

# Comportamiento de *Klebsiella pneumoniae* en ambiente de microgravedad simulada a distintos pH y concentraciones de carbenicilina

Isabella García<sup>1</sup>; Daniela Farchi<sup>2</sup>; Caterina Álvarez<sup>3</sup>, Sunu Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudios en Biotecnología, Universidad del Valle de Guatemala, <sup>2</sup>Department of Biology, Emory University, Atlanta, GA, EEUU,

<sup>3</sup>Colegio Americano de Guatemala

igarcia@uvg.edu.gt

**RESUMEN:** El aumento y duración de las misiones espaciales ha creado la necesidad de entender cómo las bacterias oportunistas se comportan en un ambiente de microgravedad. En este estudio describimos, por medio de un experimento, el efecto del pH y la concentración de carbenicilina, en el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* en condiciones de microgravedad simulada (MGS) y gravedad normal (1g). La MGS, simula el ambiente extracelular estático que ocurre en condiciones de microgravedad; se logró utilizando un *clinostato* que permite colocar en rotación los medios de cultivo, causando una reorientación continua en el vector de gravedad, permitiendo que las células permanezcan en una región limitada. Los resultados muestran que en condiciones de MGS, los cultivos experimentan una leve autólisis en una etapa temprana comparado con condiciones de 1g, a pH y concentración de carbenicilina equivalentes. Se observó que cultivos en condiciones de MGS experimentan un aumento en la densidad óptica a pH 6.5, 8.5 y 9.5; por otro lado, con altas concentraciones de carbenicilina; ocurre lo opuesto a pH 7.5. A mayor concentración de carbenicilina, se observó un aumento de densidad óptica a 1g y pH 7.5, pero, no se observaron cambios de densidad óptica a pH 6.5, 8.5 y 9.5. Finalmente, luego de 18 horas de incubación, no importando el pH inicial del medio, todos los cultivos poseían un pH final entre 5.2 y 6.4. Proponemos el uso de la microgravedad como una herramienta para acelerar las pruebas de nuevos medicamentos para microorganismos multiresistentes. Hasta donde sabemos, este es el único estudio que demuestra una diferencia en la activación de autólisis en condiciones de MGS y 1g y evalúa las tres variables de pH, concentración de carbenicilina y condiciones de gravedad en la densidad óptica de *K. pneumoniae*.

**PALABRAS CLAVE:** Microgravedad simulada, *Klebsiella pneumoniae*, resistencia a antibióticos, pH.

## *Klebsiella pneumoniae* behavior under microgravity at various pH and carbenillin concentrations

**ABSTRACT:** As space exploration becomes of longer durations, the importance of understanding how opportunistic microorganisms behave in microgravity increases. This study describes the effects that media pH and carbenicillin concentration have on *Klebsiella pneumoniae* growth under simulated microgravity (SMG) conditions with respect to 1g. SMG was achieved using a *clinostat* that permits culture rotation, constant gravity vector reorientation, and simulation of some aspects of the expected quiescent extracellular environment believed to occur in microgravity. Results showed that under SMG, cultures underwent mild autolysis, or cell self-digestion, at an earlier stage than under 1g at equivalent pH and antibiotic concentrations, a phenomenon not previously observed. Under SMG at pH 6.5, 8.5, and 9.5, cultures at higher carbenicillin concentrations presented increased optical density; at pH 7.5, the opposite trend occurred. In contrast, at 1g increasing carbenicillin concentrations led to no change or decrease in optical density at pH 6.5, 8.5, and 9.5 while at pH 7.5 they led to increased optical density. Furthermore, after 18 hours of incubation, regardless of initial media pH, all cultures had a final pH between 5.2 and 6.4. We propose the use of simulated microgravity as a tool to accelerate the tests of new antibiotics for multiresistant bacteria. This study is unique in that it describes a difference in autolysis activation under different gravitational conditions while evaluating effects of pH and carbenicillin concentration.

**KEYWORDS:** Simulated microgravity, *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, pH.

## Introducción

Los 60 años de exploración espacial cumplidos en 2017, el aumento de las misiones humanas al espacio y el descubrimiento de la presencia de bacterias en las estaciones espaciales (Checinska et al., 2015; Kawamura et al., 2001; Venkateswaran et al., 2014) han aumentado el interés en el estudio de la microbiología en el espacio. En los últimos años se ha encontrado que en condiciones de microgravedad simulada (MGS), las bacterias se comportan de forma diferente (Zea et al., 2016). Algunos cambios fisiológicos observados incluyen: cambio en la tasa de crecimiento, transcriptómica, metabolismo, resistencia a ambientes ácidos (Guo et al., 2015), aumento del grosor de la pared celular (Tixador, Richoille, Gasset, Planel, et al., 1985), aumento de la formación de biopelícula (H. Wang et al., 2016), aumento en virulencia (Rosado, Doyle, Hinds, & Taylor, 2010; Wilson et al., 2007), disminución o aumento de susceptibilidad a antibióticos (Aunins et al., 2018; Kalpana, Cha, Park, & Lee, 2012; D. M. Klaus & Howard, 2006; Lapchine et al., 1986; Tixador et al., 1994; Tixador, Richoille, Gasset, Templier, et al., 1985), entre otras.

Los estudios de microgravedad simulada se han realizado en la tierra utilizando un aparato llamado *clinostat* o *clinostato* que permite simular las condiciones de gravedad cero del espacio. Esto se logra colocando un recipiente cilíndrico lleno de líquido (sin aire) en rotación con velocidad constante. Dicho movimiento permite reorientar el vector gravedad suspendiendo las partículas aleatoriamente y evitando la sedimentación de las mismas en el medio líquido (Figuras 1 y 2). El *clinostato* permite imitar el ambiente extracelular estático que se alcanza, en bacterias no motiles, en microgravedad ya que la rotación únicamente le permite consumir a la bacteria los nutrientes que rodean. El objetivo del *clinostato* es rotar el medio lo suficientemente rápido para prevenir que el organismo responda a la gravedad, pero

suficientemente lento para evitar introducir fuerzas de centrifugación al sistema (Benoit & Klaus, 2007; D. Klaus, 2001).

Diversos estudios han demostrado que el ambiente espacial compromete el sistema inmune de los astronautas (Sonnenfeld, 2005b, 2005a) y que bacterias oportunistas como *Klebsiella pneumoniae* crecen sin ningún problema en el espacio (Hammond et al., 2016; Kalpana et al., 2012; H. Wang et al., 2016; P. Wang & Wang, 2016), en estaciones espaciales (Checinska et al., 2015; Kawamura et al., 2001; Venkateswaran et al., 2014), naves espaciales (Checinska et al., 2015; Novikova, 2004) y colonizan a astronautas (Ritchie, Taddeo, Weeks, & Bloomfield, 2015; Taylor, Kim, & Lee, 2007).

*K. pneumoniae* es una bacteria Gram negativo anaerobia facultativa fermentadora de lactosa. Posee una naturaleza ubicua y es conocida como un patógeno oportunista que puede causar una serie de enfermedades como neumonía, meningitis e infecciones en el torrente sanguíneo (Martin & Bachman, 2018). Debido a que, en los últimos años, esta bacteria ha desarrollado resistencia a antibióticos de tercera generación como cefalosporinas y carbapenemas, se ha clasificado como prioridad uno o crítica en la última lista de la OMS (Organización Mundial de la Salud) de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos a nivel global (Knols et al., 2016). En América Latina, en 2014 se reportó la presencia de *K. pneumoniae* resistente desde el 19% en Perú hasta llegar al 87% de resistencia en Bolivia. En 2013 se reportó *K. pneumoniae* resistente a carbapenemas desde un rango de susceptibilidad total en República Dominicana hasta llegar al 28% de resistencia en Guatemala (Gelband et al., 2015).

A pesar que existen estudios del comportamiento de *K. pneumoniae* en condiciones de MGS, no existe ningún estudio que describa el efecto del pH y la concentración de carbenicilina en el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* en condiciones de

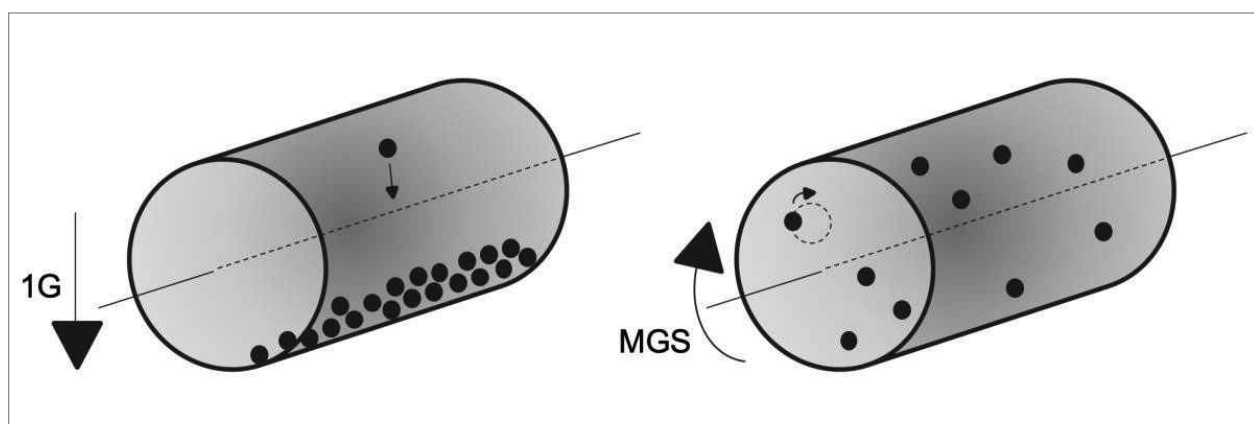


Figura 1. Diferencia entre microgravedad simulada y gravedad (Modificada de D. Klaus, 2001) La figura de la izquierda representa un sistema que se encuentra con gravedad normal (1g), en la que las partículas se sedimentan debido a que no existe movimiento en el sistema. La figura de la derecha representa un sistema que se encuentra en rotación con velocidad constante en condiciones de microgravedad simulada (MGS), en la que las partículas se mueven de forma aleatoria e independiente siguiendo una trayectoria circular.

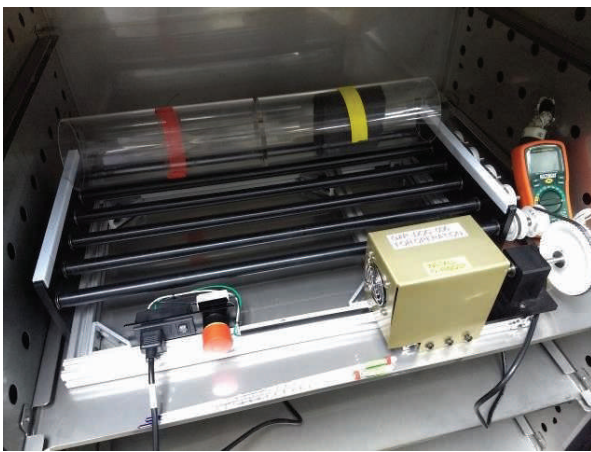


Figura 2. Clinostat utilizado para realizar los experimentos, propiedad de BioServe Space Technologies

MGS y 1g. En este experimento observamos el efecto de estas dos variables por un período de 18 horas de crecimiento en microgravedad simulada y gravedad normal.

## Materiales y métodos

**Cepa bacteriana:** La cepa de *Klebsiella pneumoniae* utilizada se obtuvo de un aislamiento de la mosca mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens*, producida por el Programa Moscamed de Guatemala en la planta Moscamed Guatemala, Petapa. La cepa fue caracterizada por el Centro de Estudios en Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala, utilizando secuenciación de nueva generación. Esta cepa de *K. pneumoniae* es semi-móvil y resistente naturalmente a 50µg/ml de carbenicilina.

**Reactivos:** Se utilizó medio de cultivo Luria-Bertani (LB) formulado con los siguientes reactivos: levadura (Merck®), peptona (Merck®) y NaCl (Merck®). Los pHs (6.5, 7.5, 8.5 y 9.5) se ajustaron utilizando NaOH 6M (Merck®) y HCl 1M (Merck®) con un potenciómetro Hatch®. Para suplementar los medios se utilizó un stock de carbenicilina a 50000µg/ml (Sigma Aldrich® LotBCBV9477)

**Equipo:** Se utilizó un *clinostat* (BioServe Space Technologies, Cat. No. GAP-A540) para rotar tubos Falcon (15ml y 50ml) y placas de 96 pozos a una velocidad angular de 10 rpm en un cilindro de policarbonato con un diámetro de 10cm. El *clinostato* se colocó dentro de una incubadora (Fisher Scientific®, Model 3596), a 37°C. Para obtener la densidad bacteriana (DO 600nm), se utilizó un lector de ELISA (BioTek ELx800).

**Crecimiento en Microgravedad simulada (MGS):** Se inició un cultivo madre de *K. pneumoniae* en medio LB pH 7.5, este se cultivó en condiciones estáticas por 18 h a 37°C. Este cultivo madre se utilizó para inocular 4 tubos Falcon de 15ml por pH (6.5, 7.5, 8.5 y 9.5) con una dilución 1:10. Se utilizó un control (medio LB sin bacteria) por cada pH utilizado. Se aseguró que los cultivos y controles no tuvieran burbuja de aire (anaerobiosis) y luego fueron incubados en el *clinostat* por 18 h a 37°C. Cada medio se diluyó para llegar a un estándar McFarland 0.5 y se separaron para suplementarlos con las distintas concentraciones de carbenicilina (20µg/ml, 50µg/ml, 80µg/ml, 110µg/ml). Estos medios inoculados y suplementados se colocaron en cuadruplicado en placas de 96 pozos selladas y fueron incubados en el *clinostat* por 18 h a 37°C. Se midió la densidad bacteriana (DO 600nm) en duplicado, cada hora por las primeras 8 horas y se realizó una medida final a las 18 horas. Por último, se midió el pH del medio utilizando papel pH (Hydrión®). Observar procedimiento en Figura 3.

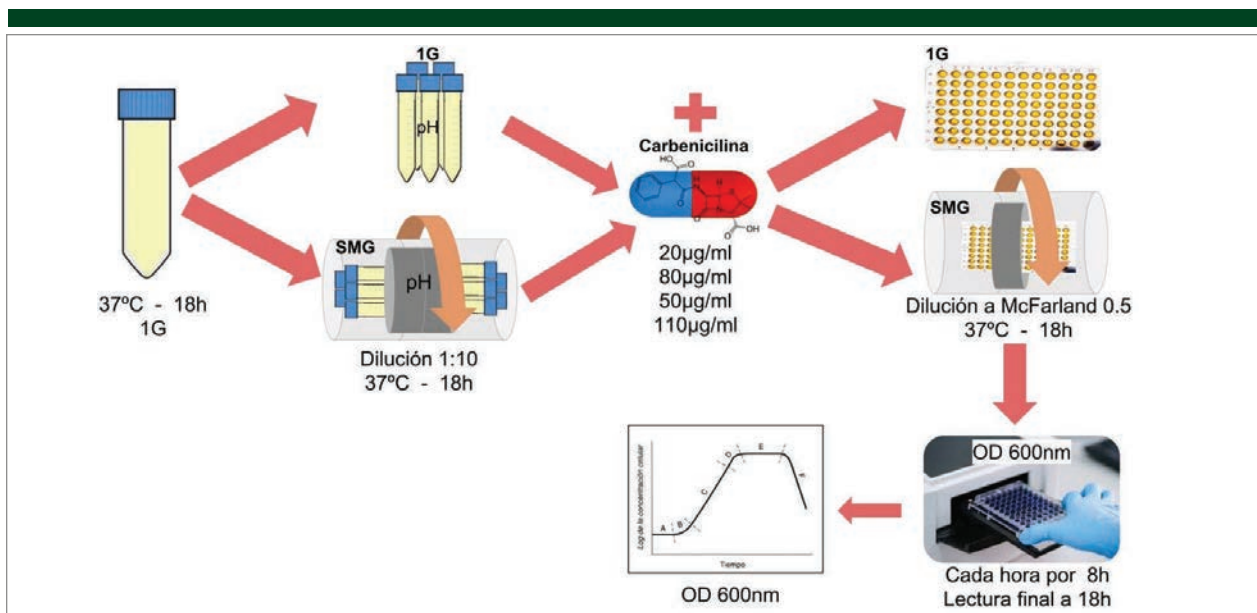


Figura 3. Diagrama de flujo de diseño experimental

**Crecimiento en gravedad normal (1g):** Los controles de gravedad 1g se realizaron de la misma manera que las pruebas en MGS (misma preparación, cultivo madre, condiciones, tiempo, equipo y metodología).

**Estadística:** Se realizaron comparaciones entre tratamientos utilizando la T del Estudiante de dos colas.

## Resultados y discusión

Para evaluar el efecto de microgravedad simulada en el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* en diferentes condiciones de pH y concentración de carbenicilina, se evaluaron todas las combinaciones posibles en microgravedad simulada y en gravedad normal. La Tabla 1 muestra el cambio del pH inicial del medio comparado con el pH final en condiciones de MGS y 1g. A pesar que el pH final del medio se midió con papel pH es posible observar que, no importando el pH inicial del medio o las condiciones de gravedad del cultivo, luego de 18 horas de incubación el pH del medio se estabilizó entre 5 y 6. Lo anterior indica que la regulación del pH no se ve afectada en *K. pneumoniae* en condición de MGS. *K. pneumoniae* consigue estabilizar el pH al regular la producción de metabolitos secundarios aumentando la concentración de 2,3-butanediol para aumentar el pH del medio, o aumentando la concentración de ácido láctico para acidificarlo (Garg & Jain, 1995). Es importante aclarar que en este experimento no se realizó una caracterización de los metabolitos secundarios presentes en el medio de cultivo; por lo anterior es posible que *K. pneumoniae* haya utilizado otro método de regulación de pH o haya producido otros metabolitos secundarios en condiciones de MGS.

Debido a que *K. pneumoniae* es naturalmente resistente a 50µg/ml de carbenicilina, se evaluó la diferencia de densidad bacteriana a concentraciones de 20, 50, 80 y 110µg/ml de carbenicilina en diferentes pH. En la Figura 4, se observa la densidad óptica alcanzada luego de 18 horas de crecimiento y exposición a las distintas variables. Las desviaciones de los datos se deben a la presencia de burbujas y/o suciedad en la membrana transparente que se le colocó a la placa en incubación.

**Tabla 1.** Cambio de pH en el medio en condiciones de SMG y 1g. Promedio y desviación estándar de mediciones de pH final luego de 18 horas de incubación a 37°C en condiciones de SMG y 1g.

pH inicial del medio	pH final del medio en condiciones de 1g	pH final del medio en condiciones de MGS
6.5	5.3 ± 0.5	5.2 ± 0.5
7.5	5.6 ± 0.5	5.9 ± 0.9
8.5	6.0 ± 0.4	5.9 ± 0.3
9.5	6.1 ± 0.4	6.4 ± 0.5

La falta de datos de densidad óptica en condiciones de MGS y 1g a pH 7.5 con 20 µg/ml de carbenicilina se debe a la imposibilidad de medición por la presencia de burbujas que abarcaban todo el pozo.

Debido a que en distintas investigaciones en MGS se han observado que *K. pneumoniae* aumentó su resistencia a antibióticos y sobrevive en ambientes hostiles (Hammond et al., 2016; Kalpana et al., 2012; H. Wang et al., 2016; P. Wang & Wang, 2016), se esperaba observar un aumento de densidad óptica no importando el pH del medio y la concentración de carbenicilina. En la Figura 4, se observa que en condiciones de MGS existe una diferencia significativa entre las densidades ópticas obtenidas evaluadas agrupadas según el pH del medio y las condiciones de gravedad. En MGS la mayor densidad óptica se obtuvo a un pH de 8.5 con una concentración de 110µg/ml de carbenicilina; este aumento de resistencia a carbenicilina se observa a pH extremos y medios (6.5, 8.5 y 9.5). En condiciones de 1g, la mayor densidad óptica se obtuvo a un pH de 8.5 con una concentración de 20µg/ml de carbenicilina; esta resistencia a carbenicilina varía según el pH del medio aumentando a 50µg/ml en pH extremos (6.5 y 9.5) y llegando a 80µg/ml en pH 8.5. Lo descrito anteriormente indica que en condiciones de 1g la resistencia a carbenicilina es dependiente al pH del medio, mientras que en condiciones de MGS la resistencia a carbenicilina aumenta sin importar el pH del medio.

Por último, se evaluó la densidad bacteriana en la fase estacionaria de la curva de crecimiento de *K. pneumoniae* en distintas condiciones de gravedad, concentración de carbenicilina y pH (Figura 5). Debido a que los datos de densidad bacteriana se tomaron utilizando un lector de ELISA, existen algunos datos atípicos por la presencia de burbujas en la placa.

En la Figura 5 podemos observar que no importando las condiciones de gravedad, pH y concentración de carbenicilina, *K. pneumoniae* alcanza una densidad óptica similar en la fase estacionaria. En condiciones de MGS, no importando las variables evaluadas, *K. pneumoniae* experimenta una autólisis leve luego de 3 horas; mientras que en condiciones de 1g el fenómeno de autólisis se observa más pronunciado y luego de 6 horas. Lo descrito en esta investigación no concuerda con la investigación de autólisis en microgravedad en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* realizada por Kacena et al. (1999), pues encontraron que no existe diferencia entre la razón de autólisis experimentada en condiciones de microgravedad y gravedad normal. Nosotros proponemos que la diferencia en el tiempo e intensidad de la autólisis observada fue debido a que, en condiciones de MGS las bacterias regulan el pH local de una manera más eficiente afectando el ingreso del antibiótico betalactámico al periplasma. El ingreso reducido del antibiótico permite a las bacterias reproducirse y sobrevivir en ambientes hostiles al dedicar su metabolismo al crecimiento en lugar de la reparación celular. Sin embargo, no se obtuvieron datos experimentales para comprobarlo. La descripción de esta activación de autólisis en

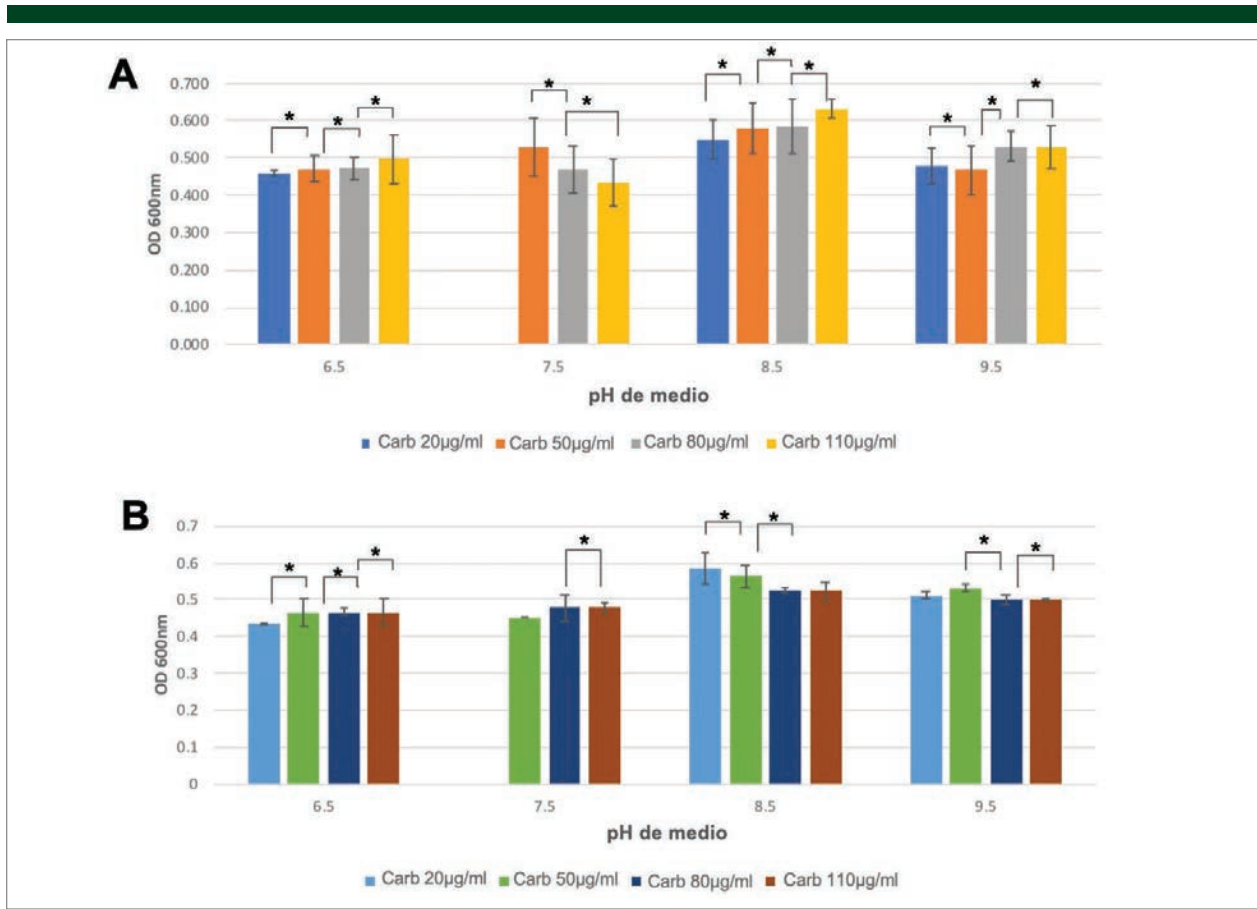


Figura 4. Crecimiento de *K. pneumoniae* a 18 horas de incubación a diferente pH en condiciones de MGS (A) y 1g (B). La mayor densidad óptica se observa en a un pH de 8.5 con una concentración de 110µg/ml de carbenicilina y a un pH de 8.5 con una concentración de 20µg/ml de carbenicilina para condiciones de MGS y 1g, respectivamente.

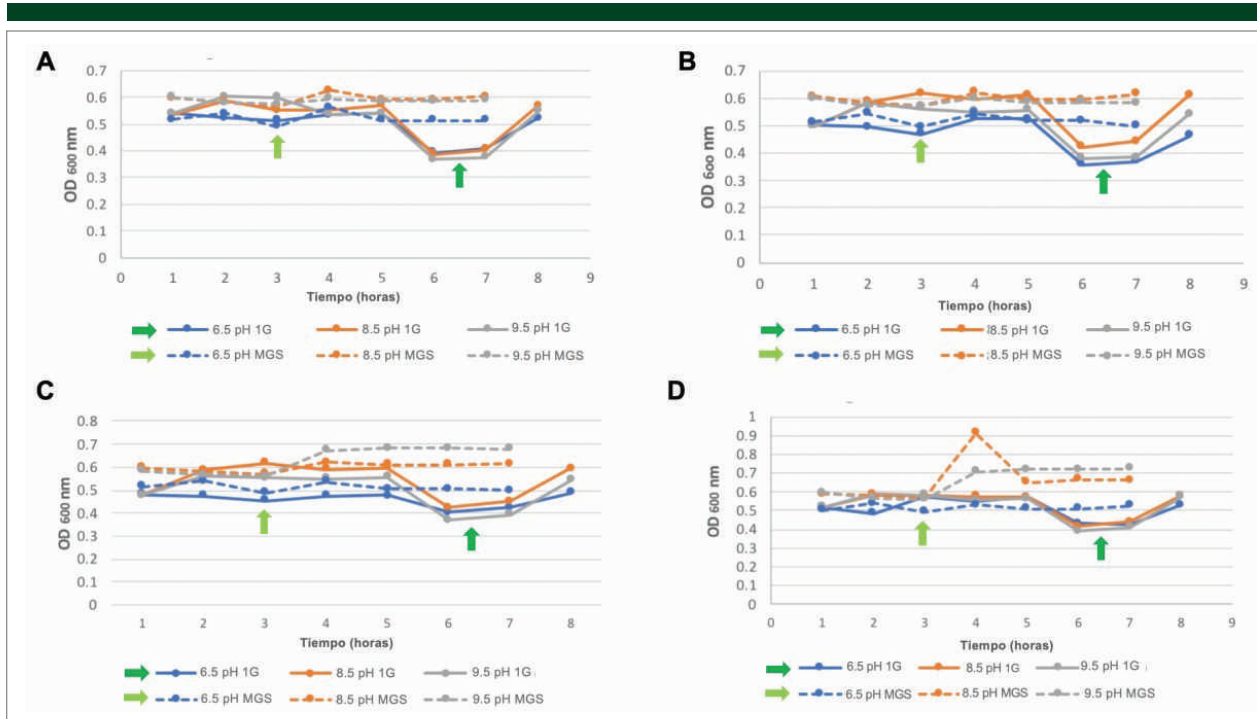


Figura 5. Fase estacionaria de *K. pneumoniae* en condiciones de SMG y 1g, a diferentes pH y concentraciones de carbenicilina. (A) 20µg/ml; (B) 50µg/ml; (C) 80µg/ml; (D) 110µg/ml. *K. pneumoniae* experimenta autólisis en la fase estacionaria en las distintas condiciones de gravedad. La autólisis en condiciones de MGS y 1g ocurre a los 3 horas de fase estacionaria y a las 6.5 horas de fase estacionaria, respectivamente.

condiciones de MGS puede ser un punto de partida para futuros estudios acerca de las implicaciones de la activación de autólisis en etapas tempranas en la fase estacionaria en la virulencia de *K. pneumoniae* en condiciones de MGS. Adicionalmente puede motivar el estudio del cambio de la estructura molecular de antibióticos, alterando su habilidad de ingresar al periplasma en condiciones de MGS. El experimento también demuestra que es posible realizar estudios de aumento de resistencia a antibióticos de una forma acelerada, al cultivarlos en un ambiente de microgravedad simulada. Esta técnica puede ser una herramienta que permita acelerar las pruebas de nuevos medicamentos en microorganismos multiresistentes.

## Conclusiones

1. Las condiciones de MGS no afectan la adaptación natural al pH del medio.
2. *K. pneumoniae* en MSG alcanza una mayor densidad óptica a altas concentraciones de carbenicilina y pHs ácidos y básicos.
3. La resistencia a carbenicilina en condiciones de 1g, es dependiente al pH del medio
4. La resistencia a carbenicilina en condiciones de MGS, aumenta sin importar el pH del medio.
5. *K. pneumoniae* cultivada en condiciones de MGS experimenta una autólisis más leve y en etapas más tempranas que en 1g.
6. La microgravedad podría utilizarse como una herramienta para acelerar las pruebas de nuevos medicamentos para microorganismos multiresistentes.

## Agradecimiento

Esta investigación no hubiera sido posible sin el financiamiento de la Embajada de los Estados Unidos en Guatemala (DOS-GUA-F18), el departamento de Bioquímica y Microbiología, el Centro de Estudios en Biotecnología, el Dr. Luis Zea de la Universidad de Colorado Boulder y Bioserve Technologies y la Dra. Pamela Pennington. La serie de experimentos fueron diseñados e implementados durante un taller de microbiología espacial, del 16 de julio al 20 de julio del 2018, impartido en la Universidad del Valle de Guatemala en los laboratorios del departamento de Bioquímica y Microbiología y el Centro de Estudios en Biotecnología. Agradecemos a BioServe Technologies por el préstamo del clinostat para realizar las simulaciones de microgravedad.

## Bibliografía

Aunins, T. R., Erickson, K. E., Prasad, N., Levy, S. E., Jones, A., Shrestha, S., Chatterjee, A. (2018) *Spaceflight modifies Escherichia coli gene expression in response to antibiotic exposure and reveals role of oxidative stress response* Frontiers in Microbiology <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00310>.

- Benoit, M.R., Klaus, D.M. (2007) *Microgravity, bacteria, and the influence of motility* Advances in Space Research 39 (7): 1225-1232 <https://doi.org/10.1016/j.asr.2006.10.009>.
- Checinska, A., Probst, A.J., Vaishampayan, P., White, J.R., Kumar, D., Stepanov, V. G. Venkateswaran, K. (2015) *Microbiomes of the dust particles collected from the International Space Station and Spacecraft Assembly Facilities* Microbiome 3: 50 <https://doi.org/10.1186/s40168-0150116-3>.
- Garg, S.K.K., Jain, A. (1995) *Fermentative production of 2, 3-butanediol: a review* Bioresource Technology 51 (2):103-109. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00136-0](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00136-0)
- Gelband, H., Miller-Petrie, M., Pant, S., Gandra, S., Levinson, J., Barter, D., Laxminarayan, R. (2015) *The State of the World's Antibiotics 2015 Global Resistance Partnership and The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy*.
- Guo, Y., Li, J., Liu, J., Wang, T., Li, Y., Yuan, Y., Liu, C. (2015) *Effects of Space Environment on Genome, Transcriptome, and Proteome of Klebsiella pneumoniae* Archives of Medical Research 46 (8): 609-618. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.11.001>
- Hammond, T.G., St DOieck, L., Birdsall, H.H., Koenig, P., Hammond, J.S., Gunter, M., Allen, P.L. (2016) *Effects of Microgravity and Clinorotation on the Virulence of Klebsiella, Streptococcus, Proteus, and Pseudomonas* Gravitational and Space Research 4 (1): 39-50. Recuperado a partir de <http://gravitationalandspacebiology.org/index.php/journal/article/view/719>
- Kacena, M.A., Smith, E.E., Todd, P. (1999) *Autolysis of Escherichia coli and Bacillus subtilis cells in low gravity* Applied Microbiology Biotechnology 52: 437-439.
- Kalpna, D., Cha, H.-J., Park, M.-K., Lee, Y.-S. (2012) *Growth, Morphology, Cross Stress Resistance and Antibiotic Susceptibility of K. pneumoniae Under Simulated Microgravity* Journal of the Environmental Sciences 21 (3): 267-276. <https://doi.org/10.5322/JES.2012.21.3.267>
- Kawamura, Y., Li, Y., Liu, H., Huang, X., Li, Z., Ezaki, T. (2001) *Bacterial population in Russian space station Mir* Microbiology and Immunology, 45 (12): 819-828. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2001.tb01321.x>
- Klaus, D. (2001) *Clinostats and bioreactors* Gravitational and space biology bulletin: publication of the American Society for Gravitational and Space Biology, 14 (2):55-64. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11865869>
- Klaus, D.M., Howard, H.N. (2006) *Antibiotic efficacy and microbial virulence during space flight* Trends in Biotechnology 24 (3) 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.01.008>
- Knols, B. G., Smallegange, R. C., Tacconelli, E., Magrini, N., Kahlmeter, G., Singh, N. (2016) *Global Priority List Of Antibiotic-resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, And Development Of New Antibiotics* The Lancet Infectious Diseases 9 (9): 535-536. [https://doi.org/10.1016/S14733099\(09\)70222-1](https://doi.org/10.1016/S14733099(09)70222-1)
- Lapchine, L., Moatti, N., Gasset, G., Richoille, G., Templier, J., Tixador, R. (1986) *Antibiotic activity in space* Drugs under experimental and clinical research 12 (12): 933-8. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3569006>
- Martin, R.M., Bachman, M.A. (2018) *Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae* Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 8 (January):1-15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Novikova, N.D. (2004) *Review of the Knowledge of Microbial Contamination of the Russian Manned Spacecraft* Microbial Ecology 47 (2) :127-132. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1055-2>
- Ritchie, L.E., Taddeo, S.S., Weeks, B.R., Bloomfield, S.A. (2015) *Space Environmental Factor Impacts upon Murine Colon Microbiota and Mucosal Homeostasis* PLoS ONE 10 (6): e0125792. doi:10.1371/journal.pone.0125792
- Rosado, H., Doyle, M., Hinds, J., Taylor, P.W. (2010) *Low-shear mDOelled microgravity alters expression of virulence determinants of Staphylococcus aureus* Acta Astronautica 66 (3-4):408-413. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2009.06.007>

- Sonnenfeld, G. (2005a) *The Immune System in Space, Including Earth-Based Benefits of Space- Based Research Current Pharmaceutical Biotechnology* 6 (4):343-349. Recuperado a partir de <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpb/2005/00000006/0000004/art00010>
- Sonnenfeld, G. (2005b) *Use of Animal MDOels for Space Flight Physiology Studies, With Special Focus on the Immune System* *Gravitational and Space Biology* 18 (2):31-35.
- Taylor, P., Kim, J. N., Lee, B. M. (2007) *Critical Reviews Risk Factors, Health Risks, and Risk Management for Aircraft Personnel and Frequent Flyers* *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*: 10 (3): 223-234. <https://doi.org/10.1080/10937400600882103>
- Tixador, R., Gasset, G., Eche, B., Moatti, N., Lapchine, L., Woldrigh, C., Tap, G. (1994) *Behavior of bacteria and antibiotics under space conditions* *Aviation, space, and environmental medicine*, 65 (6):551-6. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7521159>
- Tixador, R., Richoilley, G., Gasset, G., Planel, H., Moatti, N., Lapchine, L., Kirilova, F.M. (1985) *Preliminary results of Cytos 2 experiment* *Acta astronautica* 12 (2):131-4. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11542841>
- Tixador, R., Richoilley, G., Gasset, G., Templier, J., Bes, J. C., Moatti, N., Lapchine, L. (1985) *Study of minimal inhibitory concentration of antibiotics on bacteria cultivated in vitro in space (Cytos 2 experiment)* *Aviation, space, and environmental medicine* 56 (8):748-51. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3899095>
- Venkateswaran, K., Vaishampayan, P., Cisneros, J., Pierson, D. L., Rogers, S. O., Perry, J. (2014) *International Space Station environmental microbiome - Microbial inventories of ISS filter debris* *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (14): 6453-6466. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5650-6>
- Wang, H., Yan, Y., Rong, D., Wang, J., Wang, H., Liu, Z., Han, Y. (2016) *Increased biofilm formation ability in Klebsiella pneumoniae after short-term exposure to a simulated microgravity environment* *Microbiology* 5 (5) 793-601 <https://doi.org/10.1002/mbo3.370>
- Wang, P., Wang, J. (2016) *The Effect of Simulated Microgravity on Biological Characteristics of Klebsiella Pneumoniae* *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*:193. A7103
- Wilson, J.W., Ott, C.M., zu Bentrup, K.H., Ramamurthy, R., Quick, L., Porwollik, S., Nickerson, C.A. (2007) *Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq* *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (41):16299-16304. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707155104>
- Zea, L., Prasad, N., Levy, S. E., StDOieck, L., Jones, A., Shrestha, S., Klaus, D. (2016) *A molecular genetic basis explaining altered bacterial behavior in space* *PLoS ONE*, 11(11):1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164359>