

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por la SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Evaluación del efecto inhibitorio de nanopartículas metálicas,
sintetizadas por una vía verde utilizando a *Ganoderma sessile*,
sobre *Campylobacter jejuni***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Daniel Rivera Mendoza

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Daniel Rivera Mendoza

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Codirectora de tesis

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Codirector de tesis

Dra. Beatriz Quiñones

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo

Dr. Aldo Moreno Ulloa



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Daniel Rivera Mendoza** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Evaluación del efecto inhibitorio de nanopartículas metálicas en *Campylobacter jejuni* sintetizadas por una vía verde utilizando a *Ganoderma sessile*

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Codirectora de tesis

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Codirector de tesis

Este estudio demuestra el potencial de las nanopartículas metálicas biosintetizadas a partir del hongo *Ganoderma sessile* como agentes antimicrobianos efectivos contra *Campylobacter jejuni*, así como contra otras especies relacionadas como *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari*. Las nanopartículas de plata (AgNPs), con un tamaño modal de 5 nm, mostraron una acción inhibitoria rápida, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 6.7 µg/mL, posiblemente debido a su interacción con la membrana bacteriana y la generación de estrés oxidativo en *C. jejuni*, mientras que las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), con tamaño modal de 3 nm, exhibieron un efecto más lento, con una CMI de 10 µg/mL, atribuido a la capacidad de las bacterias para incorporar cobre en sus vías metabólicas. Estas CMI fueron notablemente bajas en comparación con estudios que emplean métodos químicos, destacando la eficacia de este enfoque verde. Además, las nanopartículas demostraron ser efectivas contra cepas de *Campylobacter* con perfiles de multirresistencia a antibióticos, incluyendo *C. coli* 2228, la cepa más resistente evaluada. El análisis del modo de acción reveló que las AgNPs actúan principalmente a través de la desestabilización de la membrana y la producción de especies reactivas de oxígeno, mientras que las CuONPs ejercen su efecto de manera más gradual, coincidiendo con estudios previos que resaltan la importancia del estrés oxidativo en la actividad antimicrobiana. Por otro lado, la exploración de la composición metabólica del extracto acuoso intracelular de *G. sessile* identificó acilos grasos y prenoles lípidos como los grupos más representativos, aunque su actividad inhibitoria moderada (40% en su concentración máxima) no mostró diferencias significativas contra la cepa *C. coli* 2228, sugiriendo que las moléculas responsables podrían haber sido afectadas por las condiciones experimentales. Sin embargo, el análisis de Incrustación de Vecinos Estocásticos con Distribución t (t-SNE) identificó al menos cuatro moléculas con estructuras similares a compuestos reportados por aprobado por agencias reguladoras de alimentos, como la FDA, con actividad antibacteriana, lo que abre nuevas vías de investigación. En resumen, este trabajo subraya el potencial de las nanopartículas biosintetizadas como una alternativa sostenible y efectiva para combatir patógenos provenientes de los alimentos multirresistentes a antibióticos, reduciendo la dependencia de métodos químicos tradicionales. Futuros estudios deberán profundizar en la identificación de los metabolitos específicos responsables de la actividad antibacteriana y optimizar las condiciones de síntesis para maximizar su eficacia, consolidando este enfoque como una estrategia prometedora en la lucha contra infecciones transmitidas por alimentos.

Palabras clave: Nanopartículas, *Campylobacter*, Resistencia bacteriana, *Ganoderma*, Metaboloma

Abstract of the thesis presented by **Daniel Rivera Mendoza** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life sciences.

Evaluation of the inhibitory effect of metallic nanoparticles on *Campylobacter jejuni* synthesized by a green pathway using *Ganoderma sessile*

Abstract approved by:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Thesis codirector

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Thesis codirector

This study highlights the potential of biosynthesized metal nanoparticles derived from the fungus *Ganoderma sessile* as effective antimicrobial agents against *Campylobacter jejuni* and related species, including *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. Silver nanoparticles (AgNPs), exhibiting a modal size of 5 nm, demonstrated intense inhibitory activity, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 6.7 µg/mL, likely due to their ability to disrupt bacterial membranes and induce oxidative stress in *C. jejuni*. In contrast, copper oxide nanoparticles (CuONPs), with sizes ranging close to 3 nm, exhibited a slower antimicrobial effect, with an MIC of 10 µg/mL, which may be attributed to bacterial mechanisms incorporating copper into metabolic pathways. These MIC values were significantly lower than those reported in studies using chemically synthesized nanoparticles, underscoring the efficiency of this green synthesis approach. Notably, the nanoparticles were effective against multi-antibiotic-resistant strains of *Campylobacter*, such as *C. coli* strain 2228, the most resistant strain evaluated. Mechanistic studies revealed that AgNPs primarily destabilize bacterial membranes and generate reactive oxygen species. At the same time, CuONPs exert their effects more gradually, consistent with the role of oxidative stress in their antimicrobial activity. Additionally, analysis of the intracellular aqueous extract of *G. sessile* identified fatty acyls and prenol lipids as the predominant metabolite groups. Although the extract showed moderate inhibitory activity (40% at maximum concentration), no significant differences were observed against *C. coli* strain 2228, suggesting that experimental conditions may have impacted the bioactive molecules. Nevertheless, the t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) analysis identified at least four molecules structurally similar to approved by regulatory food agencies antibacterial compounds, providing promising leads for future research. In conclusion, this work demonstrates the potential of biosynthesized nanoparticles as a sustainable and effective alternative for controlling multidrug-resistant foodborne pathogens by reducing reliance on conventional chemical synthesis methods. Future research will focus on identifying the metabolites responsible for antibacterial activity and optimizing synthesis conditions to enhance the efficacy of this approach as a promising strategy for combating foodborne infections.

Keywords: Nanoparticles, *Campylobacter*, Bacterial resistance, *Ganoderma*, Metabolome

Dedicatoria

A mi madre... la única persona que siempre creyó en mí y en que podría llegar hasta acá.

Agradecimientos

Agradezco principalmente a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, antes CONAHCyT, por la beca de manutención para poder mudarme a una ciudad tan lejana de mi lugar de origen. También agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California por el espacio para realizar mi investigación, así como apoyarme con recursos económicos para realizar distintas actividades que contribuyeron en mi formación profesional como doctor.

Quiero agradecer a la sociedad mexicana. Sin la colaboración de todas aquellas personas que, día a día, contribuyen con sus obligaciones sociales. Desde profesionales, hasta personas que sustentan su vida a través del comercio informal, gracias a sus pagos de impuestos, fue que tuve el privilegio de acceder a esta beca de posgrado. “Si no hay justicia para el pueblo que no haya paz para el gobierno.”

Agradezco a mis co-asesores de tesis, la Dra. Ernestina Castro Longoria y el Dr. Alejandro Huerta Saquero, por aceptar ser los directores de este trabajo de investigación que propuse hace cuatro años. Sin duda, fueron clave para lograr aterrizar el proyecto y darle continuidad.

Agradezco a los miembros de mi comité de tesis, al Dr. Edgardo Sepúlveda, por apoyarme administrativamente, así como personalmente cuando requería algún consejo. Al Dr. Aldo Moreno por ayudarme a darle un cierre a la última parte de esta investigación, así como enseñarme tanto de un área de la ciencia anteriormente desconocida para mí. Agradezco de manera especial a la Dra. Beatriz Quiñones, por darme guía y gran apoyo al trabajar con un patógeno tan difícil y complicado de estudiar. Gracias por el tiempo invertido en innumerables videollamadas, así como el apoyo de manera personal con consejos y críticas constructivas a mi perfil profesional.

Agradezco a Ita y a la Dra. Ana, por su apoyo en el laboratorio de Bionano. Agradezco a Jhordan porque sin duda, me ayudó muchísimo a comprender diversos temas respecto a la metabolómica. Asimismo, agradezco al Dr. Jorge Xool por los buenos consejos para el mejoramiento de esta parte del proyecto. A Adriana Mejía, por su gran apoyo en las cuestiones administrativas del posgrado.

Agradezco a mis compañeros y compañeras de laboratorio, a Sophi sobre todo por haberme prestado su laptop en mi último avance de tesis luego de que la mía se destruyera. A Eris y Jorge por ser muy buenos compañeros de mesa de trabajo, muy respetuosos y muy buenas personas. A Daniela Sánchez,

Yohana Medina y Marina Piña, por permitirme ser quien las formara en su primera experiencia dentro de un laboratorio de investigación. Aprendí mucho de ustedes y me llevo una gran experiencia al ser su asesor.

A todas y todos los integrantes de la Sociedad Estudiantil del Posgrado en Ciencias de la Vida. Fue un gran honor haber sido su presidente, y participar en todas las actividades realizadas. Fueron un gran momento político en mi vida. Marco, aprendí un montón de tu perspectiva tan crítica, te admiro mucho. Rocío, te agradezco ser un gran pilar en lo profesional y también personal, eres una gran tía.

Agradezco a la banda Guayaba con la que llegué a este nuevo lugar. Beto, Katia e Itzel, ustedes fueron un sostén en los primeros meses de este gran cambio en mi vida. Especialmente a Itzel por los largos desayunos que se convertían en críticas al sistema y sueños de derrocar al capital. También agradezco a Lolo, otro guayabo perdido en Ensenada. Las noches de juegos con el Beto fueron un buen aliviane para adaptarnos a la nueva ciudad.

A las bonitas amistades que hice en este lugar tan distinto para mí. Ale, gracias por ser tan linda persona y por compartir mucho chisme conmigo. Gracias a Diana y Fer por haber creado un espacio tan femenino para poder sentirme cómoda. Betito y Arelí, gracias por ser personas tan acogedoras y generar un espacio muy hogareño para mí. A los viejos miados, Arturo, Chin y Hernán, gracias por compartir momentos tan cálidos que fueron de mucha ayuda cuando había días de presión a full. A les envergaos, Jorge, Luis Carlos y Diego, ustedes fueron la voz de la razón en momentos de adultez y de mucha reflexión. Gracias especial a Jorge por llevarme a conocer “la otra Ensenada”.

Agradezco a mi familia, mi madre, que sin ti sabes que nada de esto podría ser posible. A Kari por darme consejos de parte de la voz de la experiencia como docente. Al viejo que está en el Mictlán, aunque no nos llevamos muy bien en vida, sé que siempre quisiste hacer tu mejor esfuerzo. Agradezco también a mi nueva familia, Jess, tus papás, el Vivains y la Jai. Me han dado un gran soporte en estos últimos años. Gracias por todo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 <i>Campylobacter</i>	4
1.1.1 <i>Campylobacter jejuni</i>	5
1.1.2 Importancia médica.....	6
1.1.3 Importancia ganadera y transmisión.....	7
1.1.4 ¿Qué causa los brotes de infecciones por <i>Campylobacter</i> ?.....	7
1.1.5 Resistencia a los antimicrobianos.....	9
1.2 Uso de Nanopartículas para combatir a las bacterias multirresistentes a antibióticos.....	11
1.2.1 Clasificación de nanopartículas.....	14
1.2.2 Métodos de síntesis tradicionales.....	14
1.2.3 Síntesis verde de nanopartículas.....	16
1.2.3.1 Los hongos como biofábricas para la síntesis de nanopartículas.....	18
1.3 Antecedentes.....	18
1.4 Justificación.....	20
1.5 Hipótesis.....	20
1.6 Objetivos.....	20
1.6.1 Objetivo general.....	20
1.6.2 Objetivos específicos.....	20

Capítulo 2. Metodología.....	22
2.1 Cultivo de <i>Campylobacter jejuni</i>	22
2.2 Cultivo de <i>Ganoderma sessile</i> y obtención de extracto	22
2.3 Síntesis de nanopartículas metálicas	22
2.4 Ensayos de inhibición del crecimiento de <i>C. jejuni</i> con nanopartículas metálicas	23
2.5 Caracterización de las nanopartículas.....	24
2.5.1 Espectroscopía UV-Vis.....	24
2.5.2 Potencial zeta y diámetro hidrodinámico	25
2.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	25
2.6 Ensayo de ultraestructura	25
2.6.1 Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	25
2.7 Ensayos con otras especies y cepas de <i>Campylobacter</i>	26
2.8 Análisis metabolómico de <i>Ganoderma sessile</i>	28
2.8.1 Obtención de muestras	28
2.8.2 Liofilización de las muestras.....	28
2.8.3 Extracción de metabolitos.....	29
2.8.4 Procesamiento de las muestras por LC-MS ²	29
2.8.5 Identificación de metabolitos.....	30
2.9 Tratamientos al Extracto Acuoso Intracelular (EAI) para diferenciación de metabolitos.....	31
2.9.1 Efecto de la proteinasa K y la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los metabolitos intracelulares producidos por <i>G. sessile</i>	32
Capítulo 3. Resultados	33
3.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas	33
3.1.1 Reacción de síntesis	33
3.2 Caracterización de nanopartículas	33
3.2.1 Espectrofotometría UV-Vis.....	33
3.2.2 Dispersión de luz dinámica (DLS)	34

3.2.3	Análisis de potencial zeta	35
3.2.4	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	36
3.3	Ensayos de inhibición en líquido de <i>C. jejuni</i> con AgNPs y CuONPs.....	37
3.4	Determinación de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	39
3.5	Ensayos de ultraestructura	40
3.6	Actividad antimicrobiana de las nanopartículas contra otras especies y cepas de <i>Campylobacter</i>	41
3.7	Composición del extracto acuoso intracelular de <i>Ganoderma sessile</i>	43
3.8	Estabilidad térmica y proteólisis de los metabolitos antibacterianos intracelulares producidos por <i>G. sessile</i>	46
3.8.1	Potenciales compuestos con actividad antibacteriana producidos por <i>G. sessile</i>	47
Capítulo 4.	Discusión.....	49
Capítulo 5.	Conclusiones	56
Literatura citada		58
Anexos		75

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1 Brotes causados por <i>Campylobacter</i> por categoría de origen, de 2011 a 2022 (Modificada de CDC, <i>Outbreaks involving Campylobacter</i>	8
Figura 2 Brotes causados por <i>Campylobacter</i> por categoría de alimento, de 2010 a 2017 (Modificada de CDC, <i>Outbreaks involving Campylobacter</i> 2019).	9
Figura 3 Genes, y mutaciones en genes, que le confieren resistencia contra diversas clases de antibióticos a distintas especies del género <i>Campylobacter</i> . El análisis proviene de una muestra de 237 genomas que comprenden 21 especies del género de bacterias. (Modificado de Rivera-Mendoza, <i>et al.</i> , 2020).	10
Figura 4 Desarrollo investigaciones enfocadas en nanotecnología en las décadas de 1990 y 2000 (Modificado de Roco, 2011).	12
Figura 5 Clasificación de los principales métodos para obtener nanopartículas (Ealia y Saravanakumar, 2017; Khan <i>et al.</i> , 2019).	15
Figura 6 Síntesis verde de nanopartículas utilizando extractos provenientes de organismos vivos. Según el organismo de donde provenga el extracto, le conferirá características especiales a las nanopartículas resultantes. Estas podrían ser las que actúan como agente estabilizador (circunferencias grises).	17
Figura 7 Espectro UV-Vis de las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) sintetizadas con el EAI de <i>G. sessile</i> a pH de 8. El pico máximo de absorbancia se encontró en 290 nm.....	34
Figura 8 Espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas con el EAI de <i>G. sessile</i> a pH de 8. El pico máximo de absorbancia s encontró en 420 nm.	34
Figura 9 Dispersión de luz dinámica de las CuONPs para determinación aproximada del tamaño a través del diámetro. Índice de polidispersidad: 0.474 representando distintas poblaciones de tamaños que pueden ser observadas en el gráfico.	35
Figura 10 Dispersión de luz dinámica de las AgNPs para determinación aproximada del tamaño a través del diámetro. Índice de polidispersidad: 0.427 representando distintas poblaciones de tamaños que pueden ser observadas en el gráfico.	35
Figura 11 Potencial zeta de las CuONPs con valor de -21.0 mV.....	36
Figura 12 Potencial zeta de las AgNPs con valor de -24.4 mV.	36
Figura 13 Caracterización de las AgNPs a pH de 8 a través de microscopía electrónica de transmisión. A) Histograma de frecuencia de los tamaños de las AgNPs; B) Imagen obtenida con una magnificación 100 kx a 80 kV, barra de escala de 150 nm.	37
Figura 14 Caracterización de las CuONPs a pH de 8 a través de microscopía electrónica de transmisión. A) Histograma de frecuencia de los tamaños de las CuONPs; B) Imagen obtenida con una magnificación 100 kx a 80 kV, barra de escala de 50 nm.....	37

- Figura 15 Placa de Agar Basal Anaerobio con el estampado del cultivo de *C. jejuni* con distintas concentraciones de nanopartículas de óxido de cobre y plata. A) AgNPs: columnas 1-5 y filas A-C concentraciones de 11 µg/mL, 5.9 µg/mL, 2.9 µg/mL, 1.4 µg/mL, 0.7 µg/mL por triplicado; B) columnas 1-5 y filas D-F de 54 µg/mL, 27 µg/mL, 13.5 µg/mL, 7 µg/mL y 3.5 µg/mL; C) columna 11: cultivo de *C. jejuni* ATCC 33560 sin ningún tratamiento; D) columna 12: nanopartículas diluidas en medio líquido Bolton..... 38
- Figura 16 Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) después de 42 horas de cultivo de *C. jejuni* ATCC 33560 con distintas concentraciones de AgNPs. 39
- Figura 17 Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) después de 42 horas de cultivo de *C. jejuni* ATCC 33560 con distintas concentraciones de CuONPs. 39
- Figura 18 Producción de ROS por *C. jejuni* expuesta a AgNPs; C- = sin tratamiento, C+ = control positivo usando H₂O₂ 1 mM. Los resultados son media + DE (n = 3) (ANOVA de una vía con prueba de Tukey). 40
- Figura 19 Producción de ROS por *C. jejuni* expuesta a CuONPs; C- = sin tratamiento, C+ = control positivo usando H₂O₂ 1 mM. Los resultados son media + DE (n = 3) (ANOVA de una vía con prueba de Tukey). 40
- Figura 20 Micrografía de *C. jejuni* 33560 después de ser incubadas durante 24 h con AgNPs. A) Célula expuesta a las AgNPs, barra de referencia 200 nm. B) Amplificación de la zona dentro del recuadro rojo en A donde se visualiza la presencia de nanopartículas dentro de la célula bacteriana, barra de referencia 100 nm. Micrografía de *C. jejuni* después de ser incubadas durante 24 h con CuONPs. A) Células expuestas a las CuONPs, barra de referencia 200 nm. B) Amplificación de la zona donde se aprecia la presencia de nanopartículas en la membrana de la bacteria, barra de referencia 100 nm. 41
- Figura 21 Antibiograma de las cepas (A) *C. jejuni* 1864, (B) *C. coli* 2228 y (C) *C. lari* 2100 con los antibióticos: Sulfametoxazol a 23.75 µg (1) de la familia de las Sulfonamidas, Enrofloxacin a 5 µg (2) de la familia de las Quinolonas, Neomicina a 30 µg (3) de la familia de los Aminoglucósidos, y Oxitetraciclina (4) y Tetraciclina a 30 µg (5) de la familia de las Tetraciclinas. 42
- Figura 22 Unidades formadoras de colonia (UFC) después de 48 h de incubación de las nanopartículas de plata y óxido de cobre con las distintas especies y cepas de *Campylobacter* (*C. jejuni* 1864, *C. jejuni* 1221, *C. coli* 2228, *C. coli* 1517 y *C. lari* 2100). 43
- Figura 23 Distribución de las 10 clases químicas representativas de metabolitos en el hongo *Ganoderma sessile*. Las clases químicas que no están conformadas por al menos 3 metabolitos se agruparon en "Otros con <3" (7%). 237 metabolitos (45.1%) no fueron clasificados. 43
- Figura 24 Representación espacial de las relaciones referentes a estructura química de los metabolitos en *G. sessile*. A) Red molecular de GNPS enriquecida con clases químicas de *ClassyFire*. Visualización de 609 nodos, las cuales comprenden 36 clases químicas diferentes. Las clases de los nodos se asignaron conforme a la clase química más predominante en cada clúster. B) Subred molecular de acilos grasos. Aquellos nodos con un contorno color morado tienen una anotación estructural (SMILES), lo que permite una asignación putativa del nombre de la molécula: 1.- 9,10-Dihydroxy-12Z-octadecenoic acid; 2.- Linolenic Acid; 3.- Aleuretic Acid; 4.- 9(10)-EpOME; 5.- 9(S)-HpOTrE; 6.- 9- Oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid; 7.- 4-Hydroxynonenal; 8.- MoNA:790536

- Linoleic acid; El grosor del eje corresponde al *cosine score* (grado de similitud entre espectros). El tamaño de los nodos indica la proporción de la relación masa-carga (m/z) del metabolito. 44
- Figura 25 Ensayo de inhibición de *C. jejuni* ATCC 33560 utilizando el extracto acuoso intracelular de *G. sessile*, y las nanopartículas de Ag y CuO. 45
- Figura 26 Distribución de las 5 clases químicas de metabolitos que componen el Extracto Acuoso Intracelular (EAI) de *Ganoderma sessile*. Las clases químicas que no están conformadas por al menos 3 metabolitos se agruparon en "Otros con <3" (17%). 67 metabolitos (47.5%) no fueron clasificados. 46
- Figura 27 Efecto del calor y la proteinasa K sobre la actividad antibacteriana del EAI de *G. sessile*. H₂O_pK = Agua destilada estéril incubada junto con proteinasa K (100 µg/mL); EAI_A = EAI esterilizado en autoclave (120°C y 15 lb/in²); EAI_pK = EAI incubado con proteinasa K (100 µg/mL). 47
- Figura 28 Comparación de estructuras de metabolitos utilizando una proyección t-SNE, alineando aquellos identificados en este estudio con candidatos reportados por la FDA que exhiben actividad antibacteriana. Las estructuras seleccionadas se indican con flechas negras y están numeradas del 1 al 4. El panel izquierdo muestra las moléculas reportadas por la FDA, mientras que el panel derecho presenta los metabolitos del extracto acuoso intracelular (EAI) de *G. sessile*. La proyección se generó a partir de SMILES utilizando Data Warrior. 48

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1 Especies y cepas de <i>Campylobacter</i> utilizadas en este trabajo.....	26
Tabla 2 Información sobre la resistencia a los antibióticos de las cepas <i>C. jejuni</i> 1864, <i>C. jejuni</i> 1221, <i>C. coli</i> 2228 y <i>C. lari</i> 2100 (Fouts <i>et al.</i> , 2005).	27
Tabla 3 Perfil de resistencia y susceptibilidad a 5 tipos de antibióticos probados en este trabajo.	42

Capítulo 1. Introducción

Las campilobacterias pertenecen al género bacteriano *Campylobacter* que, a su vez, pertenecen a la clase de las Épsilon-proteobacteria, las cuales poseen una gran diversidad de hospederos. Esto es reflejo de su diversidad genómica y capacidad de adaptación, ya que el género tiene variación en el contenido de G-C de 29 a 47%. Desde la revisión taxonómica del grupo en 1992, realizada por Vandamme y Goossens (1992), la clasificación de estas bacterias se ha basado en la filogenia, haciendo énfasis en que dentro de este taxón, se incluyeron especies con morfologías celulares extremadamente diferentes y un rango de proporción en el contenido de G-C que excede al de la mayoría de los géneros de bacterias bien definidos, cuyos rangos tienen una menor amplitud (Vandamme y Goossens, 1992), como el caso del género *Escherichia* que va de 50.4 a 50.8% (Mann y Chen, 2010).

El género *Campylobacter* requiere condiciones de crecimiento específicas, como rangos de temperatura que van de 37 a 42°C, dependiendo de la especie (*C. fetus* puede crecer entre los 25 y 37°C), son susceptibles al oxígeno (O₂) y requieren una atmósfera microaeróbica; aunque la supervivencia de las distintas especies depende de diversos factores como los suplementos al medio de cultivo, la temperatura, y las interacciones con otros microorganismos (Delaporte *et al.*, 2024), la concentración óptima de O₂ va de 3 a 5%, 2 a 10% de dióxido de carbono (CO₂), y un balance del resto del volumen con nitrógeno (N₂) (Forsythe, 2000, p. 146; Park, 2002). Asimismo, su principal fuente de energía es obtenida a través de los aminoácidos o de intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico, aunque también pueden fermentar algunos carbohidratos, más no oxidarlos. Algunas especies son capaces de reducir nitrógeno (Sahin *et al.*, 2017).

Lo anterior, ha llevado a que estas bacterias reciban el adjetivo de “fastidiosas”, en términos de su aislamiento y manejo *in vitro*, además de que ha hecho que sea un patógeno difícil de trabajar en condiciones que simulan su ambiente dentro de un laboratorio. Esto conlleva la problemática para realizar estudios con estos patógenos, debido a que la incidencia y la prevalencia de la campilobacteriosis ha aumentado tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo en los últimos 10 años (Havelaar *et al.*, 2015).

Existen dos especies, las cuales son los principales focos de atención dentro de este género, ya que *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* se han reportado como los patógenos bacterianos responsables de la mayoría de los casos de gastroenteritis en el mundo (Sheppard y Maiden, 2015). La transmisión de

estas bacterias está relacionada al consumo de productos de origen animal, agua, o el contacto con animales o heces de animales contaminadas (Neimann *et al.*, 2003; Varga *et al.*, 2019).

En Estados Unidos y Reino Unido, se ha reportado que *C. jejuni* representa el 90% de las bacterias aisladas de pacientes enfermos con un cuadro clínico de gastroenteritis (Man, 2011). Desde la década de 1970, se han aislado a *C. coli* y *C. jejuni* de una amplia gama de especies de aves y mamíferos silvestres y domesticadas. En estos animales, por lo general se cree que causan pocos o ningún síntoma de enfermedad. Sin embargo, los seres humanos generalmente presentan enfermedades inflamatorias del intestino, infecciones sistémicas, bacteriemia, y se relaciona la infección de *C. jejuni* con el desarrollo posterior del síndrome de Guillain-Barré (Kaakoush *et al.*, 2015). En México existen reportes de aislamientos de *Campylobacter* en pacientes con enfermedades gastrointestinales, animales de consumo, agua y productos empaquetados de origen aviar (Bustamante *et al.*, 1995; Quiñones-Ramírez *et al.*, 2000; Solís-Soto, 2011; Zaidi *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2016; Soto-Beltrán *et al.*, 2019).

Aunado a lo anterior, se ha encontrado la presencia de genes de resistencia a distintos antibióticos en las cepas aisladas de alimentos, así como de pacientes, tales como aminoglucósidos, betalactámicos, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos, fenicoles y tetraciclinas (Varga *et al.*, 2019). Durante la última década, se han reportado cepas de *Campylobacter* con resistencia a ciprofloxacina u otras fluoroquinolonas, macrólidos y lincosamidas, entre otros antibióticos antes mencionados. En países como Tailandia, Estados Unidos, Reino Unido, Holanda, España, Canadá y Australia, la incidencia de cepas de *Campylobacter* resistentes a múltiples antibióticos ha aumentado considerablemente, siendo las cepas de la especie *C. jejuni*, en la zona de Norteamérica, y provenientes del ganado, aquellas con mayor presencia de dicha multirresistencia (Ocejo *et al.*, 2019; Varga *et al.*, 2019; Abraham *et al.*, 2020; Rivera-Mendoza *et al.*, 2020).

La nanotecnología se encuentra en constante desarrollo en los últimos años, ofreciendo múltiples aplicaciones en sectores diversos como la medicina, la agricultura y la remediación ambiental. Además, las propiedades únicas que poseen las nanopartículas, debido a su relación tamaño-volumen, ha captado considerable atención por sus beneficios potenciales, especialmente en el ámbito de la salud humana (Seil y Webster, 2012; Kandru, 2020; Alharbi, Alsubhi, y Felimban, 2022). Estas aplicaciones abarcan desde sistemas de liberación de fármacos hasta el desarrollo de macromoléculas funcionalizadas químicamente, que actúan como bloques de construcción molecular para agentes de terapia génica y ejercen efectos antimicrobianos contra diferentes patógenos bacterianos resistentes a múltiples fármacos (Khorsandi *et al.*, 2021; Yayehrad, Wondie, y Marew, 2022).

Desde la década de los 2000, distintos gobiernos han invertido cifras que van de los cientos de millones hasta los miles de millones en desarrollo de nanotecnología, siendo Estados Unidos y la Unión Europea los mayores inversores en el desarrollo de avances en este tema (Dowling, 2004). En el campo de la medicina, la nanotecnología tuvo un gran enfoque hacia el desarrollo de métodos para diagnosticar y tratar enfermedades como el cáncer, diabetes, infecciones fúngicas, virales y terapia genética (Surendiran *et al.*, 2009); Para estas aplicaciones, la química verde ha surgido como un punto focal en la síntesis de nanopartículas, atrayendo interés por sus características menos dañinas al ambiente (Vijayaram *et al.*, 2024).

En particular, el uso de hongos y plantas como “biofábricas” para proporcionar los agentes reductores y estabilizadores necesarios para una síntesis de nanopartículas exitosa, representa un enfoque novedoso y alternativo al uso de metodologías de química convencional (Bhavyasree y Xavier, 2022; Vijayaram *et al.*, 2024). En comparación con los métodos convencionales (Nguyen y Nguyen, 2019), las técnicas de síntesis verde ofrecen ventajas significativas, ya que estos métodos son más rentables y ambientalmente benignos y requieren condiciones de reacción más suaves para la síntesis de nanopartículas con biocompatibilidad mejorada, estabilidad y uniformidad aceptable (Alharbi, Alsubhi, y Felimban, 2022).

Entre los hongos empleados en biotecnología, el género *Ganoderma* destaca por su gran diversidad y su capacidad para descomponer madera. Además, ha sido utilizado en la medicina tradicional durante miles de años en diversos países asiáticos. En China, por ejemplo, *Ganoderma* se ha empleado en el tratamiento de enfermedades como la hepatitis, la bronquitis crónica, la gastritis, el crecimiento tumoral y diversos trastornos inmunológicos, entre otros (Wu *et al.*, 2012). Recientemente, la industria farmacéutica ha mostrado un gran interés en estas especies de hongos debido a sus compuestos bioactivos y propiedades terapéuticas, que incluyen efectos inmunomoduladores, actividad antitumoral, beneficios para la salud cardiovascular y propiedades antiinflamatorias (Sanodiya *et al.*, 2009; Loyd *et al.*, 2018).

Entre las especies de *Ganoderma*, *Ganoderma lucidum* es la más estudiada y se encuentra de forma endémica en Europa y China. En los últimos años, el uso de *G. lucidum* se ha integrado con el desarrollo de la nanotecnología para avanzar en aplicaciones biomédicas, ya que sus beneficios para la salud han añadido un valor significativo en el contexto de la síntesis de nanopartículas mediante el uso de sus compuestos bioactivos (Zhu *et al.*, 2007; Jan *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Loyd *et al.*, 2018; Cör Andrejč *et al.*, 2022; Constantin *et al.*, 2023; Jia *et al.*, 2023; Zhen *et al.*, 2023).

Estudios de caracterización de este hongo, ampliamente distribuido a nivel mundial, han identificado a

Ganoderma sessile como una especie presente en México y Estados Unidos (Torres-Torres, Ryvarde, y Guzmán-Dávalos, 2015; Loyd *et al.*, 2018). En particular, se ha demostrado que *G. sessile* es un productor de alto rendimiento de polisacáridos (Viceconte *et al.*, 2021), biopolímeros que funcionan como coloides protectores en la síntesis de nanopartículas al estabilizar las partículas tanto de manera estérica como electrostática, facilitando la formación de capas de adsorbato activo en las NPs (Horn y Rieger, 2001).

Además, investigaciones anteriores han documentado la síntesis de nanopartículas metálicas utilizando *G. sessile*, lo que proporciona evidencia convincente sobre el potencial de estas partículas derivadas de hongos para combatir patógenos bacterianos entéricos y oportunistas (Murillo-Rábago *et al.*, 2022; Flores-Rábago *et al.*, 2023). Estudios recientes indican que estos nanomateriales son capaces de inhibir el crecimiento de *C. jejuni*, lo que abre la posibilidad de explorar la síntesis de nanopartículas de manera ecoamigable a través del uso de organismos o sus derivados. En estos estudios, se han empleado nanopartículas sintetizadas mediante métodos físicos y químicos, los cuales contribuyen al deterioro ambiental que enfrentamos en la actualidad (Xie *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2020). En este contexto, el presente trabajo propone el uso de *G. sessile* para sintetizar nanopartículas de plata y óxido de cobre con el fin de inhibir a *C. jejuni*.

1.1 *Campylobacter*

El género *Campylobacter* representa un grupo diverso de bacterias que comprende 45 especies validadas a la fecha de este reporte (Miller *et al.*, 2024), entre las que destacan *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* y *C. lari* como las de mayor relevancia clínica (Kaakoush *et al.*, 2015) (<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>). Morfológicamente, estos microorganismos se caracterizan por su forma de espiral (forma de S), su tamaño que va de 0.2-0.8 x 0.5-5 µm, y movilidad mediada por flagelos polares o múltiples, aunque existen variantes no móviles (Sahin *et al.*, 2017).

Los estudios filogenéticos recientes han permitido reclasificar estas especies en cinco grupos evolutivos principales, todos los cuales incluyen representantes con capacidad patogénica (Costa e Iraola, 2019). Esta reorganización taxonómica ha sido fundamental para comprender las relaciones evolutivas entre las diferentes cepas y su potencial zoonótico. Además, estas especies pueden dividirse fenotípicamente en dos grupos: *Campylobacter* “termotolerantes”, que pueden crecer hasta 42°C, y *Campylobacter* “no termotolerantes”, en el que la temperatura óptima de crecimiento generalmente no supera los 37°C. Esta

agrupación fenotípica se refleja en la filogenia del genoma completo, que divide claramente los taxa de *Campylobacter* en dos ramas principales, como informaron On SLW *et al.* (2020).

Desde el punto de vista clínico, las infecciones por *Campylobacter* constituyen un problema de salud global. La campilobacteriosis, principalmente causada por *C. jejuni* y *C. coli*, representa la principal causa de gastroenteritis bacteriana a nivel mundial, con una incidencia estimada en 96 millones de casos anuales (EFSA/ECDC, 2018; OMS, 2022) (<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/campylobacter>). La enfermedad presenta un amplio espectro clínico que va desde cuadros asintomáticos hasta manifestaciones graves que incluyen diarrea sanguinolenta, fiebre y dolor abdominal, con especial riesgo para poblaciones vulnerables (Man, 2011; Kaakoush *et al.*, 2015).

Las complicaciones extragastrointestinales revisten particular importancia, destacándose el síndrome de Guillain-Barré, artritis reactiva y diversas infecciones sistémicas (Zhang *et al.*, 2009; Kaakoush *et al.*, 2015).

Aunque aproximadamente 80% de los casos son autolimitados, los cuadros severos requieren tratamiento con macrólidos o fluoroquinolonas, opciones terapéuticas cada vez más comprometidas por la resistencia a los antibióticos (Ge *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2017).

En el ámbito veterinario, diversas especies de *Campylobacter* actúan como comensales o patógenos en aves y mamíferos. *C. fetus* subsp. *fetus* representa un patógeno reproductivo importante en rumiantes, asociado a abortos y mortalidad neonatal (Salihu *et al.*, 2009). Esta versatilidad ecológica y patogénica subraya la importancia del género tanto en salud pública como en medicina veterinaria.

1.1.1 *Campylobacter jejuni*

Las bacterias de la especie *C. jejuni* presentan células pequeñas, en forma de espiral o de S, las cuales pueden transformarse en forma cocoide con el envejecimiento o la exposición a concentraciones tóxicas de oxígeno (Ng *et al.*, 1987). Presenta dos tipos de colonias, la primera tiene un aspecto bajo, plano, grisáceo, finamente granular y translúcido con un borde irregular y una tendencia a extenderse a lo largo de la dirección del borde. La segunda es redonda (1-2 mm de diámetro), elevada, convexa, lisa, brillante, con un borde entero translúcido y un centro más oscuro y opaco (Vandamme y Goossens, 1992).

La mayoría de las cepas son débilmente hemolíticas en agar sangre, sin embargo, dicha característica

puede verse afectada por la composición y el pH del medio base utilizado, la composición de la atmósfera y el período y temperatura de incubación. No se observa crecimiento a 25°C. Las cepas son móviles por medio de un solo flagelo polar el cual parece ser un factor de virulencia importante y necesario para la colonización intestinal (Vandamme y Goossens, 1992).

Aunado a lo anterior, la variación antigénica de la proteína flagelar puede servir como un medio para evadir la respuesta inmune del anfitrión. La variación de los loci del gen de la flagelina (*flaA* y *flaB*) puede detectarse mediante métodos basados en PCR y usarse en estudios epidemiológicos moleculares. La recombinación puede afectar la estabilidad de los métodos basados en *flaA* y posiblemente actúa como un mecanismo por el cual se incrementa el repertorio inmunogénico de una cepa dada (Vandamme y Goossens, 1992).

C. jejuni y *C. coli* permanecen como las causas más comunes de gastroenteritis bacteriana humana en todo el mundo (Friedman *et al.*, 2000). Tal como en Estados Unidos, donde se reportan 2.5 millones de casos al año (Kessel *et al.*, 2001).

1.1.2 Importancia médica

La mayoría de las bacterias aisladas de enfermedades humanas de casos de gastroenteritis en países como el Reino Unido y los Estados Unidos, son cepas de *C. jejuni* que generalmente representan el 90% de los casos, y el 10% restante se debe principalmente a *C. coli*. Estas dos especies de bacterias son responsables de una importante morbilidad y mortalidad en los países de bajos y medianos ingresos, aunque es muy probable que no esté reportado como corresponde debido a que la identificación a través de cultivo sigue siendo un desafío (Sheppard y Maiden, 2015).

En países con altos ingresos económicos el número de casos de campilobacteriosis en humanos ha aumentado de manera considerable, al punto de exceder el número de infecciones causadas por *Escherichia coli*, *Listeria* y *Salmonella*, siendo *C. jejuni* y *C. coli* los responsables del mayor número de los casos (Kessel *et al.*, 2001). En los Estados Unidos, las infecciones por *Campylobacter* pasaron de ser 5.02 a 7.19 por cada 100,000 habitantes durante la década de los 80 (Bryan y Doyle, 1995), a 13.8 por cada 100,000 habitantes durante el 2014, convirtiéndose en la segunda causa de gastroenteritis después de *Salmonella* (Gözl *et al.*, 2014). En la Unión Europea, las campilobacterias fueron reportadas como los patógenos bacterianos causantes de diarrea más comunes durante el año 2012, siendo República Checa

el país con mayor número de casos, seguido por Eslovaquia, Luxemburgo y el Reino Unido (Gözl *et al.*, 2014).

Durante las últimas décadas, no sólo *C. jejuni* y *C. coli* han prevalecido como principales especies infecciosas del género, sino que también especies como *C. concisus* y *C. ureolyticus* se han reportado como especies emergentes (Cervantes-García, 2020). Hay autores que señalan que las infecciones causadas por *Campylobacter* no tienen un vehículo en común que pueda relacionarse (Dunn *et al.*, 2018), sin embargo, se sabe que distintas especies tienen la capacidad de adherirse, evadir la respuesta inmune y así invadir las células del epitelio intestinal de humanos, al mismo tiempo que secretan toxinas que dañan al organismo (Man, 2011).

Se ha reportado que en ocasiones las infecciones por *Campylobacter* preceden al síndrome de Guillain-Barré (SGB), el cual es una enfermedad autoinmune que afecta al sistema nervioso periférico y es la causa más común de parálisis flácida aguda a nivel mundial. En un reporte publicado en 2019, se encontró que *Campylobacter* contribuye a que se genere SGB, estando presente al menos el 5%, y posiblemente hasta el 41%, de todos los casos que se generan de dicha enfermedad en los Estados Unidos (Scallan-Walter *et al.*, 2020).

1.1.3 Importancia ganadera y transmisión

Desde la década de 1970, *C. coli* y *C. jejuni* se han aislado de una amplia gama de especies de aves y mamíferos silvestres y domesticadas, en las que, por lo general, se cree que causan pocos o ningún síntoma de enfermedad. Los seres humanos generalmente se infectan por el consumo de alimentos contaminados, como agua, leche o el contacto con animales o heces de animales (Neimann *et al.*, 2003), siendo la carne de aves de corral un reservorio de especies termofílicas de *Campylobacter*, en especial *C. jejuni* y *C. coli* (Varga *et al.*, 2019). La mayoría de los genotipos de aislados de pacientes con enfermedades, también resultan similares a los de aislados como habitantes gastrointestinales comensales de animales domesticados y especialmente animales que funcionan como alimento humano (Sheppard y Maiden, 2015).

1.1.4 ¿Qué causa los brotes de infecciones por *Campylobacter*?

Las aves de corral, la leche cruda y el agua no tratada han sido las fuentes más comúnmente identificadas

de brotes de *Campylobacter* (Taghizadeh *et al.*, 2022). En Estados Unidos, desde 2010 hasta 2017, las agencias de salud pública estatales, locales y territoriales informaron 236 brotes de *Campylobacter* transmitidos por alimentos, lo que representa 2381 enfermedades, al Sistema de vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (del inglés *CDC: Centers of Disease Control and Prevention*) (CDC, Outbreaks involving *Campylobacter* 2019).

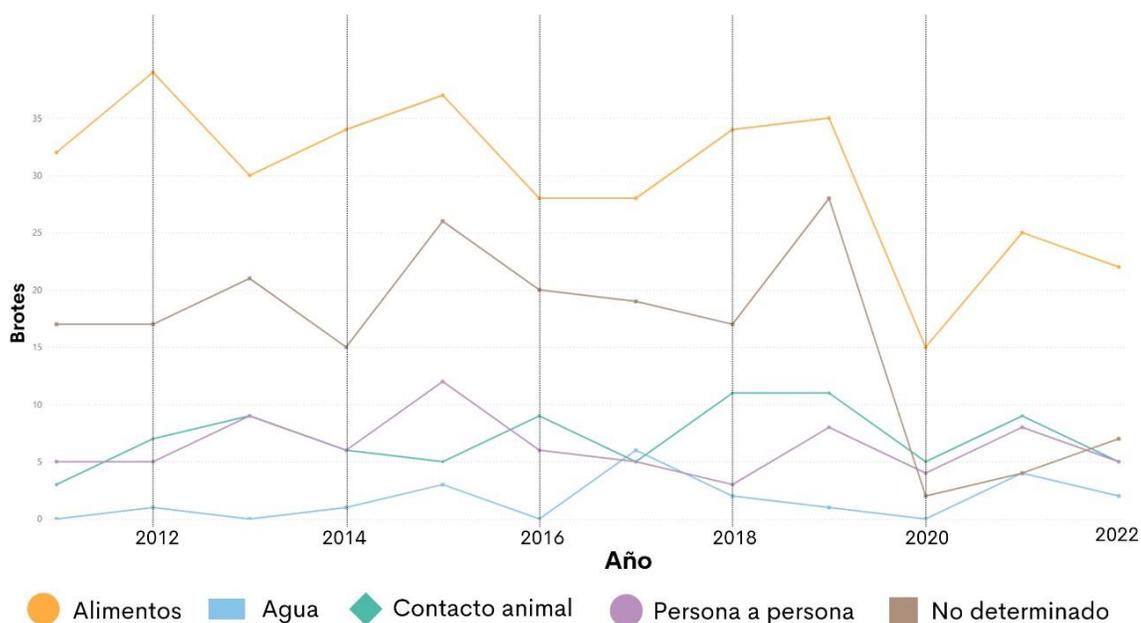


Figura 1 Brotes causados por *Campylobacter* por categoría de origen, de 2011 a 2022 (Modificada de CDC, Outbreaks involving *Campylobacter*).

La poca comprensión de la transmisión de estos patógenos transmitidos por los alimentos a los seres humanos en todos los entornos ha contribuido al fracaso de los sistemas de salud pública para abordar adecuadamente este problema. Como consecuencia, durante los últimos 20 años se ha invertido mucho en comprender cómo estas bacterias se transmiten de los huéspedes reservorios a los humanos a través de la cadena alimentaria (Sheppard y Maiden, 2015). En este sentido, se ha logrado identificar que las aves de corral son la principal fuente de infección para los humanos, sin embargo, la alta prevalencia de *Campylobacter* en los organismos rumiantes alrededor del mundo, nos han dado mayor evidencia de la importancia del ganado como el segundo reservorio más importante después de los pollos de engorde (Ocejo *et al.*, 2019).

Brotos causados por *Campylobacter* por categoría de alimento de 2010 a 2017

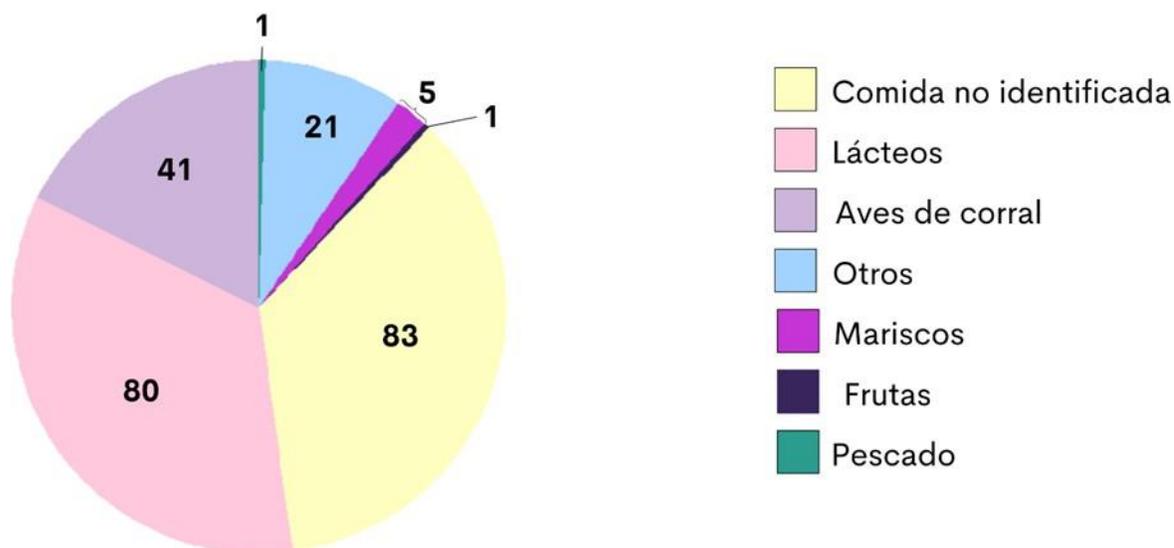


Figura 2 Brotos causados por *Campylobacter* por categoría de alimento, de 2010 a 2017 (Modificada de CDC, *Outbreaks involving Campylobacter* 2019).

A pesar de que, debido a la pandemia del SARS-CoV2, ha disminuido la transmisión de distintas enfermedades infecciosas debido a los nuevos hábitos de higiene, las infecciones por *Campylobacter* se han mantenido constantes durante este periodo (Robert Koch-Institute, 2022; van der Berg *et al.*, 2023).

1.1.5 Resistencia a los antimicrobianos

Diversas especies de *Campylobacter* muestran resistencia a múltiples antibióticos a través de mecanismos genéticos específicos y estrategias de adaptación (Gitahi *et al.*, 2020). La resistencia a tetraciclinas es mediada principalmente por los genes *tet(O)* y *tet(S)*, que codifican proteínas de protección ribosomal, permitiendo que estos patógenos sobrevivan al efecto del antibiótico (Aleksić *et al.*, 2021). Además, la resistencia a fluoroquinolonas en *Campylobacter* se asocia con una mutación puntual en el gen *gyrA*, que codifica para la subunidad α de la ADN polimerasa, donde un cambio de aminoácido (Thr86Ile) altera el sitio de acción del fármaco (Aleksić *et al.*, 2021). Otros mecanismos incluyen metilasas adicionales (*npmA*, *rmtA*, *rmtB*, entre otros) que modifican aminoglucósidos, así como enzimas inactivadoras, transportadores ABC y proteínas de flujo en el caso de macrólidos-lincosamidas-estreptograminas B, que inhiben la síntesis proteica al unirse a la subunidad ribosomal 50S (Roberts *et al.*, 2012). En los antibióticos β -lactámicos, las betalactamasas extendidas (ESBLs) representan una preocupación creciente, con genes como *blaTEM* y

blaSHV que han mutado para extender su espectro de acción, contribuyendo a la resistencia en *Campylobacter* (Roberts *et al.*, 2012).

En los últimos años, la resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un importante problema de salud pública en países desarrollados y en vías de desarrollo (Isenbarger *et al.*, 2002; Nachamkin *et al.*, 2002). Se han reportado cepas de *Campylobacter* con resistencia a ciprofloxacina u otras fluoroquinolonas, macrólidos y lincosamidas, cloranfenicol, aminoglucósidos, tetraciclina, ampicilina y otros b-lactámicos, cotrimoxazol y tilosina (Padungton y Kaneene, 2003; Moore *et al.*, 2006; Rivera-Mendoza, *et al.*, 2020). En la última década, una proporción creciente de cepas de *Campylobacter* en todo el mundo ha desarrollado resistencia a las fluoroquinolonas. Durante el año 1995 en Tailandia, la incidencia de resistencia a las fluoroquinolonas en los aislamientos de este grupo de bacterias fue del 84%. En 1997-1998 la incidencia de resistencia a las fluoroquinolonas en España fue del 72%. La incidencia de resistencia a las fluoroquinolonas también ha aumentado en Estados Unidos, Reino Unido y Holanda. En 1998-1999, se informó que la proporción de cepas de *Campylobacter* resistentes a las fluoroquinolonas era del 10%, 18% y 29%, respectivamente (Alfredson y Korolik, 2007).

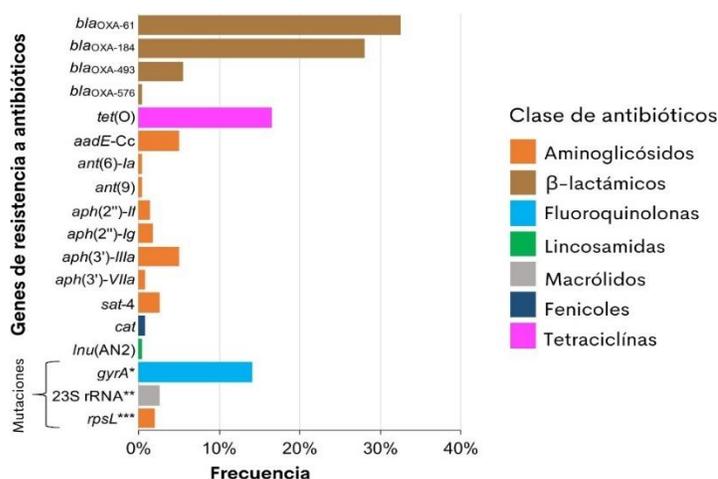


Figura 3 Genes, y mutaciones en genes, que le confieren resistencia contra diversas clases de antibióticos a distintas especies del género *Campylobacter*. El análisis proviene de una muestra de 237 genomas que comprenden 21 especies del género de bacterias. (Modificado de Rivera-Mendoza, *et al.*, 2020).

Las infecciones causadas por *Campylobacter* resistente a los antimicrobianos conducen a hospitalizaciones más prolongadas, mayores fracasos del tratamiento y aumento de la morbilidad y la mortalidad (Varga *et al.*, 2019). La gastroenteritis por *Campylobacter* debida a *C. jejuni* y *C. coli* es de gran importancia para la salud pública (Friedman *et al.*, 2000) y el aumento de la resistencia a los antimicrobianos tanto en la medicina como en la agricultura en *Campylobacter* es reconocido por varias autoridades nacionales,

incluida la Organización Mundial de la Salud (OMS), como un importante problema de salud pública emergente (Alfredson y Korolik, 2007).

En España, la terapia antimicrobiana en los organismos rumiantes sólo se recomienda para infecciones sistémicas graves, o en organismos de riesgo que estén inmunodeprimidos. Sin embargo, se ha visto que la resistencia a los macrólidos y fluoroquinolonas por parte de *C. jejuni* ha aumentado de manera considerable en los últimos años (32% a 43.2%) lo que dificulta el tratamiento a los organismos infectados o en riesgo (Ocejo *et al.*, 2019). En Canadá, se observó una alta frecuencia de resistencia a la tetraciclina en los aislados de *C. jejuni* de pollos (77%) y pavos (100%) (Varga *et al.*, 2019).

La resistencia a fluoroquinolonas por parte de *Campylobacter* se ha reportado también en aislados provenientes de pollos comerciales en Polonia, China e Italia. En estos países podemos observar que existe un uso indiscriminado de antimicrobianos en los animales que se usan para consumo humano, lo que contribuye a la selección y emergencia de bacterias resistentes a los mismos antimicrobianos (Varga *et al.*, 2019).

En Australia, a pesar de que el uso de antimicrobianos sea una de las principales causas para el desarrollo de la multirresistencia a fármacos, hay estudios en los que se ha detectado la resistencia a antimicrobianos a los cuales los animales de granja no han sido expuestos. Por ejemplo, en un estudio se identificó la resistencia a fluoroquinolonas en una bandada de pollos de engorde, a pesar de que este tipo de fármacos se encuentran restringidos debido a la importancia crítica que representa la presencia de microorganismos resistentes a éstos (Abraham *et al.*, 2020).

La presencia de bombas de flujo como CmeABC también contribuyen, de manera sinérgica, a la resistencia a distintos antimicrobianos. Lo anterior, aunado a la constante prevalencia de cepas multirresistentes en los últimos años, han llevado a la declaración reciente de la OMS, en donde se nombra a *Campylobacter* como una de las 12 bacterias que representan la mayor amenaza para la salud humana (Sproston *et al.*, 2018).

1.2 Uso de Nanopartículas para combatir a las bacterias multirresistentes a antibióticos

La nanotecnología puede entenderse como la fabricación de sistemas o dispositivos a nivel molecular, y

es un campo científico multidisciplinario que ha ido desarrollándose de manera explosiva en las últimas décadas (Figura 4). La comprensión y manipulación del comportamiento de objetos de tamaño nanométrico han hecho posible el desarrollo de nuevos enfoques para mejorar la calidad de vida humana. Uno de los mayores valores de la nanotecnología es el desarrollo de tratamientos médicos nuevos y efectivos (nanomedicina) (Emerich y Thanos, 2003), siendo el uso contra microorganismos multirresistentes a antibióticos una de las aplicaciones de gran importancia.

En el ámbito de la atención médica y la seguridad humana, las nanopartículas han surgido como herramientas poderosas en la lucha contra patógenos y enfermedades (Emerich y Thanos, 2003). Existen propiedades fisicoquímicas únicas en la nanoescala, que difieren de la forma a granel y la forma atómica. Factores como su alta relación área-volumen de superficie y su química de superficie ajustable las convierten en candidatas ideales para la administración dirigida de medicamentos, tratamientos antimicrobianos y diagnóstico por imágenes. Desde la lucha contra enfermedades infecciosas causadas por bacterias, virus y hongos hasta la lucha contra amenazas emergentes como la resistencia a los antibióticos, las nanopartículas ofrecen soluciones prometedoras que tienen un inmenso potencial para mejorar la salud y la seguridad públicas (Liu *et al.*, 2007; Liong *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2017; Mourdikoudis *et al.*, 2018).

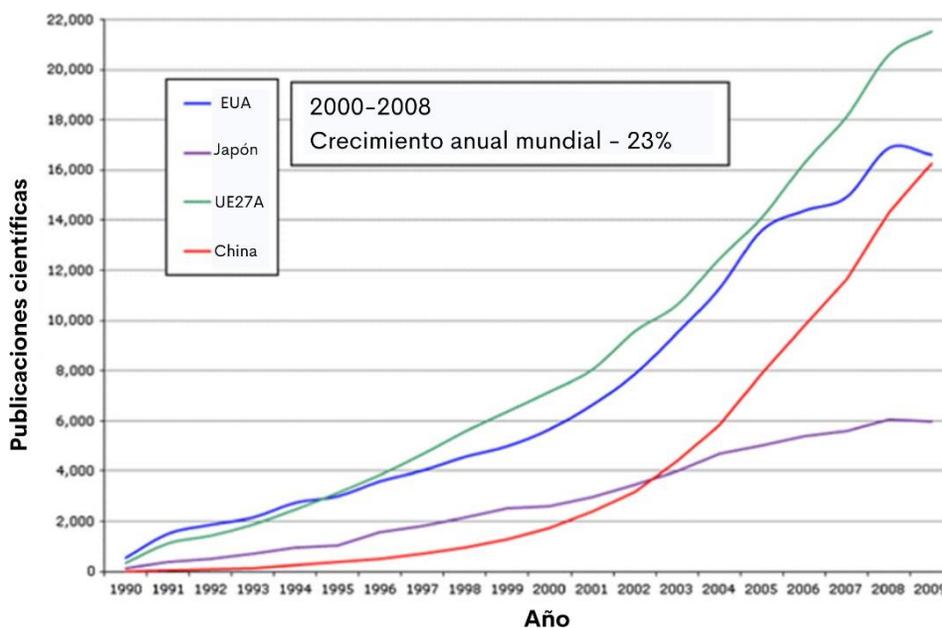


Figura 4 Desarrollo investigaciones enfocadas en nanotecnología en las décadas de 1990 y 2000 (Modificado de Roco, 2011).

Entre los nanomateriales más prometedores con propiedades antibacterianas se encuentran las nanopartículas metálicas, las cuales exhiben una mayor actividad química debido a su gran relación

superficie/volumen y estructura cristalográfica de superficie. Dado esto, se vuelve preciso el estudio de los nanomateriales bactericidas, particularmente por el reciente aumento de las cepas bacterianas resistentes a antibióticos que son considerados como “potentes” dentro de la medicina (Morones *et al.*, 2005).

Existen distintos reportes en donde se ha visto la actividad positiva del uso de nanomateriales, tal como nanocompuestos de alginato que se han utilizado para la desinfección de agua contaminada con *Staphylococcus aureus* (Motshekga *et al.*, 2018). También se ha hecho uso de nanopartículas (NPs) de plata (Ag) que han demostrado tener éxito para la desinfección de cuerpos de agua (Sheng y Liu, 2017).

Las nanopartículas metálicas, particularmente las de plata, ejercen su acción bactericida mediante mecanismos multifacéticos que atacan simultáneamente múltiples estructuras bacterianas (Morones *et al.*, 2005). Su tamaño (<100 nm) y alta relación superficie-volumen les permiten adherirse eficientemente a las membranas celulares, generando poros y provocando lisis osmótica (Yin *et al.*, 2020). Estudios con microscopía electrónica han demostrado que las AgNPs se acumulan en la superficie de bacterias gram negativas como *E. coli*, desestabilizando su membrana externa rica en lipopolisacáridos (Gutiérrez-Santana *et al.*, 2020). Este daño físico se completa con la liberación gradual de iones de plata (Ag^+), que penetran al citoplasma e inactivan enzimas esenciales al unirse a grupos tiol (-SH) (Betancur-Henao *et al.*, 2016).

Además del daño estructural, las nanopartículas inducen estrés oxidativo al generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Tales como radicales hidroxilo (OH) y superóxido (O_2^-) (Punz *et al.*, 2025). Estas moléculas altamente reactivas oxidan lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos, lo que lleva a las bacterias a la muerte celular. Investigaciones recientes muestran que este mecanismo es particularmente efectivo contra bacterias resistentes a antibióticos, ya que las ROS atacan múltiples blancos simultáneamente (Yin *et al.*, 2020).

A nivel intracelular, las nanopartículas interfieren con procesos metabólicos esenciales. Los iones metálicos liberados inhiben la síntesis de ATP al unirse a enzimas de la cadena respiratoria, mientras que las AgNPs pueden bloquear la subunidad 30S de los ribosomas, deteniendo la síntesis proteica (Shih *et al.*, 2023). Estudios genómicos han demostrado que las nanopartículas de cobre (CuNPs) causan daño al ADN mediante la intercalación entre bases nitrogenadas y la generación de aductos (Punz *et al.*, 2025). Esta multimodalidad de acción explica por qué las bacterias desarrollan menos resistencia a las nanopartículas en comparación con los antibióticos convencionales, que típicamente atacan solo a un blanco molecular. Las nanopartículas pueden potenciar la acción de antibióticos existentes al aumentar la permeabilidad de

la membrana bacteriana. Investigaciones recientes muestran sinergias notables entre AgNPs y β -lactámicos o tetraciclinas, donde las nanopartículas debilitan las barreras celulares permitiendo mayor entrada del antibiótico (Yin *et al.*, 2020). Este efecto combinado es particularmente valioso para tratar infecciones por bacterias multirresistentes a antibióticos. Además, los recubrimientos biológicos, como extractos fúngicos, mejoran la estabilidad y biocompatibilidad de las nanopartículas, reduciendo su toxicidad para células humanas (Castro-Longoria, 2016).

1.2.1 Clasificación de nanopartículas

Las nanopartículas pueden existir en diferentes formas, tamaños y estructuras, como esféricas, cilíndricas, tubulares, cónicas, de núcleo hueco, espirales, planas, de alambre, etc. También pueden tener forma irregular (Kumari y Sarkar, 2021). Estas características, junto con la presencia de capas funcionales como la superficie, la capa intermedia (shell) y el núcleo, determinan sus propiedades fisicoquímicas y comportamiento. Además, los métodos de síntesis empleados, tradicionalmente clasificados en enfoques químicos, físicos y biológicos, influyen directamente en sus propiedades morfológicas y funcionales, lo que a su vez define su potencial aplicación en campos como la biomedicina y la microbiología (Ealia y Saravanakumar, 2017; Khan *et al.*, 2019; Kumari y Sarkar, 2021).

Existen distintas clasificaciones para las nanopartículas, según las características que se estén observando. Como la naturaleza del material: orgánicas e inorgánicas, basadas en metales, basadas en óxidos metálicos, basadas en carbón, entre otras (Ealia y Saravanakumar, 2017); también existen nanopartículas basadas en otros materiales como cerámica, semiconductores, o polímeros (Khan *et al.*, 2019).

1.2.2 Métodos de síntesis tradicionales

Para los métodos de síntesis químicos, los bloques de construcción de la materia son los átomos y los electrones. Los átomos contienen electrones que orbitan un núcleo central, y la cantidad de electrones define el elemento. El siguiente nivel de complejidad involucra a las moléculas, donde los electrones orbitan múltiples núcleos y los electrones compartidos crean enlaces covalentes entre átomos (Schmidt, 2001). Las nanopartículas se diferencian de estas estructuras en tamaño, forma y composición material. Pueden ser de dimensión cero (tamaño fijo en un único punto, como los puntos cuánticos), unidimensionales (definidas solo por la longitud, como el grafeno), bidimensionales (definidas por la

longitud y el ancho, como los nanotubos de carbono) o tridimensionales (definidas por la longitud, el ancho y la altura, como las nanopartículas de oro) (Ealia y Saravanakumar, 2017; Joudeh y Linke, 2022).

Existen distintas formas de obtener las nanopartículas (Figura 5), sin embargo, la forma de clasificar los métodos de síntesis comúnmente es: de “abajo hacia arriba” y de “arriba hacia abajo”. El primero es un método constructivo donde a través de átomos se forman grupos de nanopartículas; los métodos de arriba hacia abajo son destructivos, en estos la reducción de un material en masa a escala nanométrica es el objetivo (Ealia y Saravanakumar, 2017).

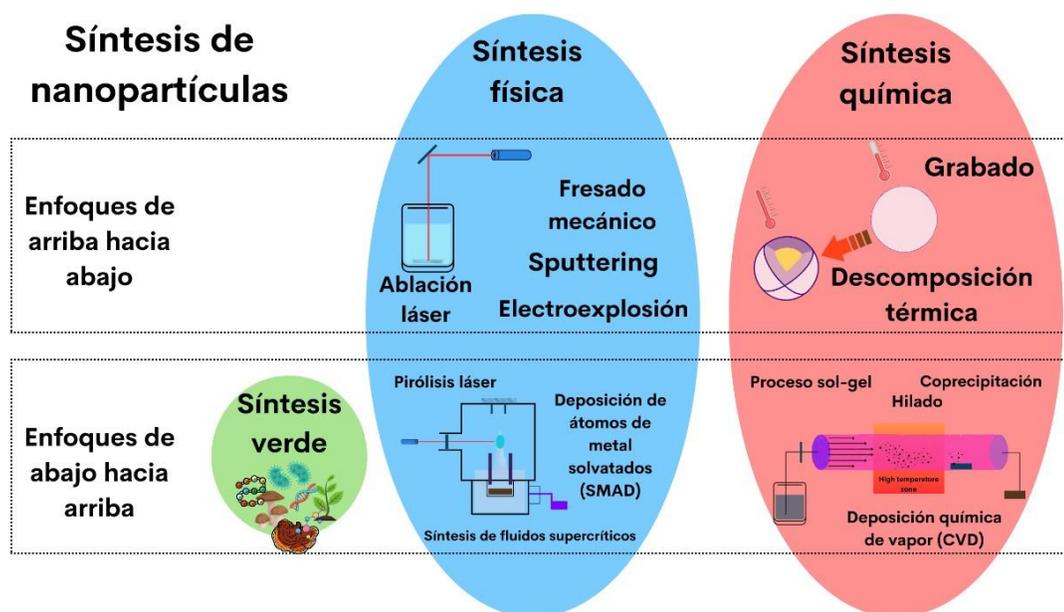


Figura 5 Clasificación de los principales métodos para obtener nanopartículas (Ealia y Saravanakumar, 2017; Khan *et al.*, 2019).

Uno de los métodos mayormente utilizado en la producción de nanopartículas, es la reducción química, un enfoque "de abajo hacia arriba" ampliamente empleado en nanotecnología (Natsuki *et al.*, 2015; Jamkhande *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2019; Sajid y Plotka-Wasyłka, 2020). Este consiste en la generación de nanopartículas a partir de precursores atómicos o moleculares mediante reacciones controladas. Técnicas como el método sol-gel, el hilado, la deposición química en fase vapor (CVD) y la pirólisis permiten la obtención de nanopartículas con características morfológicas y fisicoquímicas específicas (Ealia y Saravanakumar, 2017). Un aspecto fundamental de este proceso es el uso de agentes de control de superficie (SCA), que previenen la aglomeración y favorecen la obtención de partículas con tamaños y formas definidas (Schmidt, 2001). Estos agentes pueden desempeñar una doble función como estabilizadores y reductores, ya que regulan el crecimiento de las partículas y estabilizan las nanopartículas mediante fuerzas repulsivas, lo que permite un ajuste preciso de su estructura final.

La síntesis química de nanopartículas, como las de oro y plata, ha experimentado avances significativos, permitiendo un control preciso sobre su tamaño, morfología y propiedades superficiales (Darwich De Souza, Ribeiro Nogueira y Rostelato, 2019). Sin embargo, este enfoque implica el uso de reactivos potencialmente tóxicos, tales como el diclorodifluorometano que tiene la capacidad de dañar el ozono estratosférico (Ayalew y Jeevan, 2022), el borohidruro de sodio que es utilizado comúnmente como un reductor químico (Rahimi y Doostmohammadi, 2020) y que libera boranos que resultan contaminantes al tener contacto con cuerpos de agua y el ambiente (Fabiano, Reverberi y Varbanov, 2019), o el formaldehído que es utilizado como estabilizador en la síntesis de nanopartículas y es un irritante respiratorio (Nazarparvar-Noshadi *et al.*, 2020). Esto representa un peligro por la generación de residuos peligrosos, lo que se convierte en un riesgo tanto para el medio ambiente como para la salud humana (Vishwakarma, Samal y Manoharan, 2010; Fabiano, Reverberi y Varbanov, 2019). Estas limitaciones han impulsado un creciente interés en estrategias de síntesis biogénica y enfoques más sostenibles, con el objetivo de reducir el impacto ambiental asociado a la producción de nanomateriales.

En particular, las nanopartículas de plata han captado una atención considerable debido a su comprobada actividad antimicrobiana (Singh, Shedbalkar, Wadhvani y Chopade, 2015). Ante la necesidad de desarrollar métodos de síntesis ecológicos y sostenibles, se han explorado sistemas biológicos como bacterias, hongos y plantas para la obtención de estas nanopartículas. Estos enfoques biogénicos no solo minimizan la generación de residuos peligrosos, sino que también permiten la incorporación de compuestos orgánicos que pueden mejorar la estabilidad y funcionalidad de las nanopartículas, ampliando su potencial en aplicaciones biomédicas y tecnológicas.

1.2.3 Síntesis verde de nanopartículas

En la actualidad existen principios que guían los procesos químicos para reducir la contaminación que se puede generar en un proceso de producción (Sharma *et al.*, 2009), es por eso que hoy en día se busca generar procesos de “química verde” para producir tecnología con el menor impacto ambiental posible (Irvani, 2011; Samuel *et al.*, 2022; Ahana *et al.*, 2023).

Los sistemas biológicos se han desarrollado como buenos métodos de síntesis de nanomateriales debido a que pueden conferir propiedades como biocompatibilidad, baja toxicidad, y alta estabilidad a los productos obtenidos (Samuel *et al.*, 2022), así como representar costos menores de producción, y que el proceso sea más amigable con el ambiente (Quester *et al.*, 2013). Esto cobra relevancia debido a que el

crecimiento poblacional, que deviene en la urbanización acelerada, resulta en el deterioro constante y progresivo de nuestro planeta (Hussain *et al.*, 2016).

De esta manera, la síntesis verde, o biosíntesis de nanopartículas se realiza a partir de sobrenadantes o extractos obtenidos de algún organismo vivo. Tal como se reportó en uno de los primeros trabajos por Kowshik *et al.* (2002), donde utilizaron a *Schizosaccaromyces pombe* para sintetizar nanopartículas de CdS, destacando su caracterización y aplicación en dispositivos semiconductores; la síntesis verde es similar a la síntesis por reducción química, en la medida de que se utiliza un principio semejante donde los componentes del material precursor se fusionan para generar pequeños núcleos de agregación para obtener el tamaño de nanopartícula (Hussain *et al.*, 2016). Además, los componentes orgánicos que se encuentran naturalmente en un medio proveniente de un ser vivo, dan estabilidad al capar los núcleos de nanopartículas formados (Figura 6), evitando la aglomeración y evitando perder el tamaño nano.

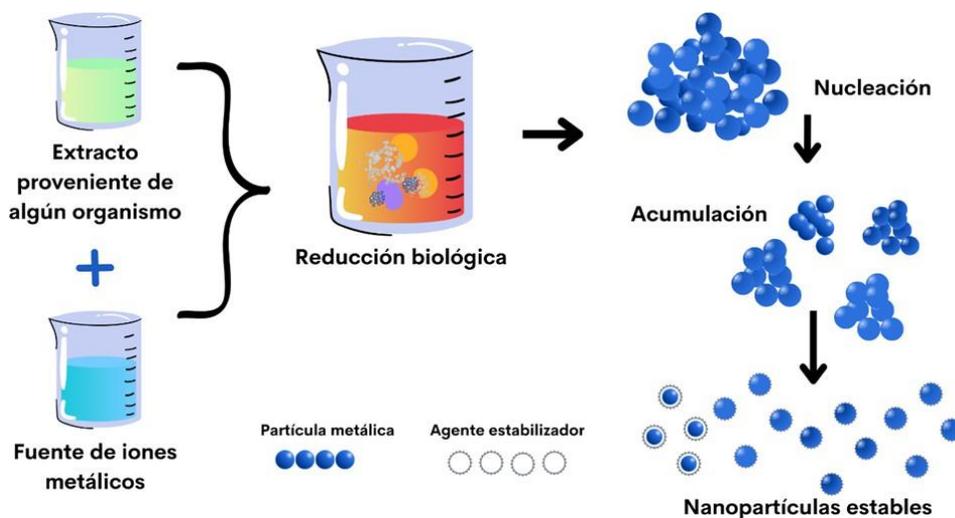


Figura 6 Síntesis verde de nanopartículas utilizando extractos provenientes de organismos vivos. Según el organismo de donde provenga el extracto, le conferirá características especiales a las nanopartículas resultantes. Estas podrían ser las que actúan como agente estabilizador (circunferencias grises).

A lo largo de los últimos años se han utilizado desde bacterias, plantas y hongos para fabricar nanopartículas (Quester *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2019). Cada tipo de material biológico se utiliza de distinta manera, por ejemplo: las células bacterianas, los extractos de las plantas, y la biomasa, sobrenadantes y/o extractos de los hongos (Quester *et al.*, 2013).

1.2.3.1 Los hongos como biofábricas para la síntesis de nanopartículas

Los hongos son organismos que poseen distintos tipos de moléculas en su interior, desde carbohidratos, proteínas, lípidos, minerales y vitaminas (El Enshasy *et al.*, 2019). Sin embargo, no todas son producidas por su propio organismo. Al ser organismo descomponedores, la mayoría poseen una digestión externa que les permite producir sustancias para reducir moléculas que puedan asimilar posteriormente para su metabolismo (Quester *et al.*, 2013).

Recientemente la investigación en miconanotecnología se ha centrado en desarrollar métodos ecológicos para obtener nanopartículas metálicas con propiedades antimicrobianas. Siendo así que un número creciente de estudios informa sobre la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas mediadas por hongos (FM-NPs) para inhibir bacterias patógenas, incluidas las cepas multirresistentes (Castro-Longoria *et al.*, 2017). De esta manera, los hongos han sido identificados como excelentes candidatos para la producción de nanopartículas, presentando así una alternativa más limpia para producir nuevos materiales con un amplio rango de aplicaciones potenciales en biomedicina e industria (Castro-Longoria *et al.*, 2017).

En este sentido, varias especies han demostrado una excelente capacidad biorreductora para producir NP metálicas, presentando una serie de ventajas sobre otros sistemas biológicos como una rápida tasa de crecimiento, simples requerimientos de nutrientes y fácil manejo de la biomasa y los cultivos. Las nanopartículas de plata (AgNPs) han sido uno de los objetivos más importantes a producir debido a su excelente actividad antimicrobiana. Las AgNPs mediadas por hongos (FM-AgNPs) han demostrado una inhibición exitosa contra los microorganismos que causan enfermedades infecciosas en humanos, incluso sobre aquellos considerados multirresistentes a los fármacos antimicrobianos convencionales. A pesar de los avances en este campo, aún queda mucho trabajo por hacer, especialmente en la búsqueda de nuevas biomoléculas que mejoren la biocompatibilidad del nanomaterial producido (Castro-Longoria *et al.*, 2017).

1.3 Antecedentes

Aunado a la información ya presentada anteriormente acerca de la multirresistencia a los antibióticos que presentan las cepas de *C. jejuni*, en un estudio realizado durante el 2020, se analizaron 237 genomas cerrados que abarcaron 22 especies de *Campylobacter* provenientes de la base de datos del NCBI y que fueron colectados alrededor del mundo, en diferentes fechas y de distintos anfitriones. El estudio reveló

18 determinantes, genes de resistencia o mutaciones puntuales en genes *housekeeping*, los cuales se asocian con la resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos, fenicoles y tetraciclinas. Asimismo, este estudio mostró que los genomas de cepas de *C. coli* y *C. jejuni*, son los que muestran un set genético con mayor resistencia a antibióticos. No sólo eso, sino que también se puede observar que aquellas cepas colectadas de animales de granja, durante los últimos 10 años (2010-2018) en Norteamérica, son aquellas que presentan una mayor tasa de multiresistencia (Rivera-Mendoza *et al.*, 2020).

Existen estudios en donde se han utilizado las nanopartículas de óxido de zinc, plata, óxido de cobre y dióxido de titanio para inhibir el crecimiento de *C. jejuni* (Xie *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2019). Se ha demostrado la acción del óxido de zinc utilizando concentraciones mínimas inhibitorias que van de 25 a 50 µg/mL para actuar como un bactericida. Aunado a lo anterior, se logró ver a través de un análisis de expresión génica, que los niveles de expresión de los genes *kata*, *ahpC* y *dnaK*, los cuales codifican para una catalasa, peroxidasa y chaperona, respectivamente, aumentan con la exposición a las nanopartículas metálicas. Los productos de los primeros dos genes actúan frente al estrés oxidativo, y el último en respuesta contra del estrés general de la bacteria (Xie *et al.*, 2011). Esto cobra particular importancia debido a que las enzimas catalasa y peroxidasa tienen efecto frente a la presencia de radicales libres, así como especies reactivas de oxígeno que pueden afectar diversas estructuras de la célula bacteriana (Betancur-Henao *et al.*, 2016). Por otro lado, la proteína chaperona DnaK actúa como un sensor de estrés molecular frente al mal plegamiento de proteínas (Christensen *et al.*, 2022). Dado que una de las interacciones bactericidas de las NPs es interferir con los ribosomas (Shih *et al.*, 2023), la activación de este mecanismo cobra sentido como una respuesta de la bacteria frente al estrés.

Estudios recientes han demostrado que las nanopartículas de plata presentan una alta actividad inhibitoria contra *Campylobacter*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) en un rango de 3.125 a 6.25 µg/mL (Duffy *et al.*, 2018). Asimismo, se ha confirmado la eficacia del óxido de zinc contra *C. jejuni*, mientras que el óxido de cobre también ha mostrado efectos antimicrobianos favorables, aunque con variaciones entre cepas, lo que sugiere su potencial para el control de esta bacteria (Duffy *et al.*, 2018). Además, este estudio enfatiza la influencia de las condiciones ambientales en la estabilidad y comportamiento de las nanopartículas, señalando que pueden agregarse, disolverse, o permanecer en estado aislado, factores determinantes para comprender su mecanismo de acción sobre los microorganismos (Duffy *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que la evidencia presentada en los trabajos antes listados parte desde la síntesis inorgánica de las nanopartículas utilizadas para el control de *C. jejuni*, lo cual abre la brecha para proponer

un método de síntesis que sea amigable con el ambiente, dada la necesidad actual que tenemos en el mundo entorno a la contaminación ambiental y el manejo de residuos que deterioran al ambiente.

1.4 Justificación

La creciente resistencia a los antibióticos por parte de distintas especies y cepas de *Campylobacter* representa un gran riesgo para la salud de los seres humanos, por lo tanto, es necesario desarrollar alternativas para combatir a este patógeno transmitido por los alimentos y, además, asegurar que el desarrollo tecnológico no represente un gran impacto al ambiente. Es por ello que, en este trabajo, se evaluaron las nanopartículas metálicas utilizando la síntesis verde, para determinar su capacidad antibacteriana y su uso potencial para el control de *Campylobacter*.

1.5 Hipótesis

El extracto intracelular del hongo *Ganoderma sessile* fungirá como agente reductor y agente estabilizante para obtener nanopartículas metálicas de plata y óxido de cobre a las que el patógeno transmitido por los alimentos *Campylobacter jejuni* será susceptible.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Determinar el efecto de nanopartículas metálicas biosintetizadas, con el uso del hongo *Ganoderma sessile*, sobre el crecimiento e integridad celular en el patógeno transmitido por los alimentos *Campylobacter jejuni*.

1.6.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata y nanopartículas de óxido de cobre utilizando al

hongo *Ganoderma sessile*.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata y las nanopartículas de óxido de cobre para la inhibición de *Campylobacter jejuni*.
- Obtener la ultraestructura celular de *C. jejuni* antes y después de la exposición a las nanopartículas de plata y nanopartículas de óxido de cobre.
- Evaluar la susceptibilidad de aislados de alimentos, y clínicos, a las nanopartículas metálicas.
- Describir el perfil metabolómico del extracto de *Ganoderma sessile*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo de *Campylobacter jejuni*

Para insertar la numeraciónLa cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 (McDermott *et al.*, 2004) fue proporcionada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (*USDA: U.S. Department of Agriculture*) a través de la Dra. Beatriz Quiñones. Se cultivó a *C. jejuni* ATCC 33560 en placa de agar basal anaerobio (ABA) suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada estéril. Se incubó dentro de bolsas plásticas selladas herméticamente con una atmósfera microaeróbica (10% de hidrógeno y 10% de dióxido de carbono, balanceado con nitrógeno (INFRA, Ensenada, Baja California, México)) durante 48 horas.

2.2 Cultivo de *Ganoderma sessile* y obtención de extracto

El hongo *Ganoderma sessile* (cepa CDM1-Gs1) fue obtenido de la colección de cepas de laboratorio del Departamento de Microbiología (CICESE, Ensenada, México), y se cultivó en cajas de Petri con medio agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 30°C durante 4 días. Posteriormente se tomaron trozos circulares, generados con la boquilla de un tubo Falcón de 15 mL, del micelio obtenido en placa y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo papa dextrosa (PDB). Se incubaron a 30°C con 120 RPM de agitación durante 1 semana para obtener el micelio del hongo. Se recuperó la biomasa y se lavó con agua destilada. Para obtener los componentes intracelulares del hongo, en un extracto acuoso, el micelio se maceró en un mortero de ágata con agua desionizada en proporciones de (1:1) (p/v). Después, se filtró con filtros Whatman de 0.45 µm utilizando una bomba de vacío. Posteriormente se filtró nuevamente el extracto utilizando jeringas de 50 mL y un filtro de 0.2 µm. Finalmente, el extracto se guardó en viales de vidrio a 4°C.

2.3 Síntesis de nanopartículas metálicas

Los precursores metálicos fueron: nitrato de plata (AgNO_3) de Sigma-Aldrich (101510) y sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) de Sigma-Aldrich (102780). Se prepararon soluciones de nitrato de plata a

1 mM y de sulfato de cobre a 15 mM. Asimismo, se preparó solución de hidróxido de sodio (NaOH) a 100 mM. Se colocó extracto acuoso intracelular (EAI) de *G. sessile* con solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en una proporción 1:3 (v/v) (EAI: CuSO_4), y con solución de AgNO_3 en una proporción 1:1 (v/v) (EAI: AgNO_3). A cada una de las mezclas se les modificó el pH utilizando el NaOH hasta llegar a un valor de 8. Posterior a esto, las mezclas se incubaron a 60°C durante 72 horas en oscuridad. Esto fue una modificación de lo reportado en los trabajos de Murillo-Rábago *et al.*, 2022, y Flores-Rábago *et al.*, 2023).

2.4 Ensayos de inhibición del crecimiento de *C. jejuni* con nanopartículas metálicas

Para probar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas biosintetizadas se realizó un primer ensayo contra la bacteria. Se tomó un cultivo fresco en placa de *C. jejuni* ATCC 33560 y se realizó una suspensión bacteriana en caldo Bolton medida a 600 nm (OD_{600}) de longitud de onda hasta llegar a una densidad óptica de 0.8. Posteriormente, las nanopartículas fueron concentradas para eliminar el medio acuoso en el que se encontraban suspendidas, y se resuspendieron en caldo Bolton (1X).

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos para hacer el cultivo de susceptibilidad de las bacterias contra las nanopartículas. En cada pocillo se mezclaron las nanopartículas y la suspensión bacteriana, a manera que el ajuste del inóculo bacteriano quedara a una densidad óptica de 0.4 OD_{600} . Y que las concentraciones de las CuONPs fuesen: 56.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 28.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 14.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 3.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para las AgNPs fuesen: 11.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En la fila A se colocó un control negativo conteniendo 150 μL de nanopartículas resuspendidas en caldo Bolton. Las filas B a G contendrán 150 μL de volumen final con la combinación de nanopartículas y suspensión bacteriana. En la fila H se colocó el control positivo, conteniendo 150 μL la suspensión bacteriana ajustada a densidad óptica de 0.4 OD_{600} y sin nanopartículas.

Después se incubaron las microplacas dentro de bolsas plásticas selladas herméticamente con una atmósfera microaeróbica durante 48 horas. Tras la preparación inicial, se realizó el estampado de los cultivos de cada pocillo utilizando el replicador de microplacas. Este dispositivo se sumergió durante 5 segundos dentro de los pozos en la placa de 96 pocillos y, enseguida, se colocó sobre una placa Petri con ABA y sangre de carnero al 5% durante 5 segundos. Una vez completado este paso, las muestras se

incubaron dentro de bolsas plásticas selladas herméticamente con una atmósfera microaeróbica durante 48 horas.

Posteriormente, las nanopartículas se concentraron por centrifugación a 252 \times g durante 10 min para eliminar el medio acuoso en el que estaban suspendidas, y se resuspendieron en caldo Bolton (1x) a una concentración de 26 μ g/mL para las nanopartículas de plata y 1 mg/mL para las nanopartículas de óxido de cobre. Los ensayos de inhibición del crecimiento se realizaron utilizando frascos de cultivo celular ventilados T-25 (Thermo Fisher Scientific). Se añadió una suspensión de células de *C. jejuni*, que se ajustó previamente a una densidad óptica de 0.8 OD₆₀₀, y varias concentraciones de las nanopartículas de plata en una relación 1:1 (v/v) para que el inóculo inicial de la bacteria quedara a 0.4 OD₆₀₀ una vez mezclado con las nanopartículas. Las concentraciones de nanopartículas oscilaron entre 0.08 μ g/mL y 13 μ g/mL, y de las nanopartículas de óxido de cobre oscilaron entre 1 μ g/mL y 100 μ g/mL. Como control negativo se colocó una suspensión bacteriana a una densidad óptica de 0.4 OD₆₀₀ en caldo Bolton (1x) en un frasco T-25 separado sin nanopartículas. Se colocaron los frascos T-25 en bolsas de plástico y se incubaron durante 48 h a 42°C sin agitación y bajo una atmósfera microaeróbica. Después del período de incubación, se determinó el crecimiento de *C. jejuni* después de sembrar diluciones seriadas de la suspensión bacteriana en *Oxoid Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base* CM0739B (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, luego de que las placas se incubaran durante 48 h a 42°C en microaerobiosis, se realizó la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC). La concentración mínima inhibitoria se definió como la concentración de nanopartículas donde no hubo crecimiento bacteriano.

2.5 Caracterización de las nanopartículas

2.5.1 Espectroscopía UV-Vis

Una vez identificadas aquellas nanopartículas con actividad antimicrobiana, se procedió a realizar su caracterización. Primero se midió el espectro de absorbancia con un espectrofotómetro UV-Vis (JENWAY 6505) en las longitudes de onda de 200 a 700 nm. Se tomó 1 mL de reacción y se depositó en una celda de cuarzo para realizar la lectura. Así mismo se midió la absorbancia de la solución de AgNO₃, CuSO₄ y del extracto acuoso de *G. sessile*. El pico de absorbancia para las AgNPs se espera encontrar entre los 400 y 480 nm, mientras que el de las CuONPs está entre 250 y 300 nm.

2.5.2 Potencial zeta y diámetro hidrodinámico

El potencial zeta y el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas sintetizadas, fueron analizados mediante dispersión dinámica de luz con un instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Se tomó una muestra de 1 mL de AgNPs y CuONPs, y se depositó en una celda capilar plegada desechable (Malvern Panalytical).

2.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para obtener el tamaño y la forma de las nanopartículas obtenidas, se depositaron 5 μ L de cada producto de síntesis de las nanopartículas sobre rejillas de cobre cubiertas de formvar/carbón y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez que la muestra estaba completamente seca se analizó en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Hitachi 7500) a 100 kV.

Para generar los gráficos de tamaño de las nanopartículas, se capturaron imágenes de ambas con el software ImageJ versión 1.8.0 (Schneider *et al.*, 2012), y luego se analizaron los datos de tamaño de partícula utilizando el software R, versión 4.1.3 (<https://www.r-project.org/>).

2.6 Ensayo de ultraestructura

2.6.1 Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para evaluar el efecto de la exposición a nanopartículas sobre *C. jejuni*, los cultivos se incubaron en presencia de las nanopartículas de plata y de óxido de cobre a las concentraciones mínimas inhibitorias de 6.7 μ g/mL y 10 μ g/mL, respectivamente, y luego se prepararon para el análisis microscópico como se describió previamente en el trabajo de Vazquez-Muñoz *et al.* (2014). Después de la incubación durante 48 h a 42°C en condiciones microaeróbicas, las muestras se centrifugaron durante 5 min a 252 \times g para los procesos de fijación y deshidratación, seguido de 10 min a 1006 \times g durante la infiltración. Los sedimentos obtenidos se fijaron con glutaraldehído al 2% en tampón de fosfato 0.05 M durante 30 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, las células se lavaron con PBS 1 \times , se fijaron posteriormente con tetraóxido de osmio al 1% durante 2 h a 4°C y luego se deshidrataron con una serie de etanol durante 15

min a cada concentración (15, 30, 50 y 75%) y durante 30 min con etanol al 100%. Posteriormente, las muestras se infiltraron en una serie de resina-etanol a varias concentraciones (15, 30, 50, 75 y 100%) durante 15 min a cada concentración de resina y se dejaron durante la noche con resina Spurr al 100% (Science Services, Copenhagen, Dinamarca). Finalmente, las muestras se colocaron en moldes que contenían resina Spurr al 100% y se polimerizaron a 60°C durante 24 h. Después de enfriarse, las muestras se seccionaron utilizando un ultramicrotomo Leica Ultracut R (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EE. UU.). Se montaron ultracortes delgados de 70 nm en rejillas de cobre de malla 75 recubiertas con formvar/carbono y se analizaron con un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H7500) operado a 100 kV. Las secciones se examinaron sin tinción posterior para una mejor detección de nanopartículas.

2.7 Ensayos con otras especies y cepas de *Campylobacter*

Una vez determinada la CMI de las nanopartículas de plata, así como de las nanopartículas de óxido de cobre, se tomó esta concentración para evaluar la susceptibilidad de dos cepas de *C. jejuni*, dos cepas de *C. coli* y una cepa de *C. lari* (Tabla 1).

Tabla 1 Especies y cepas de *Campylobacter* utilizadas en este trabajo.

Especie	Cepa	Origen	Tamaño del cromosoma	Contenido de G+C	Plásmidos	<i>cadF</i>	PEB1
<i>C. jejuni</i>	81-176 (1864)*	Clínico	1.7 Mb	30.50%	2	1	4
	1221**	Pollo	1.77 Mb	30.31%	0	1	4
<i>C. coli</i>	2228**	Pollo	1.68 Mb	31.37%	1	1	4
	1517***	Pollo	-	-	-	-	-
<i>C. lari</i>	2100**	Clínico	1.5 Mb	29.64%	1	1	4

*El nombre original de la cepa *C. jejuni* 1864 es "81-176" (Black *et al.*, 1988), pero fue manejada como 1864 en este estudio.

**El nombre de estas cepas es RM1221, RM2228, y RM2100 (Fouts *et al.*, 2005), pero se manejaron solamente con los números en este estudio.

***No se tiene información sobre las características genómicas de esta cepa ya que no ha sido secuenciada (Miller *et al.*, 2005).

cadF y PEB01 son adhesinas que pertenecen a los factores de virulencia en *Campylobacter* (Fouts *et al.*, 2005).

Se siguió la misma metodología utilizada en el ensayo anterior donde se resuspendieron ambos tipos de nanopartículas en medio líquido Bolton (1x), y se cultivaron con un inóculo inicial de 0.4 OD₆₀₀ de absorbancia de cada una de las bacterias.

Además, se realizó un ensayo con sensidiscos con 5 antibióticos para corroborar, o complementar, la

información acerca de los aislados con los que se contaba (Tabla 2). El ensayo consistió en generar un césped de tres de las bacterias (*C. jejuni* 1864, *C. coli* 2228 y *C. lari* 2100) partiendo de una densidad óptica de 0.4 OD₆₀₀, y colocando los sensidiscos en una placa Petri de ABA.

Tabla 2 Información sobre la resistencia a los antibióticos de las cepas *C. jejuni* 1864, *C. jejuni* 1221, *C. coli* 2228 y *C. lari* 2100 (Fouts *et al.*, 2005).

Familia	Antibiótico	<i>C. jejuni</i> 81-176 (1864)	<i>C. jejuni</i> 1221	<i>C. coli</i> 2228	<i>C. lari</i> 2100
Aminocumarina	Novobiocina		S	S	R
Aminoglucósidos	Gentamicina		S	S	S
	Kanamicina		S	R	S
	Neomicina	S	S	R	S
β-lactámicos	Aztreonam		R	R	R
	Ampicilina		I	S	I
Cefalosporinas	Cefamandol		R	R	R
	Cefazolina		R	R	R
	Cefixima		R	R	R
	Cefmetazol		R	R	I
	Cefonicida		R	R	R
	Cefoperazona		R	R	I
	Cefotetán		R	R	I
	Cefoxitina		R	R	I
	Cefpodoxima		R	R	R
	Cefprozil		R	R	R
	Ceftazidima		R	R	I
	Ceftibuteno		R	R	I
	Ceftriaxona		R	S	R
	Cefuroxima		R	R	R
	Cefalotina		R	R	R
	Moxalactama		R	S	I
	Penicilinas	Mezlocilina		R	S
Penicilina			R	I	R
Piperacilina			I	S	R
Ticarcilina			I	S	I
Macrólidos	Azitromicina		S	R	S
	Clindamicina		S	R	S
	Eritromicina		S	R	S
	Tilmicosina		S	R	S
Quinolonas	Cinoxacina		S	S	R
	Enrofloxacina	S	S	S	I
	Lomefloxacina		S	S	R
	Ácido nalidíxico		S	S	R
	Norfloxacina		S	S	R
	Ofloxacina		S	S	R

	Ácido oxolínico		S	S	R
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	R	R	R	S
	Triple sulfamida		R	R	S
Tetraciclinas	Minoxiclina		S	R	S
	Oxitetraciclina	S	S	R	S
	Tetraciclina	S	S	R	S

2.8 Análisis metabolómico de *Ganoderma sessile*

2.8.1 Obtención de muestras

Se realizó el cultivo en líquido de *G. sessile* tal como se describió previamente para la obtención del EAI. Posterior a los 7 días de cultivo en líquido, se dividió en tres partes al hongo: Sobrenadante (SN), biomasa (BM) y el extracto acuoso intracelular (EAI).

2.8.2 Liofilización de las muestras

Se prepararon los tres tipos de muestras para liofilización:

- Extracto acuoso intracelular (EAI): Se tomaron 10 mL del EAI y se colocaron en dos tubos Falcon de 50 mL.
- Biomasa (BM): La biomasa lavada se centrifugó para eliminar la mayor cantidad de agua posible. Debido a que no se alcanzó un peso seco completo, la biomasa ligeramente húmeda se midió en volumen, y se distribuyó 1 mL en cada uno de tres tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- Sobrenadante (SN): Se filtró el sobrenadante con filtros de 0.2 μm y se distribuyó en tres tubos Eppendorf de 1.5 mL, con 1 mL en cada uno.

Las muestras se congelaron a -80°C durante 6 horas y posteriormente se liofilizaron en un SpeedVac Vacuum Concentrator durante 24 horas. Una vez finalizada la liofilización, las muestras secas se almacenaron en sus respectivos tubos -20°C para su conservación a largo plazo.

2.8.3 Extracción de metabolitos

La extracción de metabolitos se realizó siguiendo la metodología descrita por Meza-Villezcas *et al.* (2022), basada en el protocolo de Flores-Núñez *et al.* (2023), sin modificaciones. Las muestras liofilizadas (EAI, BM y SN) se sometieron a un proceso de extracción con una mezcla de solventes orgánicos. Brevemente, cada muestra seca se resuspendió en 500 μL de una mezcla de metanol:acetonitrilo:acetato de etilo en una proporción 1:1:1 (v/v). La suspensión se sonicó durante 30 minutos a temperatura ambiente para facilitar la extracción de los metabolitos.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C para separar los componentes insolubles. El sobrenadante se recuperó y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Los solventes se evaporaron en un sistema SpeedVac a temperatura ambiente hasta obtener los extractos deshidratados.

Los extractos secos se resuspendieron en una solución de agua y acetonitrilo (80:20 v/v) y se centrifugaron nuevamente a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar partículas insolubles. El sobrenadante libre de partículas se recuperó para su posterior análisis. Adicionalmente, se prepararon muestras de control de calidad (QC) mezclando volúmenes iguales de todos los sobrenadantes libres de partículas en un solo tubo. El blanco experimental consistió en agua desionizada estéril sin ningún tipo de inóculo.

2.8.4 Procesamiento de las muestras por LC-MS²

El lote de inyección en el espectrómetro de masas consistió en 8 viales con muestras experimentales, dos blancos experimentales (cada uno con 20 μL) y un vial con 30 μL de QC. De estos viales, se inyectaron 3 μL en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1260, equipado con columna C18 ProtID-Chip-43 II. La fase móvil consistió en ácido fórmico (FA) al 0.1% en agua para la fase A y FA al 0.1% en ACN para la fase B. Tras la separación cromatográfica, las muestras fueron analizadas en un espectrómetro de masas Agilent 65030 Q-TOF en modo positivo, con adquisición dependiente de datos (DDA) a nivel MS/MS. Como control negativo, se utilizó una solución de la fase móvil A sin muestra.

2.8.5 Identificación de metabolitos

El conjunto de datos obtenido del espectrómetro de masas en formato .d contiene la información espectral de los iones que llegan al detector de masas en cada muestra inyectada, a nivel de ionización (MS1), o de fragmentación (MS2). Estos espectros tienen asociados su respectiva masa-carga (m/z) y tiempo de retención (RT).

Se utilizó el programa MSConvert de ProteoWizard (Chambers *et al.*, 2012) para convertir los archivos en formato .d a .mzML, permitiendo su procesamiento por la plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS, Wang *et al.*, 2016; Horai *et al.*, 2010) versión más reciente V1.3.16 (<https://gnps.ucsd.edu>), bajo la aproximación de *Classical Molecular Networking* (CMN) (La información puede ser consultada en el Anexo B). A partir de los espectros de fragmentación (MS2), GNPS generó una matriz de identificación de metabolitos y una representación visual del espacio químico (red molecular). En esta red, los nodos representan metabolitos que están interconectados por ejes que reflejan la similitud entre los espectros de fragmentación, aún si no existe una anotación directa en las bases de datos (Wang *et al.*, 2016; Ojeda-González, 2023).

La red molecular se construyó utilizando el flujo de trabajo en línea de GNPS (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>), con los siguientes parámetros: una tolerancia de 0.02 Da para la masa del ion precursor y del fragmento, un filtrado de iones MS/MS dentro de +/- 17 Da de la masa del precursor, y una selección de los 6 iones fragmento más intensos en una ventana de +/- 50 Da a lo largo del espectro. Los bordes de la red se filtraron con un *cosine score* mínimo de 0.6 y al menos 4 picos coincidentes. Las conexiones entre un par de nodos se generan solo si ambos coinciden entre los 10 nodos más similares del otro. Los espectros de la red se compararon con las librerías espectrales de GNPS, aplicando los mismos filtros que a los datos de entrada. Se conservaron únicamente las coincidencias con un puntaje superior a 0.6 y al menos 4 picos coincidentes.

Partiendo de que la plataforma GNPS genera las identificaciones estructurales al comparar los espectros MS2 obtenidos directamente con lo que existe reportado en las bases de datos, se buscó enriquecer la información de la red con otras herramientas de fragmentación *in silico*. Para ello, el archivo .MGF resultante de GNPS se utilizó como fuente de datos para DEREPLICATOR+ (DR) (Mohimani *et al.*, 2018), MolDiscovery (MD) (Cao *et al.*, 2021), y Sirius ver. 5.8.1 (Dührkop *et al.*, 2019), el cual alberga múltiples herramientas de anotación *in silico*: Sirius (homónima al nombre del programa) y ZODIAC (Ojeda-González, 2023), que permiten identificar y ranquear la fórmula química con el apoyo de bases de datos,

respectivamente (Ludwig *et al.*, 2020); CSI:Finger ID que asigna estructura molecular con bases de datos (Dührkop *et al.*, 2015) (La información puede ser consultada en el Anexo B).

Una vez obtenidos los resultados de anotación en las plataformas, estos se depuraron utilizando la herramienta de análisis de datos KNIME (ver. 5.4.2) (Fillbrunn *et al.*, 2017). Las matrices resultantes se unificaron en una sola, eliminando duplicados de estructura química y priorizando los metabolitos identificados por GNPS. Para la identificación de los metabolitos, se utilizaron descriptores como estructura molecular (InChIKeys), fórmula molecular y clasificación química (superclase, clase y subclase), misma que fue obtenida mediante ClassyFire (Feunang *et al.*, 2016, <http://classyfire.wishartlab.com>) y NPClassifier (Kim *et al.*, 2021, <https://npclassifier.ucsd.edu>), utilizando un código en R (Anexo A). Esta información se organizó en una "librería espectral", una matriz de datos ordenados que contiene los descriptores mencionados para cada metabolito identificado, la cual fue filtrada por un parámetro de calidad (error de masa < 10 ppm) y no incluye elementos repetidos (a nivel SMILES).

Se utilizó Cytoscape versión 3.10.3 (Shannon *et al.*, 2003) para analizar la red del total de metabolitos identificados para *G. sessile*. Posteriormente, se seleccionó una subred correspondiente a un grupo de moléculas con significancia biológica para el grupo taxonómico de los hongos Basidiomicetos, grupo al que pertenece *G. sessile*.

Para identificar los metabolitos potencialmente responsables de la actividad antimicrobiana, se realizó un análisis de comparación estructural mediante el algoritmo de Incrustación de Vecinos Estocásticos con Distribución t (t-SNE) en Data Warrior (Sander *et al.*, 2015), para visualizar agrupamientos en los datos a partir de la proximidad de los puntos, siguiendo una metodología similar a la de Carballo-López (2024).

2.9 Tratamientos al Extracto Acuoso Intracelular (EAI) para diferenciación de metabolitos

Para complementar la identificación *in silico* de los posibles metabolitos dentro del EAI de *G. sessile*, se realizaron tratamientos similares al extracto como lo reportaron Villa-Rodriguez *et al.* (2021).

2.9.1 Efecto de la proteinasa K y la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los metabolitos intracelulares producidos por *G. sessile*

La estabilidad térmica se probó esterilizando en autoclave 5 mL de EAI a 121°C y 15 lb/in² durante 20 min. Agua desionizada sometida al mismo proceso de autoclave fue utilizada como control. Además, se probó la estabilidad del EAI frente a la proteinasa K añadiendo esta enzima a 5 mL de EAI (para alcanzar una concentración final de 100 µg/mL), seguida de una incubación a 37°C durante 30 min. Se utilizó agua desionizada estéril con la misma concentración de proteinasa K como control. Finalmente, se probó la actividad antimicrobiana del EAI tratado, por triplicado contra la cepa *C. coli* 2228 en un ensayo en placa de 96 pocillos como se describió anteriormente.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas

3.1.1 Reacción de síntesis

La reacción para la síntesis de las CuONPs se realizó utilizando una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 15 mM en una relación 1:3 (EAI: CuSO_4). Se ajustó el pH a 8 con NaOH al 100 mM. Para la síntesis de las AgNPs se utilizó una solución de AgNO_3 a 1 mM y se ajustó el pH a 8 con NaOH al 100 mM. Posteriormente, se incubaron durante 96 h a 60°C. Cabe resaltar que la reacción de CuONPs tuvo un viraje de color azul en cuanto se añadió el NaOH. Este color azul se mantuvo posterior a las 96 h de incubación. Por otro lado, la reacción de AgNPs tuvo un viraje leve a café tenue, el cual se intensificó posterior a las 96 h de incubación. Estas preparaciones se colocaron en viales de vidrio para resguardo a temperatura ambiente y sin exposición a la luz.

3.2 Caracterización de nanopartículas

3.2.1 Espectrofotometría UV-Vis

Se realizó la medición de la absorbancia con un barrido de entre 200 y 400 nm, tomando una muestra de 1 ml de las CuONPs con el pH ajustado a 8. Se observó que el pico más alto de absorbancia fue a una longitud de onda de 290 nm (Figura 7).

Para la lectura de las AgNPs, también se tomó una muestra de 1 ml y se utilizó un barrido de 200 a 700 nm. Se observó que el mayor pico de absorbancia fue a una longitud de onda de 420 nm (Figura 8).

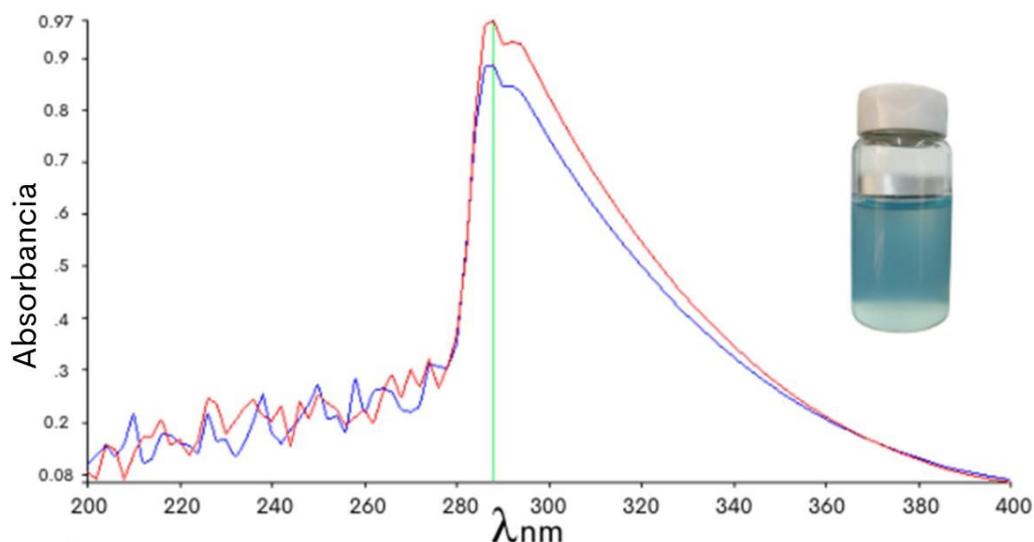


Figura 7 Espectro UV-Vis de las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) sintetizadas con el EAI de *G. sessile* a pH de 8. El pico máximo de absorbancia se encontró en 290 nm.

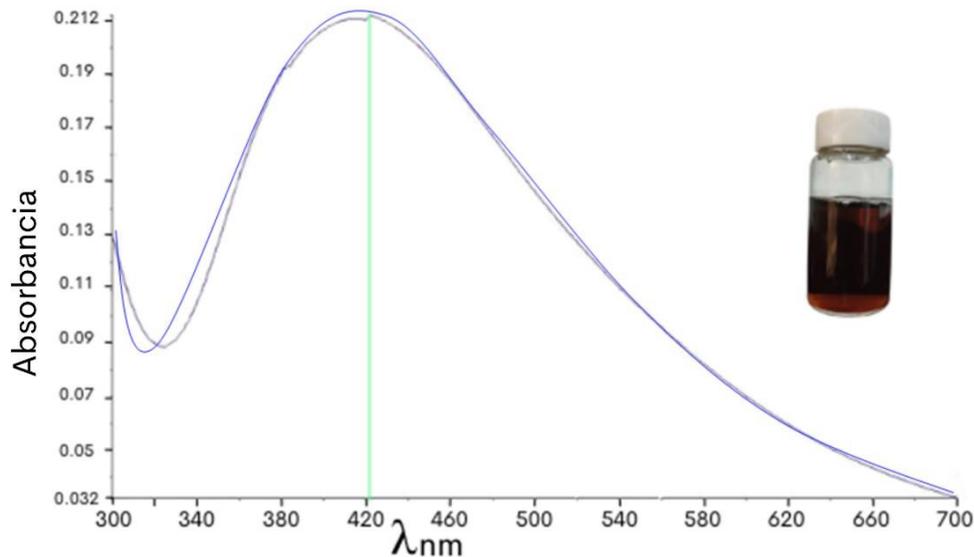


Figura 8 Espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas con el EAI de *G. sessile* a pH de 8. El pico máximo de absorbancia se encontró en 420 nm.

3.2.2 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Para esta medición, se tomaron 100 μL de ambas muestras de nanopartículas, y se aforaron a 1000 μL con agua desionizada para que se lograra realizar la lectura con el mínimo ruido posible. En la muestra de CuONPs se obtuvo un diámetro hidrodinámico de 347.2 nm y un PDI de 0.474 (Figura 9). Mientras que en la de AgNPs el diámetro hidrodinámico fue de 88.79 nm y el PDI de 0.427 (Figura 10).

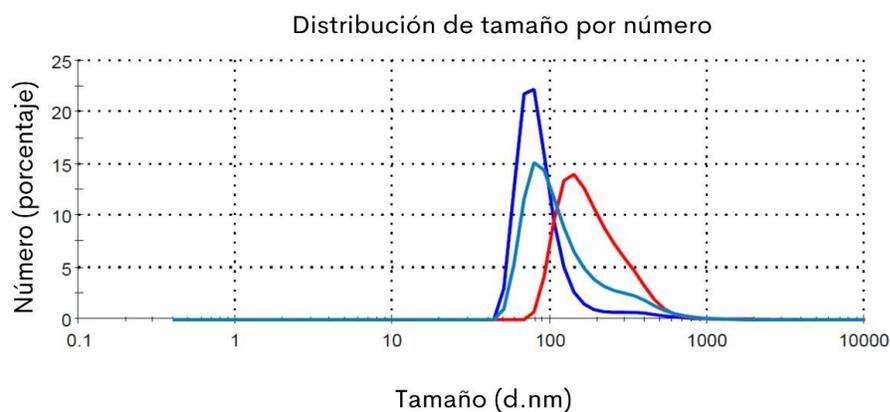


Figura 9 Dispersión de luz dinámica de las CuONPs para determinación aproximada del tamaño a través del diámetro. Índice de polidispersidad: 0.474 representando distintas poblaciones de tamaños que pueden ser observadas en el gráfico.

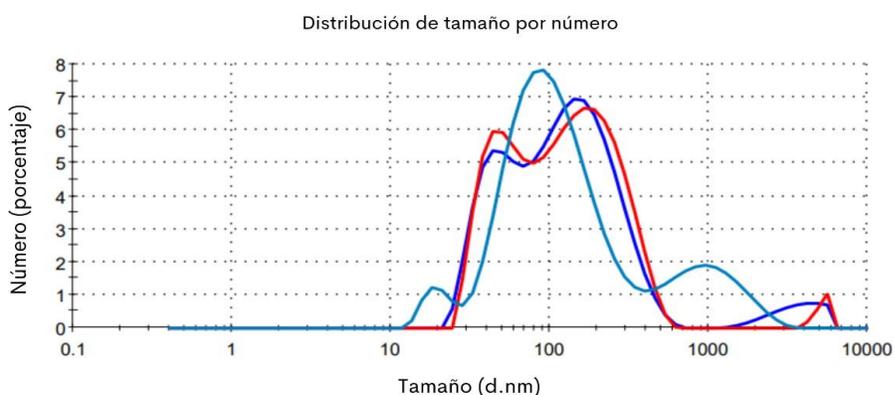


Figura 10 Dispersión de luz dinámica de las AgNPs para determinación aproximada del tamaño a través del diámetro. Índice de polidispersidad: 0.427 representando distintas poblaciones de tamaños que pueden ser observadas en el gráfico.

3.2.3 Análisis de potencial zeta

Para realizar las lecturas del potencial Z, las muestras se prepararon de la misma manera que para la lectura del diámetro hidrodinámico. La muestra de CuONPs tuvo un potencial z de -21.0 mV (Figura 11), mientras que las de AgNPs fue de -24.4 mV (Figura 12). Esto nos muestra una buena estabilidad de las nanopartículas al momento de la síntesis. Sin embargo, es importante seguir monitoreando las nanopartículas al paso de algunos meses después de haberse sintetizado, para revisar la estabilidad a través del paso del tiempo

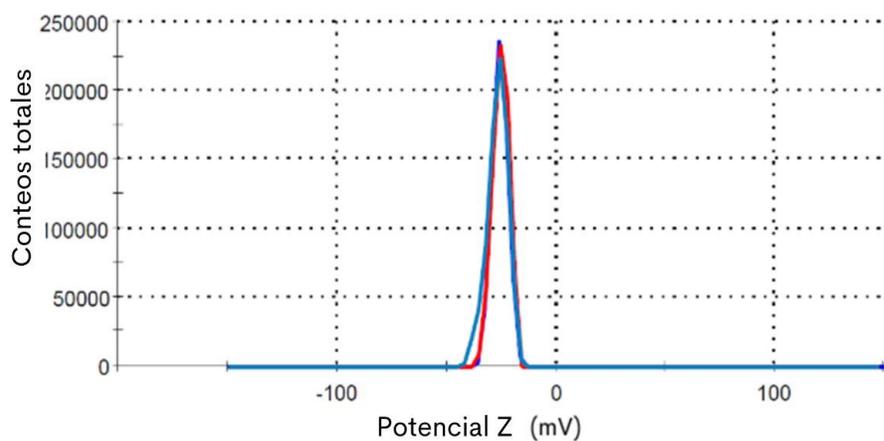


Figura 11 Potencial zeta de las CuONPs con valor de -21.0 mV

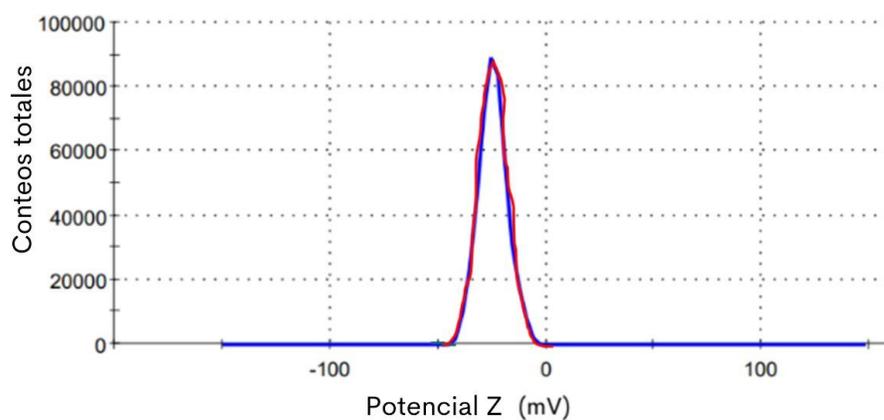


Figura 12 Potencial zeta de las AgNPs con valor de -24.4 mV.

3.2.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las muestras fueron analizadas bajo microscopía electrónica de transmisión, obteniendo formas cuasiesféricas en ambos casos. De igual manera, se puede observar una matriz de materia orgánica alrededor de las NPs (Figuras 13 y 14). El valor de la moda de tamaño para las AgNPs fue de 5 nm (Figura 13), mientras que para las CuONPs fue entre 2.5 y 3 nm (Figura 14).

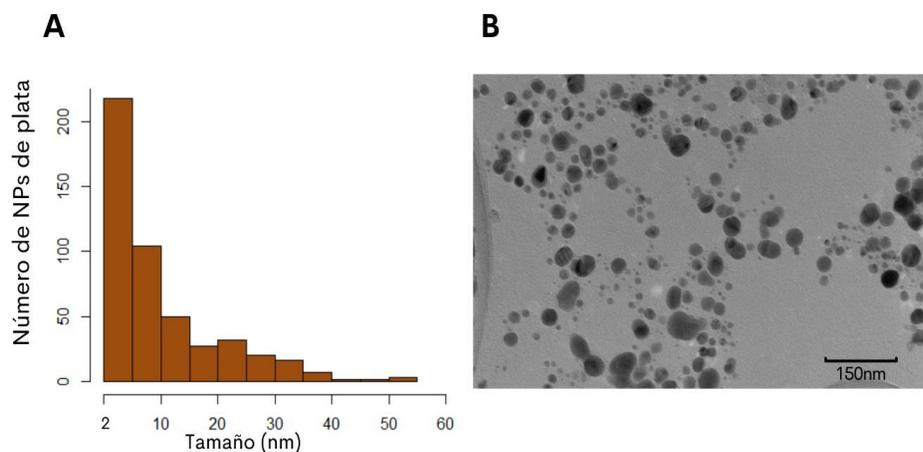


Figura 13 Caracterización de las AgNPs a pH de 8 a través de microscopía electrónica de transmisión. A) Histograma de frecuencia de los tamaños de las AgNPs; B) Imagen obtenida con una magnificación 100 kx a 80 kV, barra de escala de 150 nm.

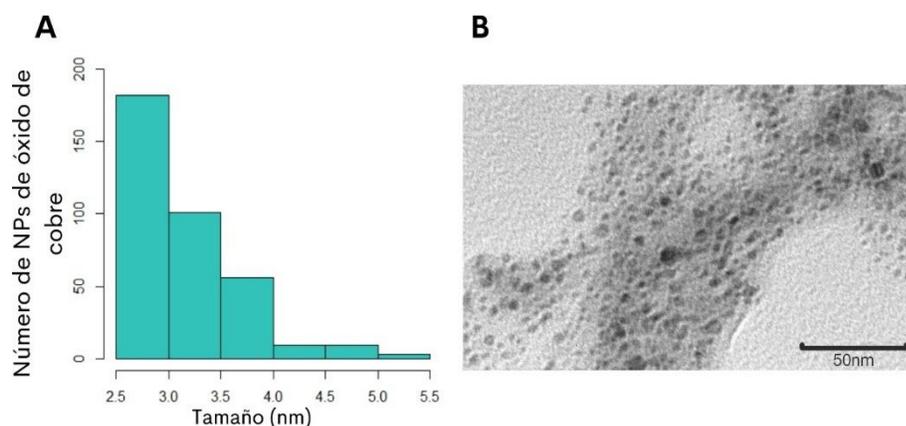


Figura 14 Caracterización de las CuONPs a pH de 8 a través de microscopía electrónica de transmisión. A) Histograma de frecuencia de los tamaños de las CuONPs; B) Imagen obtenida con una magnificación 100 kx a 80 kV, barra de escala de 50 nm.

3.3 Ensayos de inhibición en líquido de *C. jejuni* con AgNPs y CuONPs

Se realizaron 2 tipos de ensayos para observar el efecto de las nanopartículas metálicas en el crecimiento de *C. jejuni*.

El resultado del primer ensayo para determinar la actividad antibacteriana de ambos tipos de nanopartículas mostró que las bajas concentraciones de las nanopartículas fueron suficientes para inhibir el crecimiento bacteriano de *C. jejuni*, como se observa en la Figura 15. Dentro de los óvalos amarillos, se puede observar que las bacterias no crecieron a concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las nanopartículas de plata y concentraciones de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las nanopartículas de óxido de cobre.

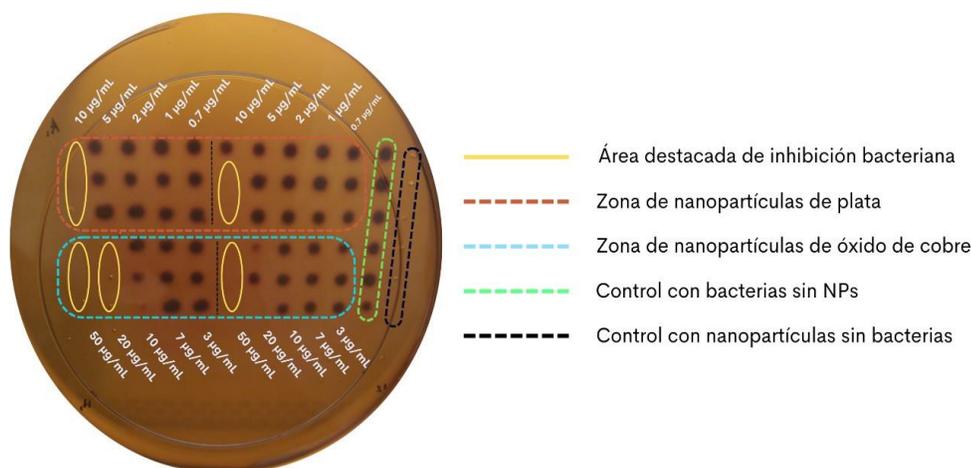


Figura 15 Placa de Agar Basal Anaerobio con el estampado del cultivo de *C. jejuni* con distintas concentraciones de nanopartículas de óxido de cobre y plata. A) AgNPs: columnas 1-5 y filas A-C concentraciones de 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por triplicado; B) columnas 1-5 y filas D-F de 54 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 27 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 13.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C) columna 11: cultivo de *C. jejuni* ATCC 33560 sin ningún tratamiento; D) columna 12: nanopartículas diluidas en medio líquido Bolton.

Para el segundo experimento, después de retirar el agua en la que se encontraban suspendidas las nanopartículas, y disolver a éstas en medio de cultivo Bolton, se incubó durante 48 h un inóculo de *C. jejuni* con absorbancia de 0.4 OD_{600} , con distintas concentraciones de las nanopartículas resuspendidas en medio.

Observamos que en el tratamiento con las AgNPs existe una clara disminución de las unidades formadoras de colonia a una concentración de 6.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 16), que resulta menor al primer acercamiento con el ensayo previo del estampado donde observamos ausencia de crecimiento bacteriano a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Por otro lado, en el efecto de las CuONPs podemos observar que a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no hay crecimiento bacteriano (Figura 17), a diferencia del ensayo del estampado, donde es hasta una concentración de 50 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donde ya no visualizamos crecimiento bacteriano.

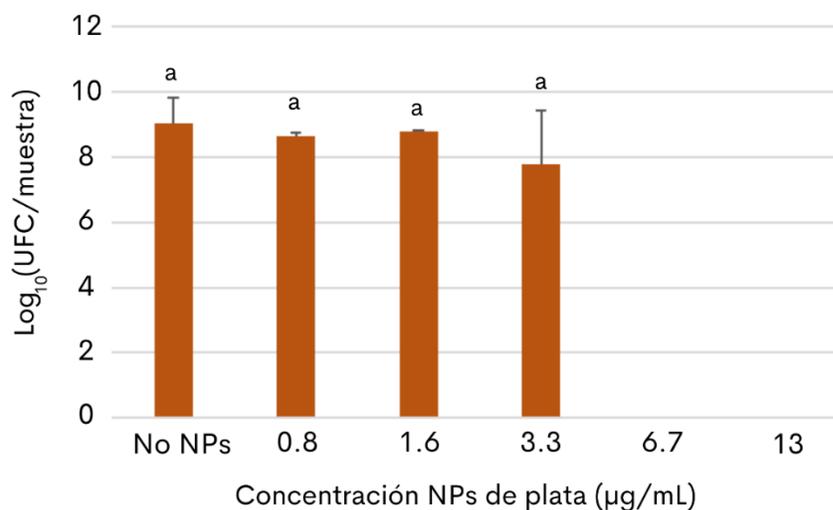


Figura 16 Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) después de 42 horas de cultivo de *C. jejuni* ATCC 33560 con distintas concentraciones de AgNPs.

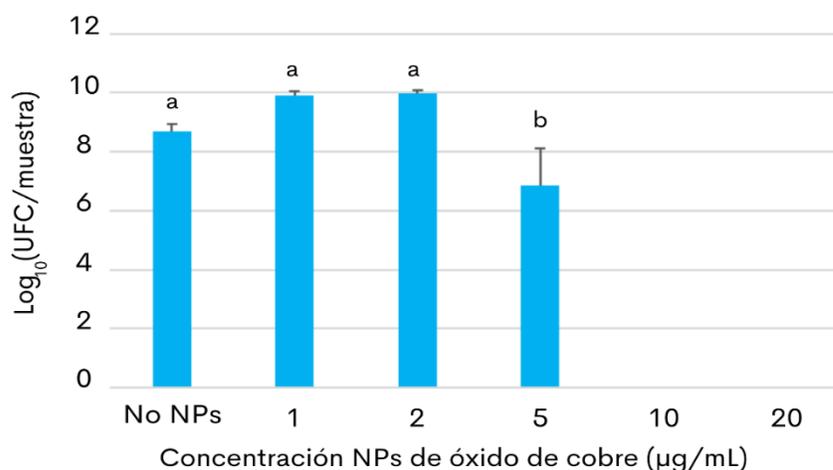


Figura 17 Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) después de 42 horas de cultivo de *C. jejuni* ATCC 33560 con distintas concentraciones de CuONPs.

De esta manera, la concentración mínima inhibitoria para nanopartículas de plata se definió como 6.7 µg/mL, y para las nanopartículas de óxido de cobre se definió como 10 µg/mL.

3.4 Determinación de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Se midió la producción de ROS para determinar si la exposición a MNPs activaba una respuesta de estrés oxidativo en las bacterias. Observamos en el caso de AgNPs, la mayor concentración probada fue de 10 µg/mL y vimos, en comparación con el control positivo, que la producción de ROS fue menor, incluso que el control negativo (Figura 18).

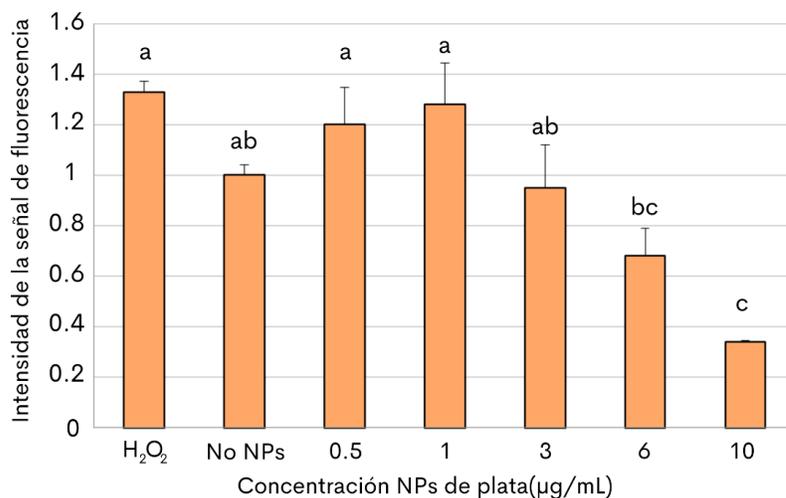


Figura 18 Producción de ROS por *C. jejuni* expuesta a AgNPs; C- = sin tratamiento, C+ = control positivo usando H₂O₂ 1 mM. Los resultados son media + DE (n = 3) (ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

En el caso de CuONPs, nuestra mayor concentración mostró la producción máxima de ROS, incluso que el control positivo. Aunque en las concentraciones de 100, 50, 20 y 10 µg/mL no vimos crecimiento bacteriano después de 48 h de incubación, el estrés producido por ROS a las 3 h de incubación fue similar a nuestro control positivo (Figura 19).

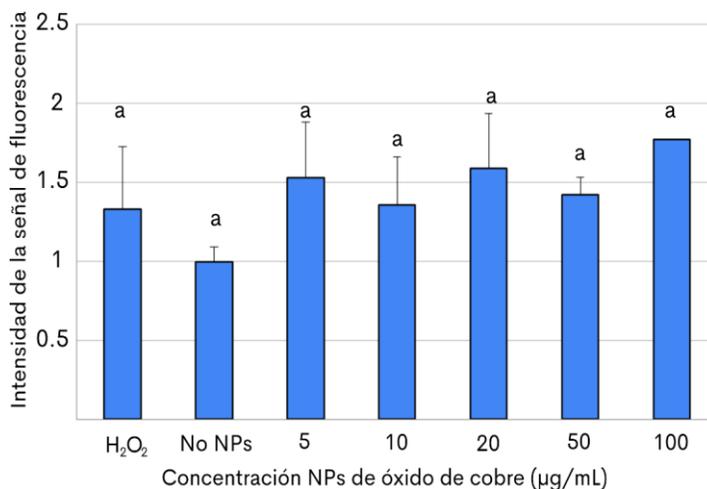


Figura 19 Producción de ROS por *C. jejuni* expuesta a CuONPs; C- = sin tratamiento, C+ = control positivo usando H₂O₂ 1 mM. Los resultados son media + DE (n = 3) (ANOVA de una vía con prueba de Tukey).

3.5 Ensayos de ultraestructura

En la figura 20 se observa que ambos tipos de NP interactúan a nivel de membrana celular con *C. jejuni*.

La presencia de nanopartículas se indica con las flechas blancas, se puede observar que rodean las

células bacterianas y también se encontraron en el interior de la célula.

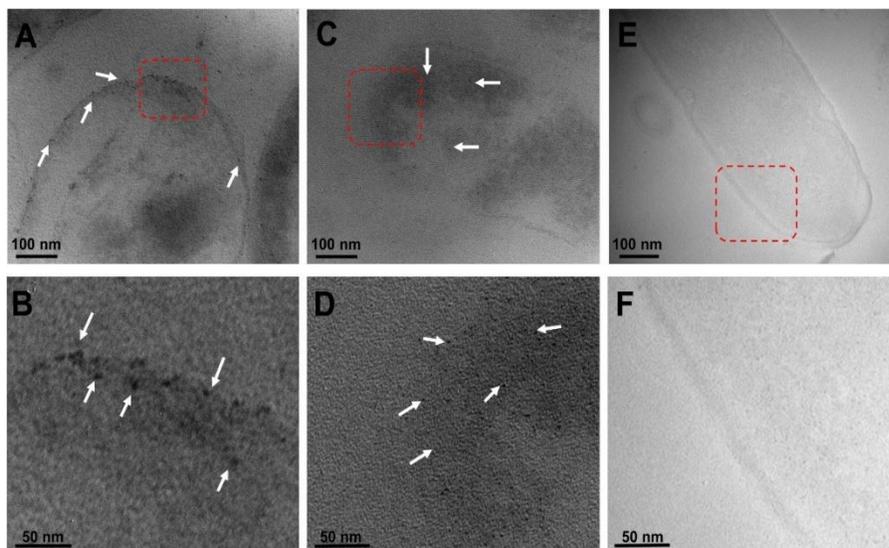


Figura 20 Micrografía de *C. jejuni* 33560 después de ser incubadas durante 24 h con AgNPs. A) Célula expuesta a las AgNPs, barra de referencia 200 nm. B) Amplificación de la zona dentro del recuadro rojo en A donde se visualiza la presencia de nanopartículas dentro de la célula bacteriana, barra de referencia 100 nm. Micrografía de *C. jejuni* después de ser incubadas durante 24 h con CuONPs. A) Células expuestas a las CuONPs, barra de referencia 200 nm. B) Amplificación de la zona donde se aprecia la presencia de nanopartículas en la membrana de la bacteria, barra de referencia 100 nm.

3.6 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas contra otras especies y cepas de *Campylobacter*

Antes de realizar el ensayo con el tratamiento de ambos tipos de nanopartículas, se realizó una prueba rápida de antibiograma con 3 de las 5 cepas de *Campylobacter* (Figura 21).

La resistencia y susceptibilidad de las cepas *C. coli* 2228 y *C. lari* 2100 fueron concordantes con lo reportado en la literatura (Tabla 2). Mientras que para la cepa *C. jejuni* 1864 se registró solamente resistencia contra uno de los antibióticos que fue el Sulfametoxazol (Tabla 3).

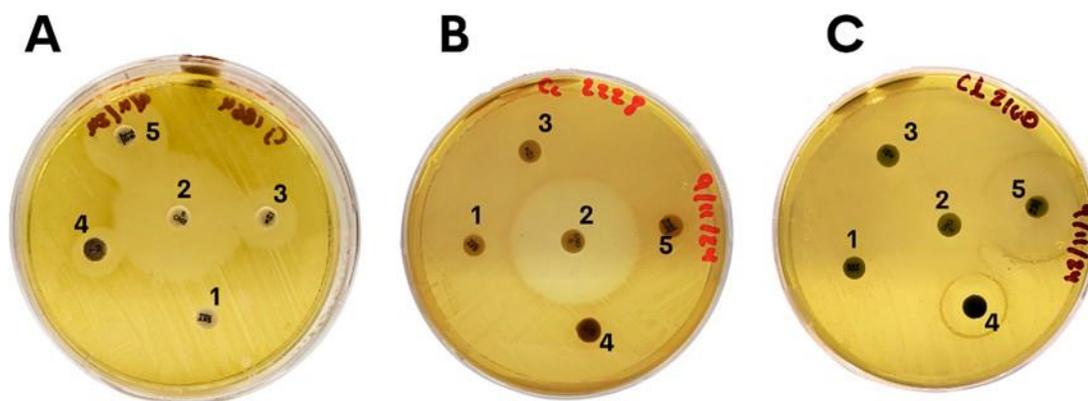


Figura 21 Antibiograma de las cepas (A) *C. jejuni* 1864, (B) *C. coli* 2228 y (C) *C. lari* 2100 con los antibióticos: Sulfametoxazol a 23.75 μg (1) de la familia de las Sulfonamidas, Enrofloxacin a 5 μg (2) de la familia de las Quinolonas, Neomicina a 30 μg (3) de la familia de los Aminoglicósidos, y Oxitetraciclina (4) y Tetraciclina a 30 μg (5) de la familia de las Tetraciclinas.

Tabla 3 Perfil de resistencia y susceptibilidad a 5 tipos de antibióticos probados en este trabajo.

Especie	Cepa	Origen	Sulfametaxol	Enrofloxacin	Neomicina	Oxitetraciclina	Tetraciclina
<i>C. jejuni</i>	81-176 (1864)	Clinico	Resistente	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible
<i>C. coli</i>	2228	Pollo	Resistente	Susceptible	Resistente	Resistente	Resistente
<i>C. lari</i>	2100	Clinico	Resistente	Resistente	Resistente	Susceptible	Susceptible

■ Aminoglicósido
 ■ Quinolona
 ■ Sulfonamida
 ■ Tetraciclina

De la misma manera que los ensayos con la cepa de referencia ATCC, se obtuvieron los resultados del tratamiento de las especies *C. jejuni* 1864, *C. jejuni* 1221, *C. coli* 2228, *C. coli* 1517 y *C. lari* 2100, con la concentración mínima inhibitoria previamente definida para ambas nanopartículas. En ambos casos todas las cepas tuvieron una inhibición del 100% (Figura 22).

Crecimiento bacteriano con el tratamiento de AgNPs y CuONPs

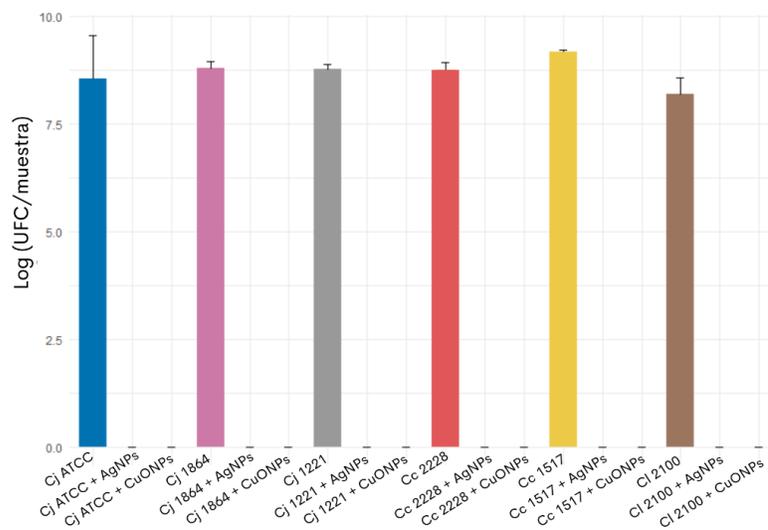


Figura 22 Unidades formadoras de colonia (UFC) después de 48 h de incubación de las nanopartículas de plata y óxido de cobre con las distintas especies y cepas de *Campylobacter* (*C. jejuni* 1864, *C. jejuni* 1221, *C. coli* 2228, *C. coli* 1517 y *C. lari* 2100).

3.7 Composición del extracto acuoso intracelular de *Ganoderma sessile*

Para obtener una lista de mayor confiabilidad, se eliminaron los metabolitos repetidos, obteniendo un total de 525 metabolitos únicos en 36 clases químicas y 237 metabolitos sin clasificación (Figura 23).

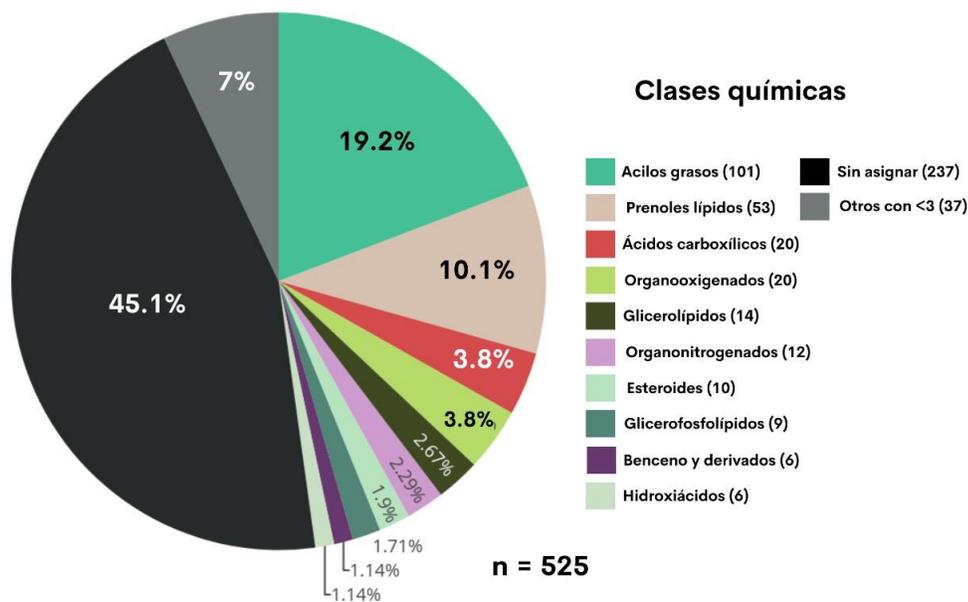


Figura 23 Distribución de las 10 clases químicas representativas de metabolitos en el hongo *Ganoderma sessile*. Las clases químicas que no están conformadas por al menos 3 metabolitos se agruparon en "Otros con <3" (7%). 237 metabolitos (45.1%) no fueron clasificados.

La red molecular construida con GNPS, y enriquecida con anotaciones de Moldiscovery, Dereplicator y Sirius, cuenta con un total de 609 nodos, que forman 48 clústeres (Figura 24A).

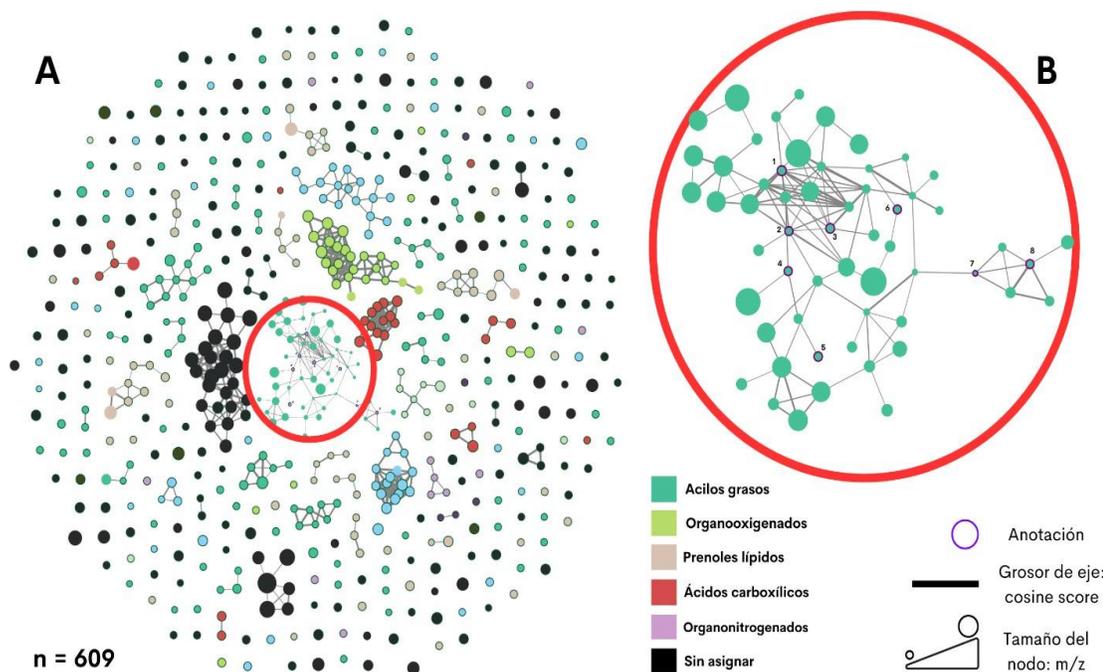


Figura 24 Representación espacial de las relaciones referentes a estructura química de los metabolitos en *G. sessile*.

A) Red molecular de GNPS enriquecida con clases químicas de *ClassyFire*. Visualización de 609 nodos, las cuales comprenden 36 clases químicas diferentes. Las clases de los nodos se asignaron conforme a la clase química más predominante en cada clúster. B) Subred molecular de acilos grasos. Aquellos nodos con un contorno color morado tienen una anotación estructural (SMILES), lo que permite una asignación putativa del nombre de la molécula: 1.- 9,10-Dihydroxy-12Z-octadecenoic acid; 2.- Linolenic Acid; 3.- Aleuretic Acid; 4.- 9(10)-EpOME; 5.- 9(S)-HpOTrE; 6.- 9-Oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid; 7.- 4-Hydroxynonenal; 8.- MoNA:790536 Linoleic acid; El grosor del eje corresponde al *cosine score* (grado de similitud entre espectros). El tamaño de los nodos indica la proporción de la relación masa-carga (*m/z*) del metabolito.

Con el objetivo de identificar moléculas representativas en el grupo taxonómico de los hongos Basidiomicetos, se seleccionó una red molecular de metabolitos identificados en el metaboloma de *G. sessile* (Figura 24B). Las redes moleculares son representaciones gráficas del espacio químico en experimentos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), donde cada nodo corresponde a un espectro molecular y las aristas (ejes) reflejan similitudes estructurales basadas en patrones de fragmentación (Vincenti *et al.*, 2020; Ometa Labs, 2024). Esta red permitió explorar la diversidad química del hongo al agrupar metabolitos en “familias moleculares” (compuestos relacionados por transformaciones bioquímicas como glicosilaciones u oxidaciones) y destacar compuestos de interés biológico.

Adicionalmente, se exploró la actividad biológica del extracto acuoso intracelular utilizado en la síntesis de nanopartículas (Figura 25). El extracto acuoso de *G. sessile* mostró actividad inhibitoria contra la cepa ATCC 33560, aunque esta fue menor en comparación con la actividad antimicrobiana exhibida por las nanopartículas metálicas. Dada su relevancia, el extracto se analizó con mayor detalle para intentar identificar los compuestos responsables de dicha inhibición.

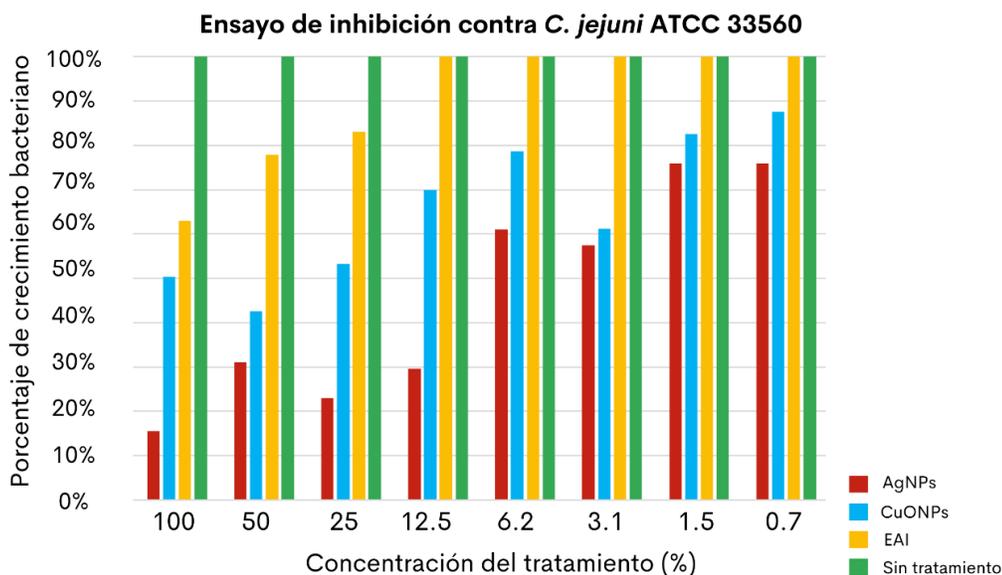


Figura 25 Ensayo de inhibición de *C. jejuni* ATCC 33560 utilizando el extracto acuoso intracelular de *G. sessile*, y las nanopartículas de Ag y CuO.

En el marco de la descripción metabolómica del hongo, se identificaron los posibles metabolitos presentes en el extracto acuoso intracelular. Entre los metabolitos clasificados químicamente, los acilos grasos representaron el grupo más abundante (17%), seguido por los organooxigenados y los prenoles lípidos, cada uno con 6.38% (Figura 26). Por otro lado, las clases químicas con menor representación fueron los ácidos carboxílicos y los compuestos organonitrogenados, con un 2.84% para cada clase química. Además, se observó que un 47.5% de los metabolitos sin asignación de clase química específica, mientras que un 17% correspondió a clases químicas con menos de 3 metabolitos.

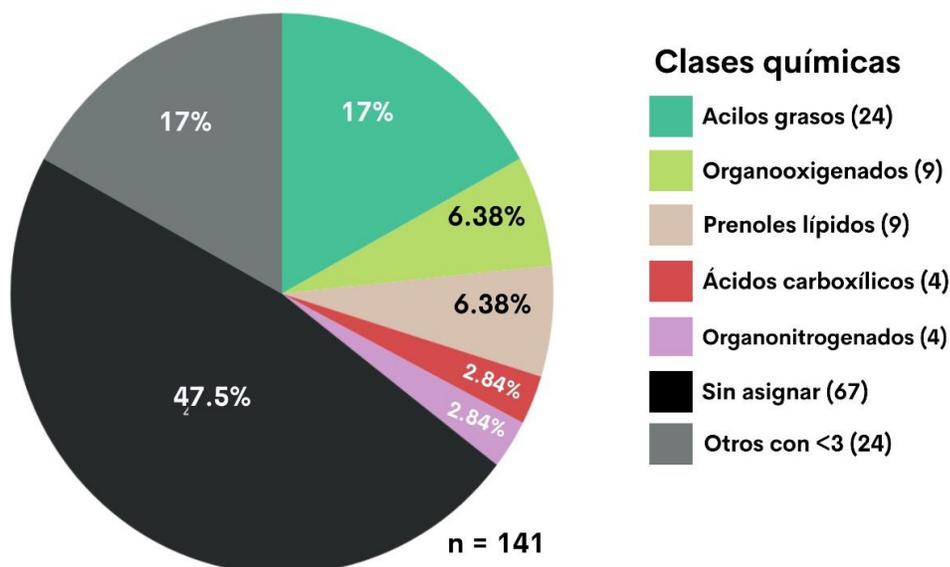


Figura 26 Distribución de las 5 clases químicas de metabolitos que componen el Extracto Acuoso Intracelular (EAI) de *Ganoderma sessile*. Las clases químicas que no están conformadas por al menos 3 metabolitos se agruparon en "Otros con <3" (17%). 67 metabolitos (47.5%) no fueron clasificados.

3.8 Estabilidad térmica y proteólisis de los metabolitos antibacterianos intracelulares producidos por *G. sessile*

Para obtener más información sobre los componentes activos responsables de la actividad antimicrobiana, el extracto acuoso intracelular de *G. sessile* fue tratado con proteinasa K (100 µg/mL), así como esterilizado en autoclave a 120°C y 15 lb/in².

El extracto de *G. sessile* tratado con proteinasa K inhibió el crecimiento de *C. coli* 2228, así como el extracto esterilizado en autoclave (Figura 27). El extracto con los dos tipos de tratamientos tuvo un rango de inhibición similar a lo que inhibe el extracto solo. Sin embargo, después de realizar un análisis de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, y una prueba posterior de Dunn (Anexo A), no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en comparación con el cultivo de la bacteria sin tratamiento, así como con agua esterilizada en autoclave, y agua tratada con proteinasa K.

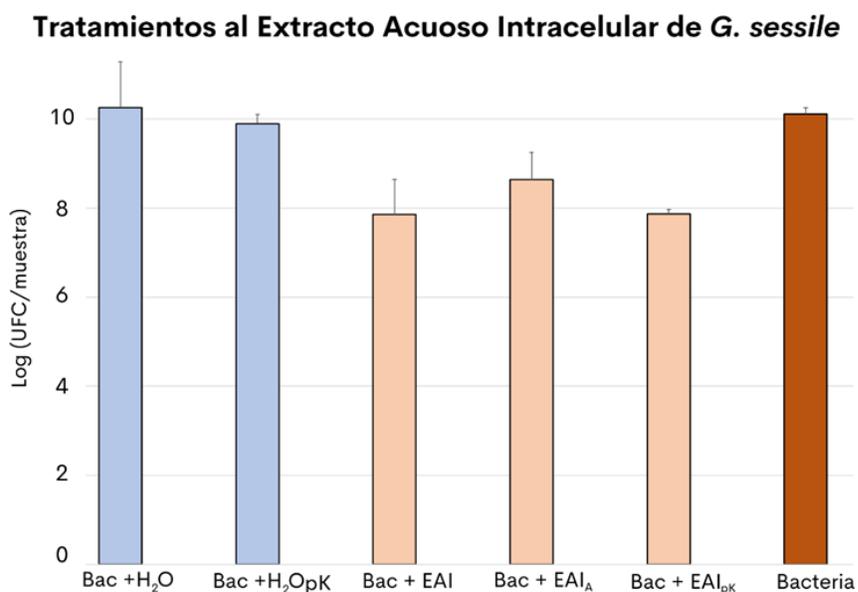


Figura 27 Efecto del calor y la proteinasa K sobre la actividad antibacteriana del EAI de *G. sessile*. H₂O_{pK} = Agua destilada estéril incubada junto con proteinasa K (100 µg/mL); EAI_A = EAI esterilizado en autoclave (120°C y 15 lb/in²); EAI_{pK} = EAI incubado con proteinasa K (100 µg/mL).

3.8.1 Potenciales compuestos con actividad antibacteriana producidos por *G. sessile*

El t-SNE contrastó la estructura de los metabolitos encontrados en el EAI de *G. sessile* con aquellos reportados por la FDA con actividad antibacteriana conocida (Figura 28). El análisis reveló al menos 4 metabolitos con estructura similar a otros compuestos con actividad antimicrobiana, lo que sugiere que también podrían compartir esta actividad.

El metabolito 1, identificado como "647.45_26.08" en nuestro estudio, no coincidió con un compuesto específico en PubChem pero comparte similitudes estructurales con la Mupirocina reportada por la FDA.

El metabolito 2, identificado como "4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic_acid" en nuestro estudio, corresponde a "4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid" en PubChem y exhibe similitud estructural con el Doconazol reportado por la FDA. El metabolito 3, identificado como "[4-(2,4-dimetil-1,3-tiazol-5-carbonil)piperazin-1-il]-tiofen-2-ilmetanona" en nuestro estudio, corresponde a "[4-(2,4-Dimetil-1,3-tiazol-5-carbonil)piperazin-1-il]-tiofen-2-ilmetanona" en PubChem y comparte similitud estructural con el Metronidazol reportado por la FDA. El metabolito 4, identificado como "Fucilina" en nuestro estudio, corresponde a "H-DL-Phe-DL-Asn-DL-Glu-DL-Phe-DL-Val-NH₂" en PubChem y muestra similitud estructural con la Capreomicina reportada por la FDA.

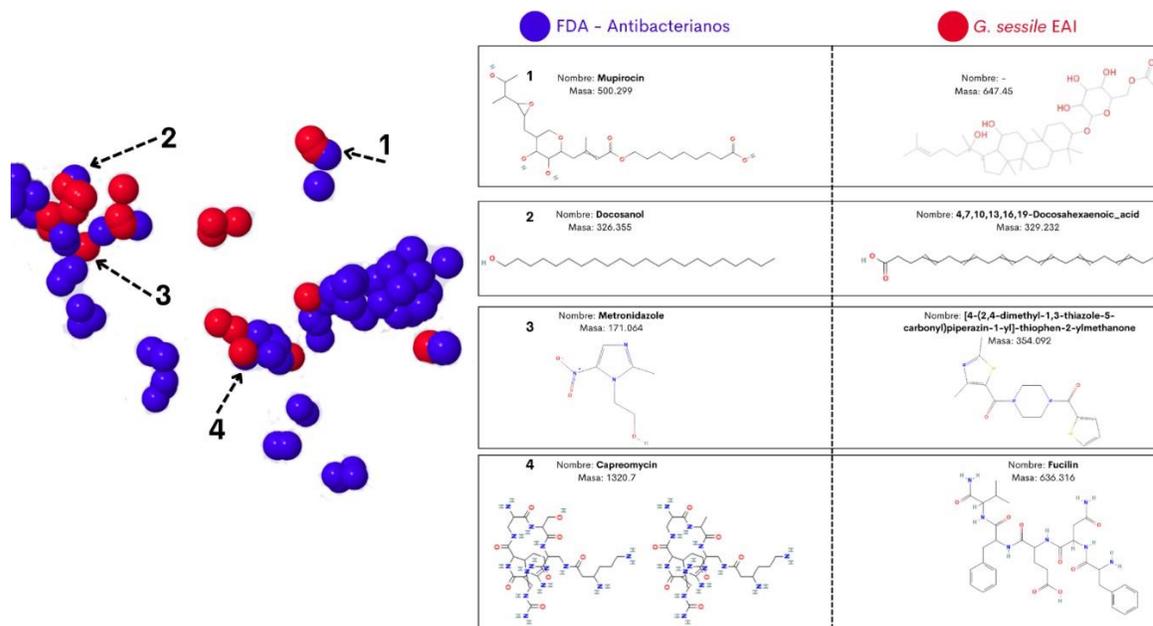


Figura 28 Comparación de estructuras de metabolitos utilizando una proyección t-SNE, alineando aquellos identificados en este estudio con candidatos reportados por la FDA que exhiben actividad antibacteriana. Las estructuras seleccionadas se indican con flechas negras y están numeradas del 1 al 4. El panel izquierdo muestra las moléculas reportadas por la FDA, mientras que el panel derecho presenta los metabolitos del extracto acuoso intracelular (EAI) de *G. sessile*. La proyección se generó a partir de SMILES utilizando Data Warrior.

Capítulo 4. Discusión

Las infecciones por *Campylobacter* se abordan como un problema importante en todo el mundo. Esto no solo se debe a la incidencia reportada, con aproximadamente 550 millones de personas que padecen campilobacteriosis (Kreling *et al.*, 2020), sino también a que afecta directamente a los países de ingresos bajos y medianos bajos (OMS; Dunn *et al.*, 2018). Estudios recientes subrayan el creciente desafío de la resistencia a los antibióticos en cepas de *Campylobacter* (Rivera-Mendoza *et al.*, 2020; Neustaedter *et al.*, 2023) y el dramático aumento de este problema asociado con la movilidad y la naturaleza infecciosa de determinantes como la flexibilidad del genoma bacteriano de este grupo de bacterias (Klemm *et al.*, 2018). Varios estudios han investigado el potencial antimicrobiano de compuestos naturales y extractos de plantas contra *C. jejuni*. Por ejemplo, el estudio de Castillo *et al.* (2011) demostró los efectos inhibidores de extractos de especies de plantas comestibles o medicinales como *Acacia farnesiana* y *Opuntia ficu-indica* contra *C. jejuni*, lo que sugiere una vía prometedora para los agentes antimicrobianos naturales.

Por otro lado, sabemos que actualmente los nanomateriales se utilizan en el campo de la medicina (Silva, 2004) como alternativa contra patógenos multirresistentes a antibióticos (Seil y Webster, 2012; Mba y Nweze, 2021). Específicamente las nanopartículas metálicas poseen propiedades para eliminar dichos patógenos, y esta actividad antimicrobiana puede mejorarse combinándolas con otros compuestos (Mba y Nweze, 2021). Sin embargo, es crucial considerar el importante inconveniente que acompaña a este enfoque.

Cuando hablamos de síntesis de nanopartículas, a menudo nos referimos al uso de diferentes productos químicos para diseñar y obtener estos nanomateriales. Estos métodos de síntesis se han visto restringidos debido a la toxicidad, la inestabilidad y la menor biocompatibilidad para aplicaciones biomédicas (Gahlawat y Choudhury, 2019). Las estrategias para aplicar técnicas que beneficien tanto el uso, como la reducción de los daños al ambiente y la salud, se han convertido en una prioridad en los últimos años (Gericke y Pinches, 2006; Nasrullah *et al.*, 2020).

Aunque existen numerosas formas de síntesis verde (Gericke y Pinches, 2006; Rana *et al.*, 2020), el enfoque de este trabajo se ha centrado en el uso de hongos debido a su fácil adquisición, manejo y rendimiento de biomasa. Una búsqueda rápida revela que esta estrategia ha mostrado buenos resultados en la obtención de nanopartículas metálicas para inhibir el crecimiento de diferentes patógenos (Rajakumar *et al.*, 2012; Balakumaran *et al.*, 2016; Molnár *et al.*, 2018; Mahanty *et al.*, 2019; Clarence *et*

al., 2020; Flores-Rábago *et al.*, 2023). Por lo tanto, resulta imperativo explorar esta alternativa para inhibir a *C. jejuni*, dado que, aunque algunos estudios han abordado el uso de nanopartículas metálicas contra el crecimiento de *Campylobacter* (Xie *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2018; Silvan *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2020), este enfoque basado en métodos verdes no había sido implementado previamente para combatir este patógeno.

Una de las metas al generar nanomateriales es proveerles de características necesarias para evitar su agregación (Phan y Haes, 2019), y que tengan la capacidad de ser reactivas para un efecto inhibitorio efectivo. Al realizar síntesis verde, hay distintos parámetros que deben ser adecuados, según el tipo de sistema, para asegurar dichas características (Jameel *et al.*, 2020).

En dos publicaciones anteriores al presente trabajo, se desarrolló un método de síntesis de nanopartículas de plata y de óxido de cobre, utilizando al hongo *G. sessile* (Murillo-Rábago *et al.*, 2022; Flores-Rábago *et al.*, 2023). Las condiciones y parámetros de síntesis descritas tuvieron algunas modificaciones para adecuarse al sistema donde se aplicarían para inhibir el crecimiento de *C. jejuni*. La modificación de variables como la concentración de NaOH (100 mM en el presente estudio), la temperatura y el tiempo de incubación de la reacción de síntesis (60°C por 72 h en este estudio para ambas NPs), así como el uso del extracto acuoso intracelular como agente reductor y estabilizador de las nanopartículas.

La modificación de las variables antes mencionadas nos permitió obtener las características deseables para nuestras nanopartículas (Figuras 7 – 14). La estabilidad de nuestros nanomateriales fue monitoreada de 3 a 12 meses después de su síntesis. A pesar de que se presentaron algunos cambios, éstos fueron menores y no significaron una reducción en la capacidad inhibitoria ante las bacterias.

Al considerar el uso de nanopartículas de plata contra patógenos, es conocido que este material es eficiente para inhibir el crecimiento de diferentes bacterias (Kim *et al.*, 2007; Lara *et al.*, 2010; Guzman *et al.*, 2012; Deshmukh *et al.*, 2019). Nuestro grupo de laboratorio reportó concentraciones de 1 a 5 µg/mL para inhibir el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Murillo-Rábago *et al.*, 2022). Por su parte, Silvan *et al.*, (2018) informaron concentraciones de 20 µg/mL contra *C. jejuni*. En contraste, nuestros resultados mostraron concentraciones más bajas, con una concentración mínima inhibitoria de 10 µg/mL (Figura 16) para el tratamiento contra *C. jejuni*. Por otro lado, Duffy *et al.*, (2018) reportaron concentraciones mínimas inhibitorias de 3.12 a 6.25 µg/mL utilizando nanopartículas de plata. Aunque en este último estudio se obtuvieron concentraciones más bajas, es importante destacar que dichos

nanomateriales fueron sintetizados a través de un método químico, a diferencia de nuestro enfoque basado en métodos verdes.

Las nanopartículas de cobre y óxido de cobre han demostrado eficacia en la inhibición de diversos patógenos (Bhavyasree y Xavier, 2022), y la concentración mínima inhibitoria puede variar según el mecanismo de acción empleado. En nuestro estudio, se determinó que concentraciones entre 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lograron inhibir el crecimiento bacteriano en la primera prueba de calidad (Figura 15). Sin embargo, al realizar ajustes al método de evaluación y cuantificar las unidades formadoras de colonia de *C. jejuni*, se observó que 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue la concentración en la que no se detectó crecimiento bacteriano (Figura 17).

Esta discrepancia puede estar relacionada con la naturaleza de ambas pruebas. En el caso del estamador, es posible subestimar el número de bacterias presentes en la muestra, mientras que el conteo de las unidades formadoras de colonia proporciona una aproximación más precisa y realista de la cantidad de bacterias que sobrevivieron después al tratamiento.

Aunque en nuestro trabajo previo reportamos concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para inhibir patógenos como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Flores-Rábago *et al.*, 2023), el método de determinación utilizado fue diferente en cada caso. Por lo tanto, sugerimos que es necesario comparar los resultados bajo condiciones metodológicas similares para garantizar la consistencia en la evaluación de los resultados frente a diferentes patógenos. En cuanto al estudio de Duffy *et al.* (2018), donde se reportó una concentración mínima inhibitoria de 6 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para inhibir el crecimiento de *Campylobacter*, no se especificó claramente el método empleado para determinar este valor. Además, mencionaron que no realizaron experimentos de crecimiento en sus cepas de *Campylobacter* debido a las dificultades asociadas con su cultivo. En nuestro caso, consideramos múltiples factores para el desarrollo de la prueba de conteo de unidades formadoras de colonia, como la preparación del stock de nanopartículas, lo cual fue crucial para garantizar un control preciso de la cantidad de nutrientes disueltos en la prueba, así como de la concentración exacta de nanopartículas.

Para comprender el modo de acción de las nanopartículas metálicas, el ensayo de especies reactivas de oxígeno (Figuras 18 y 19) proporcionó información clave. Esto se debe a que ambos tipos de nanopartículas pueden ejercer su actividad antibacteriana a través de mecanismos distintos. En el caso de las nanopartículas de plata, en concentraciones de 10 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el ensayo *in vitro* mostró la ausencia de crecimiento bacteriano (Figura 16), lo cual coincidió con los valores mínimos de producción de especies reactivas de oxígeno (Figura 18). Este resultado sugiere que, después de 3 horas de incubación con el

tratamiento de nanopartículas, la acción bactericida impidió la supervivencia de bacteria, lo que a su vez evitó la generación de estrés oxidativo y, por ende, la producción de especies reactivas de oxígeno.

Por otro lado, en la mayor concentración de nanopartículas de óxido de cobre, se observó una producción máxima de especies reactivas de oxígeno (Figura 19). En contraste con la prueba de nanopartículas de plata, el tratamiento con nanopartículas de óxido de cobre (Figura 17) mostró producción de especies reactivas de oxígeno en todas las concentraciones evaluadas después de las 3 horas de exposición. Sin embargo, según nuestro análisis estadístico (ANOVA de una vía y prueba de Tukey) no se encontraron diferencias significativas en la producción de especies reactivas de oxígeno en ninguno de los niveles de concentración (Figura 19). Este fenómeno de alta producción de ROS con todas las concentraciones utilizadas puede deberse a que, a diferencia de las nanopartículas de plata, el óxido de cobre no ejerce un efecto inhibitorio inmediato sobre las bacterias. Tal como lo reportaron Shehabeldine *et al.* (2022), quienes observaron un efecto bactericida después de 6 a 8 horas al tratar bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Staphylococcus aureus* con nanopartículas de óxido de cobre. Además, múltiples bacterias poseen mecanismos para contrarrestar el cobre libre, como vías metabólicas, enzimáticas o de resistencia a metales pesados tóxicos (Brown *et al.*, 1992; Rademacher y Masepohl, 2012; Arguello *et al.*, 2013).

Como se observa en la figura 20, existe una interacción entre ambos tipos de nanopartículas metálicas y el cuerpo celular de *C. jejuni*. El hecho de que las nanopartículas ejerzan efectos sobre la membrana bacteriana (Figura 20 A-B) como en el interior de la célula (Figura 20 C-D), sugiere un mecanismo de acción dual. Tal como se menciona en el trabajo de Dayem *et al.* (2017), la generación de estrés oxidativo es un factor clave en la actividad de las nanopartículas metálicas, desempeñando un papel crucial para la toxicidad inducida. Esta idea es respaldada por Balakumaran *et al.* (2016), quienes, al explorar la síntesis de nanopartículas metálicas mediante hongos, observaron daños a nivel celular similares a los reportados en nuestro estudio.

Tras demostrar la efectividad de las nanopartículas metálicas para inhibir el crecimiento de la cepa de referencia *C. jejuni* ATCC 33560, el análisis se extendió hacia otras especies de *Campylobacter* provenientes de aislados clínicos y de pollo (Tabla 1). Cabe destacar que la mayoría de estas cepas presentan un perfil de multirresistencia a antibióticos (Tabla 2), siendo *C. coli* 2228 la cepa con mayor resistencia antimicrobiana (Figura 21 B).

La cepa *C. jejuni* 81-176 proviene de un aislado obtenido de una infanta de 9 años durante un brote bacteriano en Minnesota, E.U.A., asociado al consumo de leche bronca (Korlath *et al.*, 1985). Posteriormente, esta cepa fue inoculada a 111 participantes voluntarios de un estudio (Black *et al.*, 1988), de donde se aisló la cepa *C. jejuni* 1864. Esta última cepa mostró susceptibilidad a 4 de los 5 antibióticos que probamos en este trabajo (Tabla 3).

Una de las cepas más relevantes en este estudio fue *C. coli* 2228, obtenida de pollo contaminado (Fouts *et al.*, 2005). Esta cepa destacó por ser la que presenta mayor resistencia a antimicrobianos en nuestro trabajo (Tabla 2). Además, en un estudio reciente se reportó que la triptantrina, un alcaloide de origen herbal utilizado como agente antimicrobiano, requirió una concentración de 12.5 μM para inhibir a esta *C. coli* (Iwata *et al.*, 2023), una concentración relativamente mayor que la necesaria para inhibir a *C. jejuni*, pero menor que la requerida para *C. fetus*.

Por otro lado, la cepa *C. lari* 2100 fue aislada en 1985 de una infanta de 8 meses de edad en Colorado, E.U.A, quien presentó diarrea durante dos semanas (Tauxe *et al.*, 1985). Esta cepa posee un perfil de multirresistencia a antibióticos amplio, lo que la ha catalogado como una cepa difícil de tratar y “emergente”, dado que esta especie se asocia comúnmente con animales marinos, particularmente almejas o gaviotas (Miller *et al.*, 2008).

Finalmente, la concentración mínima inhibitoria utilizada para inhibir el crecimiento de *C. jejuni* ATCC 33560 demostró ser suficiente para inhibir por completo el crecimiento bacteriano de todas las demás especies y cepas de *Campylobacter* evaluadas (Figura 22). Este hallazgo es de gran relevancia, ya que, a pesar de la multirresistencia a antibióticos y el origen clínico o alimentario de algunas cepas, las nanopartículas sintetizadas mediante un método verde resultaron ser altamente efectivas.

En la síntesis verde de nanomateriales es importante conocer la composición de los extractos utilizados para llevar a cabo la reacción. Como parte de la comprensión y descripción de las moléculas involucradas en la síntesis, se han publicado estudios en los que, además de sintetizar nanopartículas mediante métodos verdes, se analiza la composición de extractos orgánicos (Song y Kim, 2009; Filippi *et al.*, 2017; Marslin *et al.*, 2019). Este tipo de análisis se ha realizado principalmente en estudios que emplean extractos de plantas. Por ejemplo, en el trabajo de Shaik *et al.* (2017), se menciona que el uso de extractos frescos de hojas de *Origanum vulgare* incrementa el rendimiento en la obtención de nanopartículas de plata. Asimismo, Ali *et al.* (2016) reportaron que una mayor concentración del extracto acuoso de *Artemisia absinthium* resulta en una mayor concentración de nanopartículas de plata.

En el caso de la síntesis mediante el uso de hongos, Shukla e Iravani (2018, cap. 5) destacaron la importancia de conocer la naturaleza química de las moléculas presentes en los extractos fúngicos, ya que estas pueden conferir estabilidad y bioactividad a las nanopartículas sintetizadas. Basándonos en esto, después de sintetizar nuestras nanopartículas metálicas, realizamos pruebas para comparar la actividad antimicrobiana entre las nanopartículas y el extracto acuoso intracelular (Figura 25). Aunque ambas nanopartículas mostraron mayor efectividad inhibitoria contra *C. jejuni* ATCC 33560, el extracto acuoso intracelular de *G. sessile* logró inhibir aproximadamente el 40% del crecimiento bacteriano en su concentración máxima y cerca del 20% al diluirlo al 25% (Figura 25).

El género *Ganoderma* es conocido por su alta concentración de polisacáridos, lípidos y derivados, así como por la presencia de diversos metabolitos secundarios en sus distintas especies (Trigos y Suárez-Medellín, 2011; Sharma *et al.*, 2019; Viceconte *et al.*, 2021). En particular, la revisión de Baby *et al.* (2015) señala que los triterpenos, esteroides y polisacáridos son los metabolitos más abundantes en las especies de *Ganoderma*. El perfil molecular obtenido tras el análisis descriptivo de *G. sessile* reveló que los grupos más representativos en nuestra cepa son los acilos grasos y los prenoles lípidos (Figura 23). Esto coincide con lo reportado por Khadbaatar *et al.* (2024), quienes mencionan que existen diferencias significativas en la composición de metabolitos entre las especies de *Ganoderma*, particularmente en esteroides, triterpenoides, compuestos fenólicos y quinonas. Además, Biswal *et al.* (2022), sugieren que la variación en los tipos de triterpenos podría ser útil para distinguir entre especies de *Ganoderma*.

Para obtener una descripción más amplia del metaboloma de *G. sessile*, se exploró una red molecular (Figura 24A), destacándose una subred compuesta por acilos grasos (Figura 24B). Entre los elementos identificados mediante bases de datos se encuentran: 1.- 9,10-Dihydroxy-12Z-octadecenoic acid; 2.- Linolenic Acid; 3.- Aleuretic Acid; 4.- 9(10)-EpOME; 5.- 9(S)-HpOTrE; 6.- 9-Oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid; 7.- 4-Hydroxynonenal; 8.- MoNA:790536 Linoleic acid. De esta subred, resalta la presencia de ácidos grasos como el ácido linoleico, moléculas distintivas del género *Ganoderma*, tal como se reporta en el trabajo de Tokul-Olmez *et al.* (2018). Dado que nuestro enfoque es un análisis descriptivo, la abundancia de estos metabolitos enriquece la información sobre la cepa de *G. sessile* utilizada en este estudio.

Al contar con información sobre la composición metabólica de *G. sessile*, y considerando el efecto inhibitorio del extracto acuoso intracelular sobre *C. jejuni* ATCC 33560, se analizó la fracción del extracto acuoso intracelular para identificar las posibles moléculas responsables de este efecto bactericida. Se decidió evaluar la inhibición bacteriana contra la cepa *C. coli* 2228, ya que, según nuestros análisis, esta

cepa presenta el perfil de resistencia a antibióticos más amplio entre las estudiadas. Sin embargo, al realizar las pruebas y un posterior análisis estadístico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto del cultivo sin tratamiento y los tratamientos con extracto acuoso intracelular. Inicialmente, el análisis de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos arrojó un valor de $p < 0.05$ ($p = 0.02169$), sugiriendo posibles diferencias significativas. No obstante, tras aplicar la prueba de Dunn, ninguno de los pares de tratamientos mostró valores de $p < 0.05$, lo que sugiere que las moléculas responsables de la actividad bactericida podrían haber sido afectadas por la elevación de la temperatura o la acción de la proteinasa K. Esto requiere un análisis más detallado en futuros estudios.

Por otro lado, para identificar posibles candidatos responsables del efecto antibacteriano, el análisis t-SNE (Figura 28) reveló que al menos cuatro moléculas presentes en el extracto acuoso intracelular tienen una estructura química similar a moléculas reportadas por la FDA con actividad antibacteriana. Una de ellas, catalogada con la masa "647.45_26.08", presenta una estructura similar a la de los triterpenos, como los ácidos ganodéricos, los cuales han demostrado actividad antibacteriana en otras especies de *Ganoderma* (Biswal *et al.*, 2022).

Capítulo 5. Conclusiones

Este es el primer reporte en el que se han probado con éxito nanopartículas biosintetizadas, derivadas del hongo *G. sessile*, como agentes antibacterianos contra el patógeno transmitido por los alimentos *Campylobacter jejuni*, así como contra otras especies relacionadas como *C. coli* y *C. lari*. Los resultados demuestran que las nanopartículas de plata exhiben una mejor acción inhibitoria, posiblemente debido a su interacción directa con la membrana bacteriana, lo que conduce a una rápida desestabilización y muerte celular. Por otro lado, las nanopartículas de óxido de cobre exhibieron un efecto inhibitor más lento, lo que podría atribuirse a la capacidad de las bacterias para incorporar el cobre en sus vías metabólicas, ejerciendo así una actividad antimicrobiana gradual pero efectiva.

Las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas en este estudio (6.7 µg/mL para AgNPs y 10 µg/mL para CuONPs) son relativamente bajas en comparación con otros trabajos que emplean nanopartículas sintetizadas mediante métodos químicos, lo que destaca la eficacia de nuestro enfoque basado en métodos verdes. Además, estas nanopartículas demostraron ser efectivas incluso contra especies de *Campylobacter* con perfiles de multirresistencia a antibióticos, incluyendo *C. coli* 2228, que presentó la mayor resistencia antimicrobiana entre las cepas evaluadas. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que resalta el potencial de las nanopartículas biosintetizadas como una alternativa prometedora para combatir patógenos resistentes a múltiples fármacos.

Además, se exploró la composición metabólica del extracto acuoso intracelular de *G. sessile*, identificando la presencia de acilos grasos y prenoles lípidos como los grupos más representativos. Aunque el extracto acuoso intracelular mostró una actividad inhibitoria moderada contra *C. jejuni* ATCC 33560 (40% en su concentración máxima), no se observaron diferencias significativas en su efecto contra *C. coli* 2228, lo que sugiere que las moléculas responsables de la actividad bactericida podrían haber sido afectadas por las condiciones experimentales. Sin embargo, el análisis t-SNE identificó al menos cuatro moléculas con estructuras similares a compuestos reportados y aprobados por agencias reguladoras, como la FDA, con actividad antibacteriana, lo que abre nuevas vías para futuras investigaciones.

En resumen, este trabajo destaca el potencial de las nanopartículas metálicas biosintetizadas a partir de *G. sessile* como agentes antimicrobianos efectivos contra *Campylobacter*, incluso en cepas multirresistentes. Este enfoque innovador no solo ofrece una alternativa sostenible y biocompatible para el control de patógenos transmitidos por los alimentos que representan un gran desafío en el camino de

la seguridad alimentaria y la salud pública, sino que también contribuye a la reducción del uso de métodos químicos tradicionales en la síntesis de nanomateriales. Futuros estudios deberán profundizar en la identificación de los metabolitos específicos provenientes del hongo *Ganoderma* responsables de la actividad antibacteriana y optimizar las condiciones de síntesis para maximizar su eficacia.

Literatura citada

- Abraham, S., Sahibzada, S., Hewson, K., Laird, T., Abraham, R., Pavic, A., Truswell, A., Lee, T., O'Dea, M., & Jordan, D. (2020). Emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* among Australian chickens in the absence of fluoroquinolone use. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(8), e02765-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02765-19>
- Ahana, G., Manikantan, P., Aditi, C., Arun, M., Vijaya Anand, A., Balamuralikrishnan, B., & Gomathy, M. (2023). Biogenesis and green synthesis of metal nanoparticles and their pharmacological applications. *Plant Science Today*, 10(sp2). <https://doi.org/10.14719/pst.2417>
- Aleksić, E., Miljković-Selimović, B., Tambur, Z., Aleksić, N., Biočanin, V., & Avramov, S. (2021). Resistance to antibiotics in thermophilic campylobacters. *Frontiers in Medicine*, 8, 763434. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.763434>
- Alfredson, D. A., & Korolik, V. (2007). Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2), 123–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00935.x>
- Alharbi, N. S., Alsubhi, N. S., & Felimban, A. I. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 15(3), 109–124. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2022.06.012>
- Ali, M. A., Kim, B., Belfield, K. D., Norman, D., Brennan, M., & Ali, G. S. (2016). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Artemisia absinthium* aqueous extract—A comprehensive study. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.045>
- Ali, M., Ali, M., Hussain, R., Tariq, F., Noreen, Z., Toufiq, A. M., Bokhari, H., Akhtar, N., & Rahman, S. U. (2020). Highly effective visible light-activated cobalt-doped TiO₂ nanoparticles for antibacterial coatings against *Campylobacter jejuni*. *Applied Nanoscience*, 10, 1005–1012. <https://doi.org/10.1007/s13204-019-01193-0>
- Arguello, J. M., Raimunda, D., & Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 73. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00073>
- Ayalew, M., & Jeevan, T. (2022). The technology of green chemistry and its function in redox response and: Environmentally friendly technology for sustainable development: Assessment of recent findings. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 12(3), 131-144. <https://doi.org/10.4236/aces.2022.123010>
- Baby, S., Johnson, A. J., & Govindan, B. (2015). Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*, 114, 66–101. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.010>
- Balakumaran, M. D., Ramachandran, R., Jagadeeswari, S., & Kalaichelvan, P. T. (2016). In vitro biological properties and characterization of nanosilver coated cotton fabrics—An application for antimicrobial textile finishing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.011>

- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493–496. <https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4 ts.493>
- Betancur Henao, Claudia Patricia, Hernández Montes, Vanessa, & Buitrago Sierra, Robison. (2016). Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(4), 387–402. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002016000400009&lng=es&tlng=es
- Bhavyasree, P. G., & Xavier, T. S. (2022). Green synthesised copper and copper oxide based nanomaterials using plant extracts and their application in antimicrobial activity: Review. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 100249. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100249>
- Biswal, R. P., Dandamudi, R. B., Patnana, D. P., Pandey, M., & Vutukuri, V. N. R. K. (2022). Metabolic fingerprinting of *Ganoderma* spp. using UHPLC-ESI-QTOF-MS and its chemometric analysis. *Phytochemistry*, 199, 113169. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113169>
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., & Blaser, M. J. (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *Journal of Infectious Diseases*, 157(3), 472–479. <https://doi.org/10.1093/infdis/157.3.472>
- Brown, N. L., Rouch, D. A., & Lee, B. T. O. (1992). Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid*, 27(1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(92\)90005-U](https://doi.org/10.1016/0147-619X(92)90005-U)
- Bryan, F. L., & Doyle, M. P. (1995). Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *Journal of Food Protection*, 58(3), 326–344. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.3.326>
- Bustamante, V. H., Puente, J. L., Sánchez-López, F., Bobadilla, M., & Calva, E. (1995). Identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using the rpoB gene and a cryptic DNA fragment from *C. jejuni*. *Gene*, 165(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00515-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00515-8)
- Cao, L., Guler, M., Tagirdzhanov, A., Lee, Y. Y., Gurevich, A., & Mohimani, H. (2021). MolDiscovery: Learning mass spectrometry fragmentation of small molecules. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-23986-0>
- Carballo López, G. I., Ojeda González, J., Martínez García, K. D., Cervantes Luevano, K. E., Moreno Ulloa, A., & Castro Ceseña, A. B. (2024). Enhanced anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of nanoparticles loaded with a combination of Aloe vera-Moringa oleifera extracts. *Molecular Omics*, 1-30. <https://doi.org/10.1039/D4MO00195H>
- Castillo, S., Heredia, N., Contreras, J., & García, S. (2011). Extracts of edible and medicinal plants in inhibition of growth, adherence, and cytotoxin production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Food Science*, 76(6), M421–M426. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02229.x>
- Castro-Longoria, E. (2016). Síntesis ecoamigable de nanopartículas metálicas usando hongos. *Mundo Nano*, 9(16), 128-135. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2016.16.56907>

- Castro-Longoria, E., Garibo-Ruiz, D., & Martínez-Castro, S. (2017). Myconanotechnology to treat infectious diseases: A perspective. En R. Prasad (Ed.), *Fungal Nanotechnology*. *Fungal Biology* (pp. 263–284). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68424-6_12
- Castro-Longoria, E., Vilchis-Nestor, A. R., & Avalos-Borja, M. (2011). Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *83*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.035>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). BEAM (Bacteria, Enterics, Ameba, and Mycotics) Dashboard. (2024) Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/BEAM-dashboard.html>
- Cervantes-García, E. (2020). campylobacter: Emergente O reemergente. *Revista Mexicana De Patología Clínica y Medicina De Laboratorio*, *67*(3), 142–149. <https://doi.org/10.35366/96677>
- Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M. Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., ... Mallick, P. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature biotechnology*, *30*(10), 918–920. <https://doi.org/10.1038/nbt.2377>
- Christensen, S., Rämisch, S., & André, I. (2022). DnaK response to expression of protein mutants is dependent on translation rate and stability. *Communications Biology*, *5*, 597. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03542-2>
- Clarance, P., Luvankar, B., Sales, J., Khusro, A., Agastian, P., Tack, J.-C., Al Khulaifi, M. M., AL-Shwaiman, H. A., Elgorban, A. M., Syed, A., & Kim, H.-J. (2020). Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its in-vitro anticancer and biomedical applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(2), 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.12.026>
- Cör Andrejč, D., Knez, Ž., & Knez Marevci, M. (2022). Antioxidant, antibacterial, antitumor, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, and neuroprotective activity of *Ganoderma lucidum*: An overview. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.934982>
- Costa, D., & Iraola, G. (2019). Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(4), e00072-18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00072-18>
- Constantin, M., Răut, I., Suica-Bunghez, R., Firinca, C., Radu, N., Gurban, A.-M., Preda, S., Alexandrescu, E., Doni, M., & Jecu, L. (2023). *Ganoderma lucidum*-mediated green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity. *Materials*, *16*(4261). <https://doi.org/10.3390/ma16124261>
- Daruich De Souza, C., Ribeiro Nogueira, B., & Rostelato, M. E. C. M. (2019). Review of the methodologies used in the synthesis of gold nanoparticles by chemical reduction. *Journal of Alloys and Compounds*, *798*, 714-740. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153>
- Dayem, A. A., Hossain, M. K., Lee, S. B., Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi, H. Y., & Cho, S. G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(1), 120. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>

- Delaporte, E., Karki, A. B., & Fakhr, M. K. (2024). Aerotolerance of *Campylobacter* spp.: A comprehensive review. *Pathogens*, 13(10), 842. <https://doi.org/10.3390/pathogens13100842>
- Deshmukh, S. P., Patil, S. M., Mullani, S. B., & Delekar, S. D. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 954–965. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.102>
- Dowling, A. P. (2004). Development of nanotechnologies. *Materials Today*, 7(12, Supplement), 30-35. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00628-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00628-5)
- Du, Y., Wang, C., Ye, Y., Liu, Y., Wang, A., Li, Y., Zhou, X., Pan, H., Zhang, J., & Xu, X. (2018). Molecular identification of multidrug-resistant *Campylobacter* species from diarrheal patients and poultry meat in Shanghai, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1642. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01642>
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., Dorrestein, P. C., Rousu, J., & Böcker, S. (2019). SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature methods*, 16(4), 299–302. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>
- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., & Böcker, S. (2015). Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(41), 12580-12585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509788112>
- Dunn, S. J., Pascoe, B., Turton, J., Fleming, V., Diggle, M., Sheppard, S. K., McNally, A., & Manning, G. (2018). Genomic epidemiology of clinical campylobacter spp. at a single Health Trust Site. *Microbial Genomics*, 4(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000227>
- Duffy, L., Osmond-McLeod, M., Judy, J., & King, T. (2018). Investigation into the antibacterial activity of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles against poultry-relevant isolates of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Food Control*, 92, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.008>
- Ealia, S. A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*, 263(3), 032019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>
- El Enshasy, H. A., Joel, D., Singh, D. P., Malek, R. A., Elsayed, E. A., Hanapi, S. Z., & Kumar, K. (2019). Mushrooms: New biofactories for nanomaterial production of different industrial and medical applications. In R. Prasad (Ed.), *Microbial Nanobionics: Volume 1, State-of-the-Art* (pp. 87–126). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16383-9_4
- Emerich, D. F., & Thanos, C. G. (2003). Nanotechnology and medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(4), 655–663. <https://doi.org/10.1517/14712598.3.4.655>
- Fabiano, B., Reverberi, A. P., & Varbanov, P. S. (2019). Safety opportunities for the synthesis of metal nanoparticles and short-cut approach to workplace risk evaluation. *Journal of Cleaner Production*, 209, 297-308. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.161>
- Feunang, Y. D., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., Fahy, E., Steinbeck, C., Subramanian, S., Bolton, E., Greiner, R., & Wishart, D. S. (2016). ClassyFire: Automated chemical

- classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, 8(61), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y>
- Filippi, A., Mattiello, A., Musetti, R., Petrusa, E., Braidot, E., & Marchiol, L. (2017). Green synthesis of Ag nanoparticles using plant metabolites. *AIP Conference Proceedings*, 1873(1), 020004. <https://doi.org/10.1063/1.4997133>
- Fillbrunn, A., Dietz, C., Pfeuffer, J., Rahn, R., Landrum, G. A., & Berthold, M. R. (2017). KNIME for reproducible cross-domain analysis of life science data. *Journal of Biotechnology*, 261, 149-156. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2017.07.028>
- Flores-Núñez, V. M., Camarena-Pozos, D. A., Chávez-González, J. D., Alcalde-Vázquez, R., Vázquez-Sánchez, M. N., Hernández-Melgar, A. G., Xool-Tamayo, J., Moreno-Ulloa, A., & Martínez, L. P. P. (2023). Synthetic Communities Increase Microbial Diversity and Productivity of Agave tequilana Plants in the Field. *Phytobiomes Journal*, 7(4), 435–448. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-23-0001-R>
- Flores-Rábago, K.M., Rivera-Mendoza, D., Vilchis-Nestor, A.R., Juarez-Moreno, K., Castro-Longoria, E. (2023) Antibacterial activity of biosynthesized copper oxide nanoparticles (CuONPs) using *Ganoderma sessile*. *Antibiotics*, 12, 1251. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081251>
- Friedman, C. J., Neiman, J., Wegener, H. C., & Tauxe, R. V. (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In I. Nachamkin & M. J. Blaser (Eds.), *Campylobacter* (pp. 121–138). ASM Press. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20083230307>
- Forsythe, S. J. (2000). Foodborne pathogens: Bacteria. In *The microbiology of safe food* (pp. 146-171). Blackwell Science Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470999431>
- Fouts, D. E., Mongodin, E. F., Mandrell, R. E., Miller, W. G., Rasko, D. A., Ravel, J., Brinkac, L. M., DeBoy, R. T., Parker, C. T., Daugherty, S. C., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Madupu, R., Sullivan, S. A., Shetty, J. U., Ayodeji, M. A., Shvartsbeyn, A., Schatz, M. C., Badger, J. H., ... Nelson, K. E. (2005). Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biology*, 3(1), e15. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030015>
- Gahlawat, G., & Choudhury, A. R. (2019). A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. *RSC Advances*, 9(23), 12944–12967. <https://doi.org/10.1039/C8RA10483B>
- Ge, B., Wang, F., Sjölund-Karlsson, M., & McDermott, P. F. (2013). Antimicrobial resistance in campylobacter: susceptibility testing methods and resistance trends. *Journal of microbiological methods*, 95(1), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.021>
- Gericke, M., & Pinches, A. (2006). Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy*, 83(1), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.019>
- Gitahi, N., Gathura, P. B., Gicheru, M. M., Wandia, B. M., & Nordin, A. (2020). Multidrug-resistant *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* isolated from asymptomatic school-going children in Kibera slum, Kenya [version 2; peer review: 1 approved, 2 approved with reservations]. *F1000Research*, 9, 92. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21299.2>
- Gölz, G., Rosner, B., Hofreuter, D., Josenhans, C., Kreienbrock, L., Löwenstein, A., Schielke, A., Stark, K.,

- Suerbaum, S., Wieler, L. H., & Alter, T. (2014). Relevance of *Campylobacter* to public health—The need for a One Health approach. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.015>
- Gutiérrez-Santana, J. C., Toscano-Garibay, J. D., López-López, M., & Coria-Jiménez, V. R. (2020). Aptámeros acoplados a nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de infecciones microbianas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(7), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.12.004>
- Guzman, M., Dille, J., & Godet, S. (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.007>
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., Devleeschauwer, B., & World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. (2015). World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLOS Medicine*, 12(12), e1001923. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>
- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M. Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., Akimoto, N., ... Nishioka, T. (2010). MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of mass spectrometry: JMS*, 45(7), 703–714. <https://doi.org/10.1002/jms.1777>
- Horn, D., & Rieger, J. (2001). Organic nanoparticles in the aqueous phase—Theory, experiment, and use. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(23), 4330–4361. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20011203\)40:23<4330::aid-anie4330>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20011203)40:23<4330::aid-anie4330>3.0.co;2-w)
- Hussain, I., Singh, N. B., Singh, A., Singh, H., & Singh, S. C. (2016). Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology Letters*, 38(3), 545–560. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2026-7>
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638–2650. <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>
- Isenbarger, D. W., Hoge, C. W., Srijan, A., Pitarangsi, C., Vithayasai, N., Bodhidatta, L., Hickey, K. W., & Cam, P. D. (2002). Comparative antibiotic resistance of diarrheal pathogens from Vietnam and Thailand, 1996–1999. *Emerging infectious diseases*, 8(2), 175–180. <https://doi.org/10.3201/eid0802.010145>
- Iwata, T., Watanabe-Yanai, A., Tamamura-Andoh, Y., Arai, N., Akiba, M., & Kusumoto, M. (2023). Tryptanthrin reduces *Campylobacter jejuni* colonization in the chicken gut by a bactericidal mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(5), e01701-22. <https://doi.org/10.1128/aem.01701-22>
- Jameel, M., Aziz, A., & Dheyab, M. (2020). Green synthesis: Proposed mechanism and factors influencing the synthesis of platinum nanoparticles. *Green Processing and Synthesis*, 9(1), 386–398. <https://doi.org/10.1515/gps-2020-0041>

- Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>
- Jan, R.-H., Lin, T.-Y., Hsu, Y.-C., Lee, S.-S., Lo, S.-Y., Chang, M., Chen, L.-K., & Lin, Y.-L. (2011). Immunomodulatory activity of *Ganoderma lucidum*-derived polysaccharide on human monocytoid dendritic cells pulsed with Der p 1 allergen. *BMC Immunology*, 12, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-31>
- Jia, Y., Li, Y., Shang, H., Luo, Y., & Tian, Y. (2023). Ganoderic acid A and its amide derivatives as potential anti-cancer agents by regulating the p53-MDM2 pathway: Synthesis and biological evaluation. *Molecules*, 28(5), 2374. <https://doi.org/10.3390/molecules28052374>
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: A comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
- Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., & Man, S. M. (2015). Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- Kandru, A. (2020). Nanotechnology: Application in biology and medicine. In B. Siddhardha, M. Dyavaiah, & K. Kasinathan (Eds.), *Model organisms to study biological activities and toxicity of nanoparticles*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1702-0_1
- Kessel, A. S., Gillespie, I. A., O'Brien, S. J., Adak, G. K., Humphrey, T. J., & Ward, L. R. (2001). General outbreaks of infectious intestinal disease linked with poultry, England and Wales, 1992-1999. *Communicable disease and public health*, 4(3), 171–177. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11732355/>
- Khadbaatar, S., Bao, H., Gao, X., & Huo, H. (2024). Study on differences of metabolites among different *Ganoderma* species with comprehensive metabolomics. *Journal of Fungi*, 10(8), 524. <https://doi.org/10.3390/jof10080524>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Khorsandi, K., Hosseinzadeh, R., Sadat Esfahani, H., Keyvani-Ghamsari, S., & Ur Rahman, S. (2021). Nanomaterials as drug delivery systems with antibacterial properties: Current trends and future priorities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 19(10), 1299–1323. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1908125>
- Kim, H. W., Wang, M., Leber, C. A., Nothias, L. F., Reher, R., Kang, K. B., Van Der Hooft, J. J. J., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H., & Cottrell, G. W. (2021). NPClassifier: A Deep Neural Network-Based Structural Classification Tool for Natural Products. *Journal of Natural Products*, 84(11), 2795-2807. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00399>
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D. H., & Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>

- Klemm, E. J., Wong, V. K., & Dougan, G. (2018). Emergence of dominant multidrug-resistant bacterial clades: Lessons from history and whole-genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(51), 12872–12877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717162115>
- Korlath, J. A., Osterholm, M. T., Judy, L. A., Forfang, J. C., & Robinson, R. A. (1985). A point-source outbreak of campylobacteriosis associated with consumption of raw milk. *The Journal of Infectious Diseases*, 152(3), 592–596. <https://doi.org/10.1093/infdis/152.3.592>
- Kowshik, M., Deshmukh, N., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S. K., & Paknikar, K. M. (2002). Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(5), 583–588. <https://doi.org/10.1002/bit.10233>
- Kreling, V., Falcone, F. H., Kehrenberg, C., & Hensel, A. (2020). Campylobacter sp.: Pathogenicity factors and prevention methods—New molecular targets for innovative antivirulence drugs? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(24), 10409–10436. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10974-5>
- Kumari, S., & Sarkar, L. H. (2021). A review on nanoparticles: Structure, classification, synthesis & applications. *Journal of Scientific Research*, 65(8), 42–46. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:247117485>
- Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtepan Turrent, L. d. C., & Rodríguez Padilla, C. (2010). Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 615–621. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0211-3>
- Li, Z., Xu, M., Wei, H., Wang, L., & Deng, M. (2019). RNA-seq analyses of antibiotic resistance mechanisms in *Serratia marcescens*. *Molecular medicine reports*, 20(1), 745–754. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10281>
- Liu, Y., Miyoshi, H., & Nakamura, M. (2007). Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *International Journal of Cancer*, 120(12), 2527–2537. <https://doi.org/10.1002/ijc.22709>
- Liong, M., Lu, J., Kovochich, M., Xia, T., Ruehm, S. G., Nel, A. E., Tamanoi, F., & Zink, J. I. (2008). Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano*, 2(5), 889–896. <https://doi.org/10.1021/nn800072t>
- Loyd, A. L., Richter, B. S., Jusino, M. A., Truong, C., Smith, M. E., Blanchette, R. A., & Smith, J. A. (2018). Identifying the “Mushroom of Immortality”: Assessing the *Ganoderma* species composition in commercial reishi products. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–14, Article 1557. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01557>
- Ludwig, M., Nothias, L.-F., Dührkop, K., Koester, I., Fleischauer, M., Hoffmann, M. A., Petras, D., Vargas, F., Morsy, M., Aluwihare, L., Dorrestein, P. C., & Böcker, S. (2020). Database-independent molecular 42 formula annotation using Gibbs sampling through ZODIAC. *Nature Machine Intelligence*, 2(10), 629–641. <https://doi.org/10.1038/s42256-020-00234-6>
- Mahanty, S., Bakshi, M., Ghosh, S., Chatterjee, S., Bhattacharyya, S., Das, P., & Das, S. (2019). Green synthesis of iron oxide nanoparticles mediated by filamentous fungi isolated from Sundarban

- mangrove ecosystem, India. *BioNanoScience*, 9, 637–651. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00644-w>
- Man, S. (2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(12), 669–685. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.191>
- Marslin, G., Siram, K., Selvakesavan, R. K., Kruszka, D., Kachlicki, P., & Franklin, G. (2019). Correction: Marslin, G., et al. Secondary metabolites in the green synthesis of metallic nanoparticles. *Materials*, 12(5), 806. <https://doi.org/10.3390/ma12050806>
- Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2021). Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: Research progress, challenges, and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(6), 108. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03070-x>
- McDermott, P. F., Bodeis, S. M., Aarestrup, F. M., Brown, S., Traczewski, M., Fedorka-Cray, P., Wallace, M., Critchley, I. A., Thornsberry, C., Graff, S., Flamm, R., Beyer, J., Shortridge, D., Piddock, L. J., Ricci, V., Johnson, M. M., Jones, R. N., Reller, B., Mirrett, S., Aldrobi, J., Rennie, R., Brosnikoff, C., Turnbull, L., Stein, G., Schooley, S., Hanson, R. A., & Walker, R. D. (2004). Development of a standardized susceptibility test for *Campylobacter* with quality-control ranges for ciprofloxacin, doxycycline, erythromycin, gentamicin, and meropenem. *Microbial Drug Resistance*, 10(2), 124–131. <https://doi.org/10.1089/1076629041310064>
- Meza-Villezas, A., Carballo-Castañeda, R. A., Moreno-Ulloa, A., & Huerta-Saquero, A. (2022). Metabolomic profiling of the responses of planktonic and biofilm *Vibrio cholerae* to silver nanoparticles. *Antibiotics*, 11(1534), 1-17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111534>
- Miller, W. G., Lopes, B. S., Ramjee, M., Jay-Russell, M. T., Chapman, M. H., Williams, T. G., Wood, D. F., Gruntar, I., Papić, B., & Forbes, K. J. (2024). *Campylobacter devanensis* sp. nov., *Campylobacter porcelli* sp. nov., and *Campylobacter vicugnae* sp. nov., three novel *Campylobacter lanienae*-like species recovered from swine, small ruminants, and camelids. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 74(6), 1-12. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006405>
- Miller, W. G., Wang, G., Binnewies, T. T., & Parker, C. T. (2008). The complete genome sequence and analysis of the human pathogen *Campylobacter lari*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(4), 371–386. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0101>
- Miller, W. G., On, S. L., Wang, G., Fontanoz, S., Lastovica, A. J., & Mandrell, R. E. (2005). Extended multilocus sequence typing system for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2315–2329. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2315-2329.2005>
- Mohimani, H., Gurevich, A., Shlemov, A., Mikheenko, A., Korobeynikov, A., Cao, L., Shcherbin, E., Nothias, L.-F., Dorrestein, P. C., & Pevzner, P. A. (2018). Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nature Communications*, 9(1), 4035. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>
- Molnár, Z., Bódai, V., Szakacs, G., Erdélyi, B., Fogarassy, Z., Sáfrán, G., Varga, T., Kónya, Z., Tóth-Szeles, E., Szűcs, R., & Lagzi, I. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. *Scientific Reports*, 8(3943), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22112-3>
- Moore, J. E., Barton, M. D., Blair, I. S., Corcoran, D., Dooley, J. S., Fanning, S., Kempf, I., Lastovica, A. J., Lowery, C. J., Matsuda, M., McDowell, D. A., McMahan, A., Millar, B. C., Rao, J. R., Rooney, P. J.,

- Seal, B. S., Snelling, W. J., & Tolba, O. (2006). The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes and infection*, 8(7), 1955–1966. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.030>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–53. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Motshekga, S. C., Sinha Ray, S., & Maity, A. (2018). Synthesis and characterization of alginate beads encapsulated zinc oxide nanoparticles for bacteria disinfection in water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 512, 686–692. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.098>
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>
- Murillo-Rábago, E.I.; Vilchis-Nestor, A.R.; Juarez-Moreno, K.; Garcia-Marin, L.E.; Quester, K.; Castro-Longoria, E. (2022) Optimized synthesis of small and stable silver nanoparticles using intracellular and extracellular components of fungi: An alternative for bacterial inhibition. *Antibiotics*, 11(800), 1-19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060800>
- Nachamkin, I., Ung, H., & Li, M. (2002). Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerging infectious diseases*, 8(12), 1501–1503. <https://doi.org/10.3201/eid0812.020115>
- Nasrullah, M., Gul, F. Z., Hanif, S., Mannan, A., Naz, S., Ali, J. S., & Zia, M. (2020). Green and chemical syntheses of CdO NPs: A comparative study for yield attributes, biological characteristics, and toxicity concerns. *ACS Omega*, 5(11), 5739–5747. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03769>
- Natsuki, J., Natsuki, T., & Hashimoto, Y. (2015). A review of silver nanoparticles: Synthesis methods, properties and applications. *International Journal of Materials Science and Applications*, 4(5), 325–332. <https://doi.org/10.11648/j.ijmsa.20150405.17>
- Nazarparvar-Noshadi, M., Ezzati Nazhad Dolatabadi, J., Rasoulzadeh, Y., & Yousefi, M. (2020). Apoptosis and DNA damage induced by silica nanoparticles and formaldehyde in human lung epithelial cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 18592–18601. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08191-8>
- Neimann, J., Eengberg, J., Molbak, K., & Wegener, H. (2003). A case–control study of risk factors for sporadic campylobacter infections in Denmark. *Epidemiology And Infection*, 130(3), 353–366. <https://doi.org/10.1017/s0950268803008355>
- Neustaedter, C. M., Robertson, K., Tschritter, D., Reid-Smith, R. J., MacKinnon, M. C., Murphy, C. P., Chapman, B., Neumann, N. F., & Otto, S. J. G. (2023). A scoping review of factors associated with antimicrobial-resistant *Campylobacter* species infections in humans. *Epidemiology and Infection*, 151, e100. <https://doi.org/10.1017/S0950268823000742>
- Ng, V. L., Hadley, W. K., Fennell, C. L., Flores, B. M., & Stamm, W. E. (1987). Successive bacteremias with "Campylobacter cinaedi" and "Campylobacter fennelliae" in a bisexual male. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(10), 2008–2009. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.10.2008-2009.1987>

- Nguyen, N. H., & Nguyen, H. L. (2019). Nanoparticles: Synthesis and applications. In V. Grumezescu & A. M. Grumezescu (Eds.), *Materials for biomedical engineering* (pp. 211–240). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102814-8.00008-1>
- Ocejo, M., Oporto, B., & Hurtado, A. (2019). Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in cattle and sheep in Northern Spain and changes in antimicrobial resistance in two studies 10-years apart. *Pathogens*, 8(3), 98. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030098>
- Ometa Labs. (2024). Molecular networking. <https://www.ometalabs.net/molecular-networking>
- Ojeda-González, J. (2023). *Estudio de biomarcadores metabólicos en la piel relacionados con el envejecimiento en una población del noroeste de México*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3982/1/tesis_Jhordan_Ojeda_Gonzalez_%2015%20nov%202023.pdf
- Padungton, P., & Kaneene, J. B. (2003). *Campylobacter* spp in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. *The Journal of veterinary medical science*, 65(2), 161–170. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.161>
- Park, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74(3), 177-188. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00678-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00678-X)
- Phan, H. T., & Haes, A. J. (2019). What does nanoparticle stability mean? *The Journal of Physical Chemistry C*, 123(27), 16495–16507. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00913>
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11(1), Article 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Punz, B., Christ, C., Waldl, A., Li, S., Liu, Y., Johnson, L., Auer, V., Cardozo, O., Farias, P. M. A., Andrade, A. C. D. S., Stingl, A., Wang, G., Li, Y., & Himly, M. (2025). Nano-scaled advanced materials for antimicrobial applications. *Environmental Science: Nano*, 12, 1710-1739. <https://doi.org/10.1039/D4EN00798K>
- Quester, K., Avalos-Borja, M., & Castro-Longoria, E. (2013). Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*, 54–55(1),1-27. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>
- Quiñones-Ramírez, E., Vázquez-Salinas, C., Rodas-Suárez, O., Ramos-Flores, M., & Rodríguez-Montañón, R. (2000). Frequency of Isolation of *Campylobacter* from Roasted Chicken Samples from Mexico City. *Journal Of Food Protection*, 63(1), 117-119. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.1.117>
- R Core Team.(2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Consultado el 01 de mayo de 2023. <http://www.R-project.org/>
- Rademacher, C., & Masepohl, B. (2012). Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology*, 158(10), 2451–2464. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058487-0>

- Rahimi, H.-R., & Doostmohammadi, M. (2020). Nanoparticle synthesis, applications, and toxicity. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87973>
- Rajakumar, G., Abdul Rahuman, A., Mohana Roopan, S., Gopiesh Khanna, V., Elango, G., Kamaraj, C., Abduz Zahir, A., & Velayutham, K. (2012). Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *91*, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.01.011>
- Rana, A., Yadav, K., & Jagadevan, S. (2020). A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *Journal of Cleaner Production*, *272*, 122880. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122880>
- Rivera-Mendoza, D., Martínez-Flores, I., Santamaría, R., Lozano, L., Bustamante, V., & Pérez-Morales, D. (2020). Genomic analysis reveals the genetic determinants associated with antibiotic resistance in the zoonotic pathogen *Campylobacter* spp. Distributed globally. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 513070. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.513070>
- Robert Koch-Institut. (2022). *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2021* (pp. 210). <https://doi.org/10.25646/10143>
- Roberts, M. C., Schwarz, S., & Aarts, H. J. (2012). Erratum: Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Frontiers in Microbiology*, *3*(384), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00384>
- Roco, M. C. (2011). The long view of nanotechnology development: The National Nanotechnology Initiative at 10 years. *Journal of Nanoparticle Research*, *13*, 427–445. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0192-z>
- Sahin, O., Yaeger, M., Wu, Z., & Zhang, Q. (2017). *Campylobacter*-associated diseases in animals. *Annual Review of Animal Biosciences*, *5*, 21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022826>
- Sajid, M., & Płotka-Wasyłka, J. (2020). Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. *Microchemical Journal*, *154*, 104623. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104623>
- Salihu, M. D., Junaidu, A. U., Oboegbulem, S. I., & Egwu, G. (2009). Prevalence and biotypes of *Campylobacter* species isolated from sheep in Sokoto State. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *1*(1), 6–9. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:30198704>
- Sander, T., Freyss, J., von Korff, M., & Rufener, C. (2015). DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *Journal of chemical information and modeling*, *55*(2), 460–473. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>
- Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. (2009). *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *10*(8), 717–742. <https://doi.org/10.2174/138920109789978757>
- Samuel, M. S., Ravikumar, M., John, J. A., Selvarajan, E., Patel, H., Chander, P. S., Soundarya, J., Vuppala, S., Balaji, R., & Chandrasekar, N. (2022). A review on green synthesis of nanoparticles and their diverse biomedical and environmental applications. *Catalysts*, *12*(459). <https://doi.org/10.3390/catal12050459>

- Scallan Walter, E. J., Crim, S. M., Bruce, B. B., & Griffin, P. M. (2020). Incidence of *Campylobacter*-associated Guillain- Barré syndrome estimated from health insurance data. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(1), 23–28. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2652>
- Schmidt, H. (2001). Nanoparticles by chemical synthesis, processing to materials and innovative applications. *Applied Organometallic Chemistry*, 15(4), 331-343. <https://doi.org/10.1002/aoc.169>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Seil, I., & Webster, T. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2767-2781. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24805>
- Shaik, M. R., Ali, Z. J. Q., Khan, M., Kuniyil, M., Assal, M. E., Alkathlan, H. Z., Al-Warthan, A., Siddiqui, M. R. H., Khan, M., & Adil, S. F. (2017). Green synthesis and characterization of palladium nanoparticles using *Origanum vulgare* L. extract and their catalytic activity. *Molecules*, 22(1), 165. <https://doi.org/10.3390/molecules22010165>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Sharma, C., Bhardwaj, N., Sharma, A., Tuli, H. S., Batra, P., Beniwal, V., Gupta, G. K., & Sharma, A. K. (2019). Bioactive metabolites of *Ganoderma lucidum*: Factors, mechanism and broad spectrum therapeutic potential. *Journal of Herbal Medicine*, 17–18, 100268. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100268>
- Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1–2), 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002>
- Shehabeldine, A. M., Amin, B. H., Hagra, F. A., Ramadan, A. A., Kamel, M. R., Ahmed, M. A., Atia, K. H., & Salem, S.S. (2022). Potential antimicrobial and antibiofilm properties of copper oxide nanoparticles: Time-kill kinetic essay and ultrastructure of pathogenic bacterial cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(1), 467–485. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04120-2>
- Sheng, Z., & Liu, Y. (2017). Potential impacts of silver nanoparticles on bacteria in the aquatic environment. *Journal of Environmental Management*, 191, 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.01.028>
- Sheppard, S. K., & Maiden, M. C. (2015). The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a018119. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018119>
- Shih, Y.-H., Pranata, R., Chen, Y.-C., Liao, M.-Y., Cheng, Y.-H., Chen, Y.-Y., Lai, Y.-H., Tsai, P.-J., & Chen, R.-J. (2023). Novel antibacterial activity of silver nanoparticles combined with pterostilbene against *Staphylococcus aureus* via induction of apoptosis-like cell death and downregulation of ribosomal gene expression. *Environmental Science: Nano*, 10(8), 2115-2131. <https://doi.org/10.1039/D3EN00176H>

- Shukla, A. K., & Iravani, S. (2018). Mycosynthesis of nanoparticles for smart agricultural practice: A green and eco- friendly approach. In *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles* (pp. 87–101). Elsevier. <https://books.google.com.mx/books?id=LzV8DwAAQBAJ>
- Silva, G. A. (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology*, 61(3), 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.surneu.2003.09.036>
- Silvan, J. M., Zorraquin-Peña, I., Gonzalez de Llano, D., Moreno-Arribas, M. V., & Martinez-Rodriguez, A. J. (2018). Antibacterial activity of glutathione-stabilized silver nanoparticles against *Campylobacter* multidrug- resistant strains. *Frontiers in Microbiology*, 9, 458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00458>
- Singh, R., Shedbalkar, U. U., Wadhvani, S. A., & Chopade, B. A. (2015). Bacteriogenic silver nanoparticles: Synthesis, mechanism, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), 4579–4593. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6622-1>
- Solís-Soto, L. Y. (2011). *Prevalencia y susceptibilidad a antimicrobianos de Campylobacter jejuni y C. coli aislados de alimentos mediante el desarrollo de un método rápido* [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma De Nuevo León]. Repositorio Institucional UANL. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/2843>
- Song, J. Y., & Kim, B. S. (2009). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32, 79–84. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0224-6>
- Soto-Beltrán, M., Quiñones, B., Ibarra-Rodríguez, A., & Amézquita-López, B. (2019). Use of Membrane Filtration for the Recovery of *Campylobacter* from Raw Chicken Carcasses Purchased at Retail Markets in Culiacan, Sinaloa, Mexico. *Revista Bio Ciencias*, 7, e698. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e698>
- Sproston, E. L., Wimalarathna, H. M. L., & Sheppard, S. K. (2018). Trends in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. *Microbial Genomics*, 4(8), e000198. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000198>
- Srinivas, K., Srinivasa Rao, T., Bindu Kiranmayi, C., & Lakshmi Kavitha, K. (2019). Antibigram of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from animals, foods of animal origin and humans in areas surrounding Gannavaram, Andhra Pradesh. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:201623751>
- Surendiran, A., Sandhiya, S., Pradhan, S. C., & Adithan, C. (2009). Novel applications of nanotechnology in medicine. *The Indian Journal of Medical Research*, 130(6), 689–701. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:11980157>
- Taghizadeh, M., Nematollahi, A., Bashiry, M., Javanmardi, F., Mousavi, M., & Hosseini, H. (2022). The global prevalence of *Campylobacter* spp. in milk: A systematic review and meta-analysis. *International Dairy Journal*, 133, 105423. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105423>
- Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., Polachek, A. J., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J. D., & Ghali, W. A. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Planetary health*, 1(8), e316–e327. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(17\)30141-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(17)30141-9)

- Tauxe, R. V., Patton, C. M., Edmonds, P., Barrett, T. J., Brenner, D. J., & Blake, P. A. (1985). Illness associated with *Campylobacter laridis*, a newly recognized *Campylobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(2), 222–225. <https://doi.org/10.1128/jcm.21.2.222-225.1985>
- Trigos, Á., & Suárez Medellín, J. (2011). Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of myco-chemistry research. *Revista Mexicana de Micología*, 34, 63–83. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802011000200009&lng=es&tlng=en
- Tokul-Olmez, O., Kaplaner, E., Ozturk, M., Ullah, Z., & Duru, M. E. (2018). Fatty acid profile of four *Ganoderma* species collected from various host trees with chemometric approach. *Biochemical Systematics and Ecology*, 78, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.03.008>
- Torres-Torres, M. G., Ryvarde, L., & Guzmán-Dávalos, L. (2015). *Ganoderma* subgenus *Ganoderma* in Mexico. *Revista mexicana de micología*, 41, 27–45. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802015000100005&lng=es&tlng=en
- Vandamme, P., & Goossens, H. (1992). Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: A review. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 276(4), 447–472. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80671-7](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80671-7)
- van der Berg, S., Charles, T., Dörre, A., Katz, K., & Böhm, S. (2023). Epidemiology of common infectious diseases before and during the COVID-19 pandemic in Bavaria, Germany, 2016 to 2021: An analysis of routine surveillance data. *Eurosurveillance*, 28(41), 2300030. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.41.2300030>
- Varga, C., Guerin, M. T., Brash, M. L., Slavic, D., Boerlin, P., & Susta, L. (2019). Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from small poultry flocks in Ontario, Canada: A two-year surveillance study. *PLOS ONE* 14(8), e0221429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221429>
- Vazquez-Muñoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E (2014) Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver Nanoparticles. *PLOS ONE* 9(10), e108876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108876>
- Verma, A., Gautam, S. P., Bansal, K. K., Prabhakar, N., & Rosenholm, J. M. (2019). Green nanotechnology: Advancement in phytoformulation research. *Medicines*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.3390/medicines6010039>
- Viceconte, F. R., Diaz, M. L., Soresi, D. S., Lencinas, I. B., Carrera, A., Prat, M. I., & Gurovic, M. S. V. (2021). *Ganoderma sessile* is a fast polysaccharide producer among *Ganoderma* species. *Mycologia*, 113(3), 513–524. <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1870255>
- Villa-Rodriguez, E., Moreno-Ulloa, A., Castro-Longoria, E., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2021). Integrated omics approaches for deciphering antifungal metabolites produced by a novel *Bacillus* species, *B. cabrialesii* TE3T, against the spot blotch disease of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Microbiological Research*, 251(126826), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126826>

- Vijayaram, S., Razafindralambo, H., Sun, Y. Z., & et al. (2024). Applications of green synthesized metal nanoparticles— A review. *Biological Trace Element Research*, 202, 360–386. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03645-9>
- Vincenti, F., Montesano, C., Di Ottavio, F., Gregori, A., Compagnone, D., Sergi, M., & Dorrestein, P. (2020). Molecular networking: A useful tool for the identification of new psychoactive substances in seizures by LC- HRMS. *Frontiers in Chemistry*, 8, 572952. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.572952>
- Vishwakarma, V., Samal, S., & Manoharan, N. (2010). Safety and risk associated with nanoparticles—A review. *Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering*, 9(5), 455–459. <https://doi.org/10.4236/jmmce.2010.95031>
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249. <https://doi.org/10.2147/ijn.s121956>
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapono, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W. T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., ... Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828-837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wu, G.-S., Lu, J.-J., Guo, J.-J., Li, Y.-B., Tan, W., Dang, Y.-Y., Zhong, Z.-F., Xu, Z.-T., Chen, X.-P., & Wang, Y.-T. (2012). Ganoderic acid DM, a natural triterpenoid, induces DNA damage, G1 cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells. *Fitoterapia*, 83(2), 408-414. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.004>
- Xie, Y., He, Y., Irwin, P. L., Jin, T., & Shi, X. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2325–2331. <https://doi.org/10.1128/AEM.02149-10>
- Yayehrad, A. T., Wondie, G. B., & Marew, T. (2022). Different nanotechnology approaches for ciprofloxacin delivery against multidrug-resistant microbes. *Infection and Drug Resistance*, 15, 413-426. <https://doi.org/10.2147/IDR.S348643>
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2555-2562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
- Zaidi, M. B., McDermott, P. F., Campos, F. D., Chim, R., Leon, M., Vazquez, G., Figueroa, G., Lopez, E., Contreras, J., & Estrada-Garcia, T. (2012). Antimicrobial- Resistant *Campylobacter* in the Food Chain in Mexico. *Foodborne Pathogens And Disease*, 9(9), 841-847. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1127>
- Zhang, L., Man, S. M., Day, A. S., Leach, S. T., Lemberg, D. A., Dutt, S., Stormon, M., Otley, A., O'Loughlin, E. V., Magoffin, A., Ng, P. H. Y., & Mitchell, H. (2009). Detection and isolation of *Campylobacter* species other than *C. jejuni* from children with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2), 453–455. <https://doi.org/10.1128/jcm.01949-08>

- Zhen, C., Wu, X., Zhang, J., Liu, D., Li, G., Yan, Y., He, X., Miao, J., Song, H., Yan, Y., & Zhang, Y. (2023). *Ganoderma lucidum* polysaccharides attenuate pressure-overload-induced pathological cardiac hypertrophy. *Frontiers in Pharmacology*, *14*, 1127123. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1127123>
- Zhu, X.-L., Chen, A.-F., & Lin, Z.-B. (2007). *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *111*(2), 219-226. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.013>

Anexos

Anexo A. Códigos en R utilizados en la metodología

```
##### Procesamiento de resultados de ClassyFire #####

library(dplyr)

library(classyfireR)

library(stringr)

#Establecer directorio de trabajo

WD <- "#PATH del directorio de trabajo" setwd(WD)

inchi <- read.csv("InChI.csv") inchi <- as.list(inchi$stdinchikey)

Classyfire <- purrr::map(inchi, get_classification)

Superclass <- Classyfire

for (i in 1:length(inchi)) { tryCatch({

Superclass[[i]] <- data.frame(c(Classyfire[[i]]@meta[1],Classyfire[[i]]@classification[2,2]))

},error= function(e) {cat("Error", "\n")}) }

Superclass <- do.call(bind_rows, Filter(Negate(is.null), Superclass))

Class <- Classyfire

for (i in 1:length(inchi)) { tryCatch({

Class[[i]] <- Classyfire[[i]]@classification[3,2]

},error= function(e) {cat("Error", "\n")}) }

Class <- do.call(bind_rows, Filter(Negate(is.null), Class))

Subclass <- Classyfire
```

```

for (i in 1:length(inchi)) { tryCatch({

Subclass[[i]] <- Classyfire[[i]]@classification[4,2]

},error= function(e) {cat("Error", "\n")}) }

Subclass <- do.call(bind_rows, Filter(Negate(is.null), Subclass))

Classifications <- transform(cbind(Superclass, Class, Subclass), inchikey = sub("InChIKey=", "", inchikey))
colnames(Classifications) <- c("InChIKey", "Superclass", "Class", "Subclass")

Classifications$Class <- ifelse(is.na(Classifications$Class), "Unassigned", Classifications$Class)
Classifications$Subclass <- ifelse(is.na(Classifications$Subclass), "Unassigned", Classifications$Subclass)

write.csv(Classifications, file = "ClassyFire_InChI.csv", row.names = FALSE)

##### Generación de las gráficas de pastel con las clases químicas #####

library(dplyr) library(plotly) #Plotly

Sys.setenv("plotly_username" = "jhordan") Sys.setenv("plotly_api_key" = "ipNrg9QAJwJy9kbptUWC")
#Establecer y crear directorio de trabajo

setwd("#PATH del directorio de trabajo") Colors <- read.csv("ClassColors.csv") name <-
"ChemicalClasses_SN_new" filter <- 3

Canopus <- read.csv(paste(name, ".csv", sep = ""))

Canopus <- data.frame(table(Canopus$Class)) %>% rename(Class = Var1) Class <- Canopus %>% filter(Freq
>= filter)

Class_filtered <- Canopus %>% filter(Freq < filter) %>%

```

```
summarise(Class = "Others with < 3", Freq = sum(Freq)) %>% as.data.frame() Class <-
rbind(Class,Class_filtered)
```

```
Class <- merge(Class, Colors, by.x = "Class", by.y = "ChemicalClass") X <- Class[Class$Class %in% c("Others
with < 3","Unassigned"),]
```

```
Class <- Class[Class$Class != "Unassigned" & Class$Class != "Others with < 3", ] %>% rbind(X)
```

```
fig_class <- plot_ly(Class, labels = ~Class, values = ~Freq, type = 'pie', sort = FALSE, direction = "clockwise",
```

```
marker = list(colors = ~Color),
```

```
textfont = list(size = 15)) %>% # color = "white" layout(font=list(size = 15), # color = "white"
```

```
# paper_bgcolor = "black"
```

```
legend = list(title=list('<b> Canopus Chemical Classes\n'), x= 100, y=0.5)) # bgcolor = "black"
```

```
fig_class
```

```
plotly_IMAGE(fig_class, format="png", width = 1000, height = 1000,
out_file=paste(name,"_",filter,"_Label.png", sep = ""))
```

```
#Solo la gráfica
```

```
fig_class <- plot_ly(Class, labels = ~Class, values = ~Freq, type = 'pie', sort = FALSE, direction = "clockwise",
```

```
marker = list(colors = ~Color), textfont = list(size = 30)) %>%
```

```
layout(showlegend = FALSE) fig_class
```

```
plotly_IMAGE(fig_class, format="png", width = 1000, height = 1000,  
out_file=paste(name,"_",filter,"_Chart.png", sep = ""))
```

```
##### Análisis estadístico de la prueba de tratamientos al EAI y su actividad antibacteriana #####
```

```
#Establecer tu directorio de trabajo setwd("#PATH del directorio a usar") datos <- read.csv("EAI_data.csv")
```

```
#####
```

```
#Pruebas no paramétricas recomendadas:
```

```
#Comparación de múltiples grupos (más de dos):
```

```
#Usa la prueba de Kruskal-Wallis (equivalente no paramétrico del ANOVA).
```

```
#Si encuentras diferencias significativas, realiza una prueba post-hoc no paramétrica (como la prueba de  
Dunn) para identificar qué grupos son diferentes.
```

```
resultado_kruskal <- kruskal.test(UFC ~ Tratamiento, data = datos)
```

```
print(resultado_kruskal)
```

#Si el valor de $p < 0.05$, hay diferencias significativas entre los grupos.

#####

#Resultado:

Kruskal-Wallis rank sum test data: UFC by Tratamiento

Kruskal-Wallis chi-squared = 13.819, df = 5, p-value = 0.0168

#Se procedió a realizar una prueba de Dunn:

library(dunn.test)

```
dunn_resultado <- dunn.test(datos$UFC, datos$Tratamiento, method = "bonferroni")
print(dunn_resultado)
```

#Busca los valores en P.adjusted que sean menores que 0.05. Estas son las comparaciones que muestran #diferencias significativas después de ajustar por comparaciones múltiples.

Generar gráfico de barras del crecimiento bacteriano

```
# Instalar y cargar los paquetes necesarios install.packages("ggplot2") # Si no tienes ggplot2 instalado
library(ggplot2)
```

```
# Leer el archivo CSV
```

```
data <- read.csv("#archivo")
```

```
# Crear el gráfico de barras con barras de error (desviación estándar) ggplot(data, aes(x = Categoria, y = Valor, fill = Categoria)) + geom_bar(stat = "identity", position = "dodge", width = 0.7) + geom_errorbar(aes(ymin = Valor - SD, ymax = Valor + SD),
```

```
width = 0.2, position = position_dodge(0.7)) + scale_fill_manual(values = c("#0072B2", "#E69F00", "#F0E442",
```

```
"#CC79A7", "#56B4E9", "#D55E00", "#999999", "#4E79A7", "#F28E2B", "#E15759", "#76B7B2", "#59A14F",
```

```
"#EDC948", "#B07AA1", "#FF9DA7", "#9C755F", "#BAB0AC",
```

```
"#86BC25")) +
```

```
labs(title = "Gráfico de Barras con Desviación Estándar", x = "Bacteria with Treatments",
```

```
y = "Log UFC/mL") + theme_minimal() + theme(legend.position = "none")
```

Anexo B. Datos del análisis de enriquecimiento químico para consulta.

Data availability

Los conjuntos de datos sin procesar que respaldan los resultados de metabolómica están disponibles en el repositorio público GNPS/MassIVE (Wang et al., 2016) con el número de acceso MSV000097389. Los parámetros específicos de las herramientas empleadas para la anotación de metabolitos están disponibles en los siguientes enlaces:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=69632ec379634652946ce59cff576322> para red molecular clásica (CMN);
<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=416606ede2c6427bb11ae122ab54e1b0> para DEREPLICATOR+; y

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=b35e18a9d2bd454da74c69ed9cb205f7> para MolDiscovery.