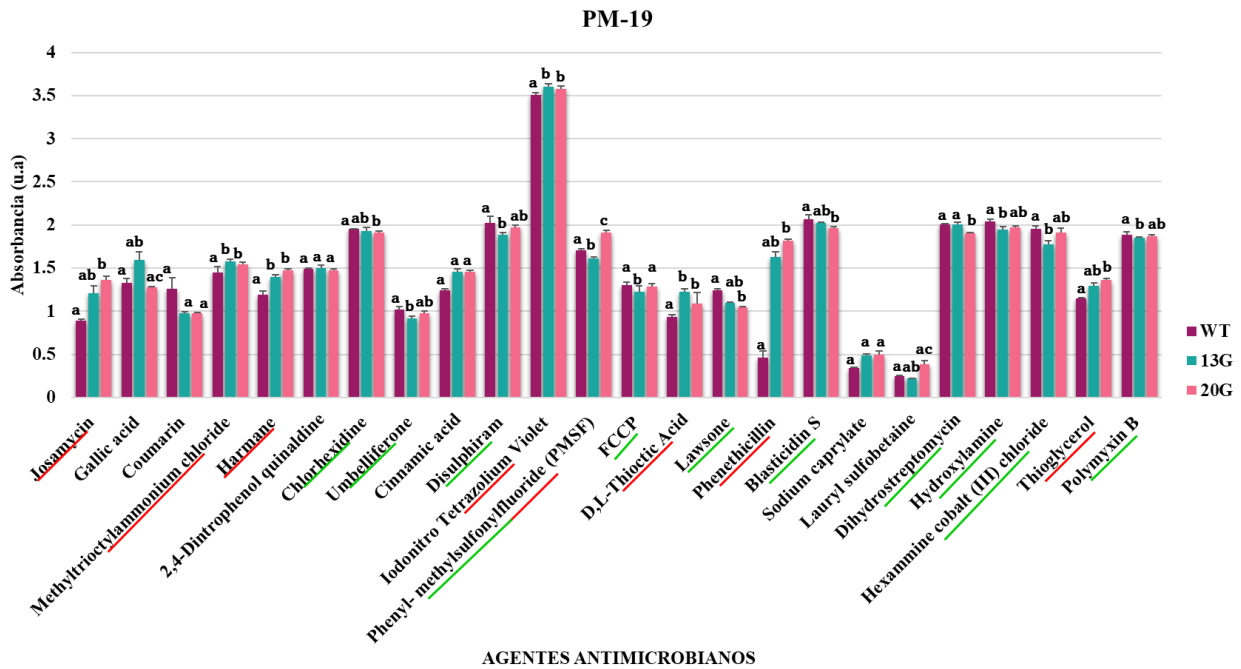


Figura 26. Placa de Microarreglo de fenotipo Biolog PM 19.

Las gráficas en las figuras 20 a la 26 proporcionaron información general sobre la presencia de sensibilidad colateral y resistencia de las cepas *E. amylovora* 13G y 20G, complementadas con el

análisis estadístico. Ahora bien, de manera más detallada e independiente se analizó la sensibilidad colateral y la resistencia de cada una de las cepas expuestas a las ZnO-NP de manera individual.

Por otra parte, en la figura 27 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.

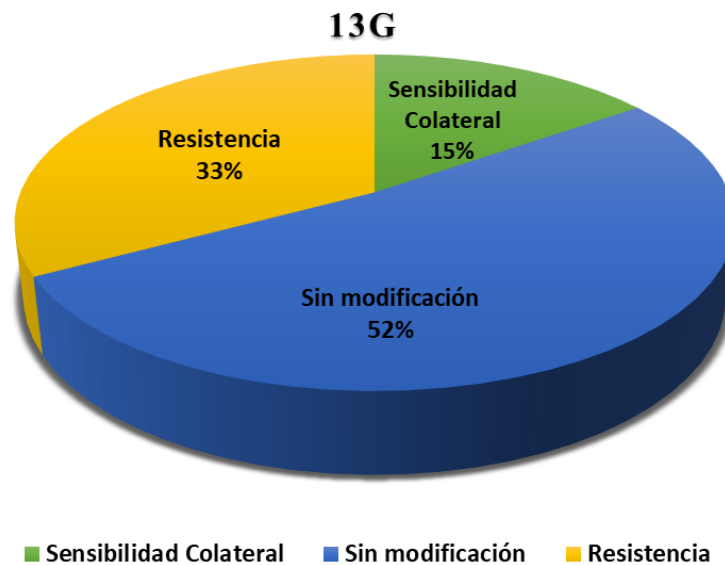


Figura 27. Consolidado de porcentaje de sensibilidad colateral y resistencia de *E. amylovora* 13G.

En la figura 28 se puede observar que de los 216 agentes antimicrobianos 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 antimicrobianos 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.

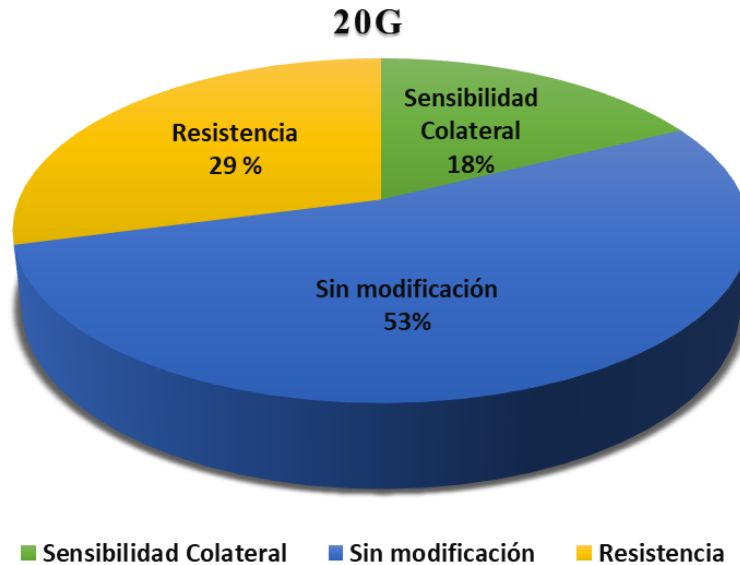


Figura 28. Consolidado de porcentaje de sensibilidad colateral y resistencia de *E. amylovora* 20G.

Así mismo, en las figuras 29 y 30 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.

En la figura 29 se pueden identificar dos grupos distintivos que demarcan los elementos independientes y aquellos que comparten similitud entre los agentes antimicrobianos que presentaron resistencia en *E. amylovora* 13G y 20G. Además, describe el mecanismo de acción predominante y los agentes antimicrobianos que exhibieron resistencia común en ambas cepas.

El primer conjunto correspondiente a la cepa *E. amylovora* 13G (en color azul) indica que 43 agentes antimicrobianos, es decir, el 41% del total únicamente presentaron resistencia en la cepa 13G y el 28% de estos 43 elementos interfieren en la síntesis de ADN. Así mismo, el segundo conjunto, que corresponde a la cepa *E. amylovora* 20G (en color rosa) indica que 35 elementos correspondiente al 33% del total, 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. No obstante, en conjunto en común, 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 antimicrobianos en común actúan en la inhibición de síntesis de proteínas.

Los agentes antimicrobianos 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.

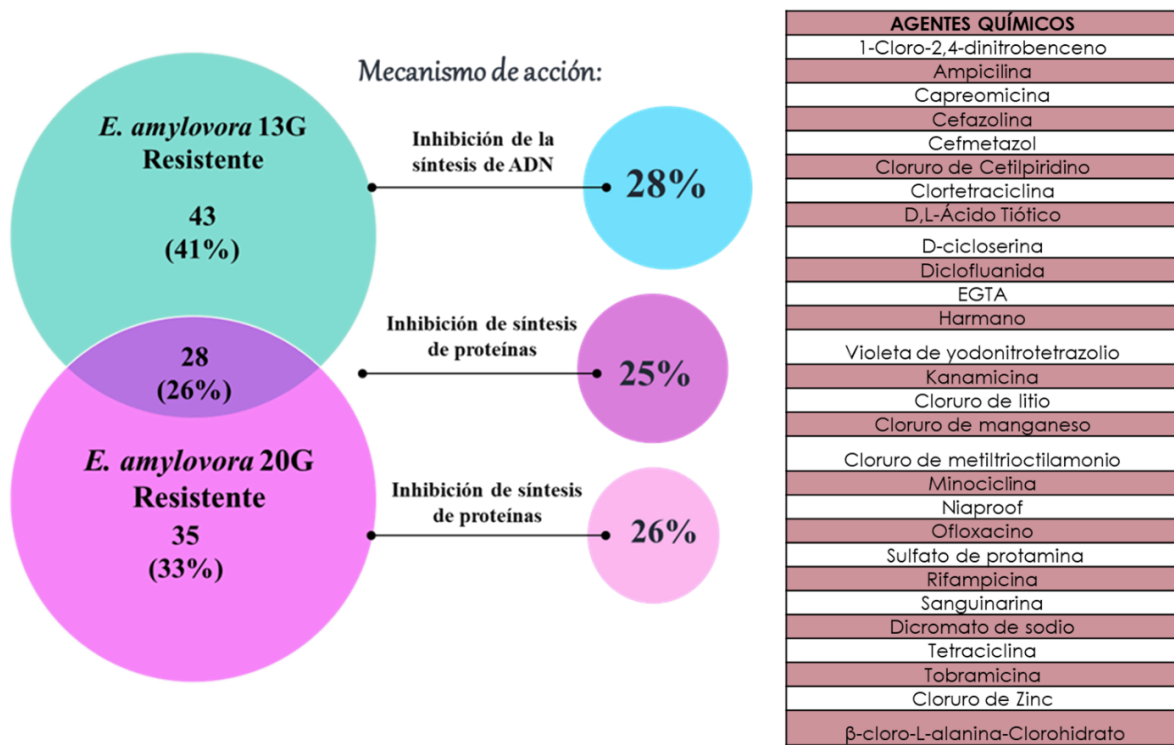


Figura 29. Diagrama de conjuntos de resistencia.

En la figura 30 se presentan dos conjuntos que distinguen los elementos independientes y los que comparten similitudes entre los agentes antimicrobianos que mostraron sensibilidad colateral en *E. amylovora* 13G y 20G. Además, describe el mecanismo de acción predominante entre estos agentes y los antimicrobianos que exhibieron sensibilidad colateral común en ambas cepas.

El primer conjunto que se muestra en la figura 30, corresponde a la cepa *E. amylovora* 13G (en color azul) el cual señala que 18 elementos, es decir, el 32% del total 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% del total, únicamente presentaron sensibilidad colateral en la cepa 20G y el 35% de estos 23 elementos

interfieren 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.

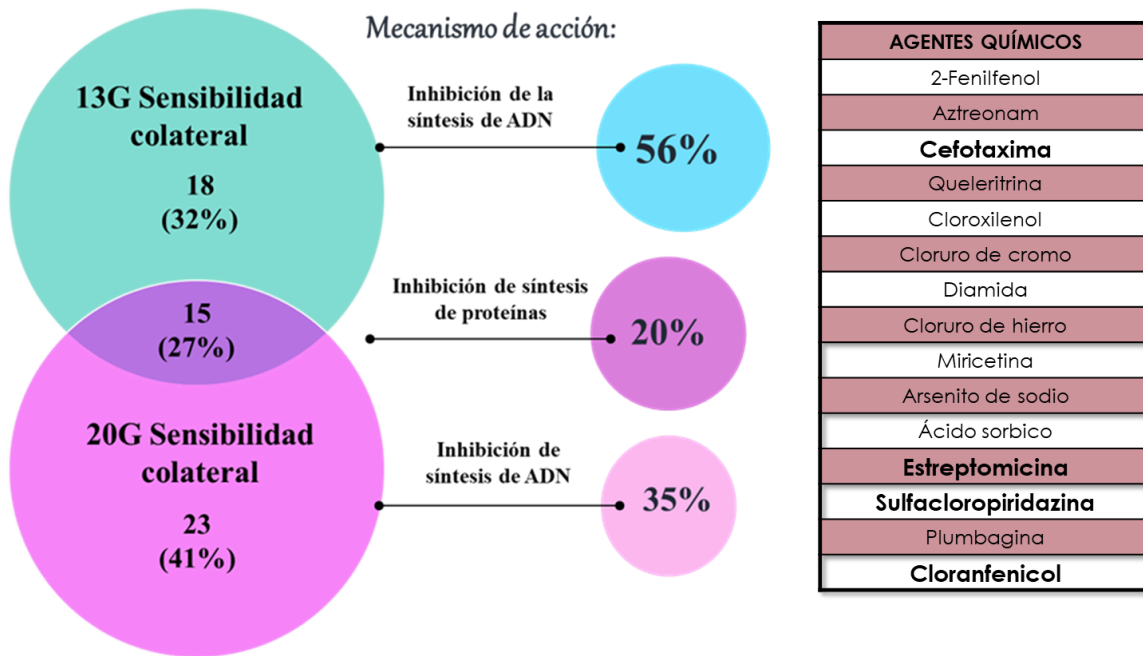


Figura 30. Diagrama de conjuntos de sensibilidad colateral.

En los resultados presentados en las figuras 29 y 30, los diagramas de conjuntos revelan que la bacteria *E. amylovora* se compensó en adquirir resistencia a la mayoría de los agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas. Sin embargo, esta adaptación tuvo un costo fisiológico para adquirir esta ventaja adaptativa, dando origen a la descompensación, resultando en una mayor susceptibilidad a los agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de ADN. La exposición a las ZnO-NP generó una presión selectiva que condujo a esta resistencia y susceptibilidad, evidenciando sensibilidad colateral.

En resumen *E. amylovora*; tras la exposición a ZnO-NP aumentó la resistencia a agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas, pero también incrementó la sensibilidad a agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de ADN, particularmente a las sulfonamidas, que bloquean la producción de ácido fólico, crucial para la síntesis de nucleótidos. Un patrón similar se ha observado en *E. coli*, en el que la resistencia a aminoglucósidos (que inhiben la síntesis de proteínas) resultó en una mayor susceptibilidad a β -lactámicos (que inhiben la síntesis de la pared celular) (Yekani et al., 2023). Esto significa que, al adquirir resistencia a los aminoglucósidos, la bacteria se vuelve más susceptible a los β -lactámicos. La sensibilidad colateral a menudo se manifiesta entre dos agentes con diferentes mecanismos inhibidores microbianos. En un estudio similar, se expuso *E. coli* de manera continua a una concentración de 0.02 mg/L de nanopartículas de sulfuro de plata, lo que generó cambios tanto fenotípicos como genotípicos. Estos cambios condujeron al desarrollo de tolerancia y resistencia a varios antibióticos por parte de la bacteria (Kumari & Kamat, 2023; Li et al., 2019). Estos cambios indujeron una disminución de la sensibilidad de antibióticos como la penicilina, kanamicina, ciprofloxacina y gentamicina, debido a la sobreexpresión de genes de porinas de membrana y genes de eflujo de MDR, promoviendo así la evolución patogénica adaptativa (Kumari & Kamat, 2023; Raza et al., 2021). No obstante, tanto en el caso de *E. amylovora* y *E. coli* se aprecia que la exposición a nanomateriales, como las ZnO-NP en *E. amylovora* y las nanopartículas de sulfuro de plata en *E. coli*, puede inducir resistencia a través de mecanismos similares a los observados con los antibióticos.

Según un estudio in vitro, el 74% de las cepas resistentes a ciertos antibióticos desarrolladas en laboratorio han presentado sensibilidad colateral a uno o más agentes antimicrobianos (Yekani et al., 2023). Del mismo modo, en un estudio sobre *E. coli*, se evaluó la susceptibilidad a 24 antimicrobianos utilizando concentraciones sub-inhedoras durante un periodo de 240 a 384

generaciones. Las poblaciones bacterianas alcanzaron niveles de resistencia que superaban 20 veces el valor inicial de la CMI. Posteriormente, se analizaron los cambios en la susceptibilidad a otros antimicrobianos no utilizados previamente. Se encontró que el 35% de los antimicrobianos investigados presentaron susceptibilidad cruzada. Además, el 44% de los antimicrobianos evaluados eran aminoglucósidos, los cuales incrementaron la susceptibilidad de los antimicrobianos que inhiben la síntesis de ADN, la síntesis de la pared celular y la síntesis de proteínas. En comparación con las cepas control, se observaron disminuciones de la CMI de dos a diez veces (Holguín et al., 2017; Lázár et al., 2013).

La sensibilidad colateral se ha identificado en diversos patógenos de relevancia clínica y frente a una amplia variedad de agentes antimicrobianos (Yekani et al., 2023), Por ejemplo, en cepas como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. pneumoniae* y *S. aureus* (Aulin et al., 2021). En contraste, este tipo de resistencia adaptativa permite a los microorganismos reaccionar más rápido al estrés causado por antimicrobianos. De manera similar, según García-Quintanilla et al. (2015) informaron que *A. baumannii* desarrolló resistencia al antibiótico colistina mediante la pérdida completa de lipopolisacárido (LPS), causada por mutaciones. Esta pérdida de LPS provoca sensibilidad colateral a los antibióticos azitromicina, rifampicina y vancomicina y un moderado aumento en la susceptibilidad a amikacina, ceftazidima, imipenem, cefepima y meropenem, siendo el mecanismo de acción predominante de estos antibióticos la inhibición de la síntesis de ADN. Según un estudio reportado por Hernando & López, et al. (2023) identificaron un patrón consistente de sensibilidad colateral en aislados clínicos de *P. aeruginosa* durante su evolución a corto plazo en presencia de ciprofloxacina mediada por la adquisición de diferentes mutaciones que conferían resistencia a la ciprofloxacina. El uso de ciprofloxacina resultó en una sensibilidad colateral significativa frente a los antibióticos aztreonam y tobramicina. Así mismo, según Genova

et al. (2023) identificaron un patrón robusto de sensibilidad colateral a fosfomicina de *P. aeruginosa* que surgió en diferentes clones resistentes a tobramicina. Luego de evaluar 23 cepas diferentes de *P. aeruginosa* concluyeron que la resistencia a la tobramicina produce sensibilidad colateral a la fosfomicina únicamente en 9 de los aislados de *P. aeruginosa* evaluados siendo el cambio en la concentración mínima inhibitoria el principal factor que contribuyó a la sensibilidad colateral a la fosfomicina. Por otro lado, según Nguyen et al. (2022) reportaron que, en la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas al utilizar extractos de plantas con propiedades antimicrobianas, luego de 30 generaciones de *S. aureus* en crecimiento bajo concentraciones subletales de extractos de plantas o antibióticos, la mayoría de las cepas resultantes obtenidas de la adaptación a extractos de plantas fueron colateralmente sensibles a los antibióticos. Por el contrario, las cepas adaptadas a los antibióticos mostraron resistencia cruzada tanto a los antibióticos como a los extractos. Estos hallazgos proporcionaron evidencia del desarrollo de resistencia de *S. aureus* a los extractos de plantas antimicrobianos. Es relevante ya que es la primera vez que se observa sensibilidad colateral a los antibióticos adaptada a compuestos naturales, lo cual es una alternativa para hacer frente a la resistencia a los antibióticos. La relación entre las descripciones anteriores entre *E. amylovora* y otros patógenos clínicamente relevantes, se manifiesta en los patrones de resistencia y sensibilidad colateral que desarrollan al ser expuestos a antibióticos y nanomateriales. Estas bacterias manifiestan adaptaciones específicas bajo la presión selectiva, lo que puede resultar en una compensación que aumenta la eficacia de otros antimicrobianos. Conocer esto sumamente importante para desarrollar estrategias terapéuticas como un plan de rotación de diferentes antimicrobianos que sean más efectivos y evitar la resistencia a corto plazo.

Por otro lado, se ha reportado evidencia de que existe relación entre la resistencia a los nanomateriales, metales pesados y esenciales con la adquisición de 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 han revelado que los microbios pueden evolucionar y adaptarse a la toxicidad de los nanomateriales, como las nanopartículas de manera similar a como lo hacen con los antibióticos. La exposición prolongada a dosis subletales de nanopartículas puede contribuir al desarrollo de bacterias resistentes, utilizando mecanismos similares a los que emplean para evadir la toxicidad de los antibióticos (Eggers et al., 2021; Mitchell et al., 2023). En contraste, los microorganismos utilizan sistemas de eflujo para eliminar los metales de la célula. Algunos de estos metales son tóxicos intrínsecamente, sin embargo, algunos otros metales que son esenciales para el desarrollo de los microorganismos se vuelven tóxicos porque se encuentran expuestos en ambientes en concentraciones excesivas. A través de estos sistemas de eflujo bombean los iones tóxicos (como lo puede ser el zinc) que han entrado hacia el interior de la célula mediante bombas denominadas ATPasa o bombas quimiosmóticas. 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 *P. 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). Otro de los principales mecanismos de defensa que favorece la supervivencia bacteriana es la formación de biopelícula;

estas estructuras, junto con las sustancias poliméricas extracelulares que producen, actúan como una barrera protectora frente a concentraciones tóxicas de metales, ofreciendo una protección externa eficaz contra estos agentes (Mitchell et al., 2023). Comprender los mecanismos de resistencia a todo tipo de agentes antimicrobianos es fundamental para diseñar enfoques prácticos en el tratamiento y control de patógenos resistentes (Yekani et al., 2023). En resumen, la terapia con múltiples antimicrobianos de manera sucesiva con ciclos entre agentes antimicrobianos con sensibilidad colateral puede disminuir eficazmente la aparición de resistencia. Una cepa resistente en desarrollo se puede tratar cambiando de agentes que son eficaces debido a la sensibilidad colateral. Este procedimiento podría aplicarse secuencialmente en una administración seriada de múltiples fármacos para mantener la susceptibilidad de las bacterias a los fármacos (Yekani et al., 2023).

6 CONCLUSIONES

- 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 las cepas 13G y 20G presentan sensibilidad colateral a los agentes antimicrobianos con mecanismo de acción de síntesis de ADN (sulfonamidas y estreptomicina).
- La cepa 13G presentó resistencia a los antimicrobianos con mecanismo de acción de síntesis de ADN y la cepa 20G presentó resistencia a los antimicrobianos con mecanismo de acción a la síntesis de proteínas (Cloruro de zinc)
- 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.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el análisis de transcriptoma y del genoma de las cepas 13G y 20G.
- 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.
- Así mismo, se sugiere determinar si las cepas de *E. amylovora* 13G y 20G producen biopelículas y bombas de eflujo, y compararlas con respecto a la cepa *E. amylovora* WT. Así se podrá determinar si, debido a la presión selectiva ejercida por las nanopartículas de óxido de zinc, se produjeron estos cambios.

BIBLIOGRAFIA

- 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>
- Aulin, L. B. S., Liakopoulos, A., van der Graaf, P. H., Rozen, D. E., & van Hasselt, J. G. C. (2021). Design principles of collateral sensitivity-based dosing strategies. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25927-3>
- 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>
- Callaghan, C. K., Si, F., & Banerjee, S. (2022). Effects of antibiotics on bacterial cell morphology and their physiological origins. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 50, Issue 5, pp. 1269–1279). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20210894>
- Camacho, S. L. A. (2023). *Resistencia Bacteriana una crisis actual*.
- Chavan, S., & Nandanatham, V. (2020). Shifts in metabolic patterns of soil bacterial communities on exposure to metal engineered nanomaterials. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *189*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110012>
- 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*.
- Corral, L. A., Morales, G. Y. E., Pazos, R. L. A., Ramírez, V. A., Martínez, Rebeca Débora, & Muñoz, R. J. (2012). Quantification of cultivable bacteria by the “Massive Stamping Drop Plate” method. In *72570. joymerre@yahoo.com.mx Rev. Colomb. Biotecnol* (Issue 2).
- Costa, P., Gomes, A. T. P. C., Braz, M., Pereira, C., & Almeida, A. (2021). Application of the resazurin cell viability assay to monitor *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* inactivation mediated by phages. *Antibiotics*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080974>

- Cuenca, D. (2021). *Nanopartículas Antimicrobianas en Odontología: Estado del arte*.
- Dagher, F., Olisheska, S., Pillion, 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 Jesús Alba, J. R., Luis Ortega, J. S., Karina Espino, P. S., Luna, J. H., Estela García, B. P., Urtiz, N. E., Cervantes, M. F., Ruíz, E. B., Ramón Hernández, J. S., Ruíz, P. F., Martínez, A. R., & Dra en Aurora Martínez Romero, C. C. (2012). Asociación entre la evolución clínica de pacientes con tuberculosis y la resistencia al tratamiento de los aislados de *Mycobacterium* Association between the clinical course of patients with tuberculosis and the treatment resistance of isolates of *Mycobacterium*. In *Rev Mex Cienc Farm* (Vol. 43, Issue 1).
- de León Door, A. P., Romo Chacón, A., & Acosta Muñiz, 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>

- Edith Ramos Cortez. (2018). *ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO E IN VIVO DE NANOPARTÍCULAS DE Ag, CuO Y ZnO CONTRA BACTERIAS FITOPATÓGENAS*.
- Eggers, S., Safdar, N., Kates, A., Sethi, A. K., Peppard, P. E., Kanarek, M. S., & Malecki, K. M. C. (2021). Urinary lead level and colonization by antibiotic resistant bacteria: Evidence from a population-based study. *Environmental Epidemiology*, 5(6), E175. <https://doi.org/10.1097/EE9.0000000000000175>
- 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; del busto Natalia. (2004). *Síndrome de lisis tumoral secundario a hidroxurea como tratamiento de leucemia*.
- 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*.
- García-Quintanilla, M., Carretero-Ledesma, M., Moreno-Martínez, P., Martín-Peña, R., Pachón, J., & McConnell, M. J. (2015). Lipopolysaccharide loss produces partial colistin dependence and collateral sensitivity to azithromycin, rifampicin and vancomycin in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(6), 696–702. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.017>
- Genova, R., Laborda, P., Cuesta, T., Martínez, J. L., & Sanz-García, F. (2023). Collateral Sensitivity to Fosfomycin of Tobramycin-Resistant Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* Is Contingent on Bacterial Genomic Background. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/ijms24086892>
- 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., Ramon Valverde, J., Luis Martínez, 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>
- Hernando-Amado, S., López-Causapé, C., Laborda, P., Sanz-García, F., Oliver, A., & Martínez, J. L. (2023). Rapid Phenotypic Convergence towards Collateral Sensitivity in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Presenting Different Genomic Backgrounds. *Microbiology Spectrum*, *11*(1). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02276-22>
- Hillman, T. (2022). Reducing bacterial antibiotic resistance by targeting bacterial metabolic pathways and disrupting RND efflux pump activity ARTICLE INFO Reducir la resistencia a los antibióticos bacterianos al dirigirse a las vías metabólicas bacterianas e interrumpir la actividad de la bomba de salida de RND. *IBEROAMERICAN JOURNAL OF MEDICINE*, *01*(1), 60–74. <https://doi.org/10.53986/ibjm.2022.0008>
- 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
- Holguin, H., Amarilles, P., & Ospina, W. (2017). *Interacciones evolutivas como 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->
- Lázár, V., Pal Singh, G., Spohn, R., Nagy, I., Horváth, B., Hrtyan, M., Busa-Fekete, R., Bogos, B., Méhi, O., Csörgo, B., Pósfai, G., Fekete, G., Szappanos, B., Kégl, B., Papp, B., & Pál, C. (2013). Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. *Molecular Systems Biology*, *9*. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.57>
- Li, M., Li, J., Sun, J., He, Y., Chen, P., & Zhang, C. (2019). Is sulfidation a true detoxification process for silver nanoparticles?: From the perspective of chronic exposure. *Environmental Science: Nano*, *6*(12), 3611–3624. <https://doi.org/10.1039/c9en00989b>

- Ma, Y., & Chua, S. L. (2022). No collateral antibiotic sensitivity by alternating antibiotic pairs. In *The Lancet Microbe* (Vol. 3, Issue 1, p. e7). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00270-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00270-6)
- Macůrková, A., Maryška, L., Jindřichová, B., Drobníková, T., Vrchotová, B., Pospíchalová, R., Záruba, K., Hubáček, T., Siegel, J., Burketová, L., Lovecká, P., & Valentová, O. (2021). Effect of round-shaped silver nanoparticles on the genetic and functional diversity of soil microbial community in soil and “soil-plant” systems. *Applied Soil Ecology*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104165>
- Mann, A., Nehra, K., Rana, J. S., & Dahiya, T. (2021a). 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>
- Mann, A., Nehra, K., Rana, J. S., & Dahiya, T. (2021b). 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>
- Németh, I., Molnár, S., Vaszita, E., & Molnár, M. (2021). The biologic ecoplate™ technique for assessing the effect of metal oxide nanoparticles on freshwater microbial communities. *Nanomaterials*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/nano11071777>
- Ojkic, N., Serbanescu, D., & Banerjee, S. (2022). Antibiotic Resistance via Bacterial Cell Shape-Shifting. *MBio*, 13(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.00659-22>
- 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>
- OMS. (2015, August 4). *OPS/OMS | Resistencia a los antimicrobianos*. OMS. https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11129:amr-antimicrobial-resistance-intro&Itemid=41534&lang=es#gsc.tab=0
- 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>
- 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>
- Prada, P. C., Holguín, M. A. V., González, B. A. F., & Vives, F. M. J. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. In *Universitas Scientiarum* (Vol. 20, Issue 1, pp. 43–60). Pontificia Universidad Javeriana. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.faci>
- Prieto, J. P., & Zamorano, A. C. (2002). *INFECCIÓN RESPIRATORIA PEDIÁTRICA: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, Resistencia antimicrobiana. ¿Efecto de clase? Estratificación por clases* (Vol. 56, Issue 1).
- Ramírez, L. M. R., Ruiz, C. J. A., Medina, G. G., Jacobo, C. J. L., Parra, Q. R. Á., Ávila, M. M. R., & Amado, Á. J. P. (2021). *PERSPECTIVAS DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE MANZANO EN CHIHUAHUA, ANTE EL CAMBIO CLIMÁTICO* PERSPECTIVES ON THE APPLE PRODUCTION SYSTEM IN CHIHUAHUA FACING CLIMATE CHANGE*.
- Raza, S., Matuła, K., Karoń, S., & Paczesny, J. (2021a). 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>
- Raza, S., Matuła, K., Karoń, S., & Paczesny, J. (2021b). 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. (2023a). Zinc effects on bacteria: insights from *Escherichia coli* by multi-omics approach. *MSystems*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/msystems.00733-23>

- 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. (2023b). 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 estreptomycin en arboles de manzano cv. “Golden Delicious.” *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29, 119–132.
- Romo, C. 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
- SADER. (2021, September 26). *stima Agricultura crecimiento de dos dígitos en producción nacional de manzanas al cierre del ciclo agrícola 2021*.
- SADER. (26 de Septiembre de 2021). *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*. Obtenido de Gobierno de México : <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/estima-agricultura-crecimiento-de-dos-digitos-en-produccion-nacional-de-manzanas-al-cierre-del-ciclo-agricola2021#:~:text=La%20producci%C3%B3n%20de%20manzana%20en,cierre%20del%20ciclo%20agr%C3%ADcola%202021>.
- 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>
- Salinas-Pérez, F. del C., Garrido-Hernández, A., Gómez-Alonso, I., Ruiz-Palma, M. del S., García-Domínguez, G., & Chávez-Guitrón, L. E. (2023). Pruebas toxicológicas para la evaluación de nanomateriales: Artículo de revisión. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías Del ICBI*, 11(Especial5), 88–101. <https://doi.org/10.29057/icbi.v11iespecial5.11825>
- 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>
- Serra, V. M. Á. (2017). *CIENCIAS EPIDEMIOLOGICAS Y SALUBRISTAS La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana Microbial resistance in the current context and the importance of knowledge and application in antimicrobial policy*. <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2013>
- Shea, A., Wolcott Mark, Daefler, 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
- T.-P. Nguyen, N. -A. V. T. X. -N. N. D. T. N. N. L. M. B. (2022). *Antimicrobial resistance tendency and collateral sensitivity of Staphylococcus aureus adapted to antibiotics or extracts of medicinal plants grown in Viet Nam*. 616–622.
- Troncoso, C., Mónica Pavez., 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>

- Yekani, M., Azargun, R., Sharifi, S., Nabizadeh, E., Nahand, J. S., Ansari, N. K., Memar, M. Y., & Soki, J. (2023). Collateral sensitivity: An evolutionary trade-off between antibiotic resistance mechanisms, attractive for dealing with drug-resistance crisis. In *Health Science Reports* (Vol. 6, Issue 7). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/hsr2.1418>
- 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>