
Penicillium rubens como el primer hongo modelo para estudiar el efecto de la microgravedad en la producción de antibióticos

María Alejandra Barrientos Montepeque



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Penicillium rubens como el primer hongo modelo
para estudiar el efecto de la microgravedad en la
producción de antibióticos

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por María
Alejandra Barrientos Montepeque para optar al grado académico de
Licenciada en Biotecnología Molecular

Guatemala
2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

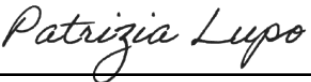


Penicillium rubens como el primer hongo modelo
para estudiar el efecto de la microgravedad en la
producción de antibióticos

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por María
Alejandra Barrientos Montepeque para optar al grado académico de
Licenciada en Biotecnología Molecular

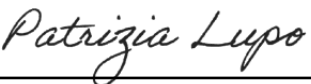
Guatemala
2024

Vo.Bo.:

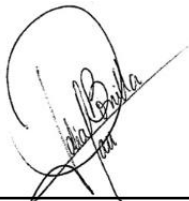
(f) 

PhD. Patrizia Lupo

Tribunal Examinador:

(f) 

PhD. Patrizia Lupo

(f) 

PhD. Dalia Lau

(f) 

PhD. Krisztina Rios-Gonzalez

Fecha de aprobación: Guatemala, 5 de Enero 2024.

El día de hoy agradezco a Dios porque las plegarias de mis sueños fueron escuchadas. Porque muchas veces le transmití mi deseo de ser científica y me dio la oportunidad de lograrlo. Agradezco a la Virgen María porque todas mis peticiones fueron cumplidas por su intersección y por la tranquilidad brindada en mis días más ajetreados.

Agradezco a mis padres, Gerardo Barrientos y Mildred Montepeque, por su constante apoyo en la realización de mis sueños profesionales. han sido mis más grandes impulsores para lograrlo. Por ellos sé que todo es cuestión de actitud, que el soñador deja de soñar cuando muere, que se pierde al no intentar y que quien persevera alcanza. También expreso agradecimiento a mi hermana, Mildred Barrientos, que ha presumido hasta el cansancio hasta el más pequeño de mis logros. Gracias a mi familia porque mi éxito se saborea mejor con ellos a mi lado.

Gracias a los amigos que me apoyaron en el proceso y observaron los resultados del experimento, por recordarme que el éxito es la suma de los esfuerzos de todos los días.

Agradezco muchísimo a las personas que me formaron como científica, sin su mentoría no lo hubiese logrado. Se los agradezco de todo corazón:

Dr. Luis Zea, por darme la retroalimentación y la oportunidad de estar en el proyecto Space Biofilms y por permitirme hacer microbiología espacial con dedicación, así como permitirme aprender de ciencias espaciales.

Dra. Pennington, por su constante retroalimentación de la metodología de microscopía y su supervisión en cada alternativa de experimentación.

Dra. Patrizia Lupo, por acompañarme en toda la investigación y enseñarme a disfrutar del proceso de la experimentación con optimismo. Me ha mostrado que los científicos perseveran por el día en que las cosas finalmente funcionan. Gracias a su guía, me he convertido en la investigadora que siempre soñé ser desde niña. Le agradezco infinitamente.

Dra. Pamela Flores, por revisar mis dudas con paciencia y entusiasmo, así como los protocolos establecidos en Bioserve Space Technologies y darnos su opinión sobre la técnica de microscopía.

A cada uno de los profesores que preguntaron por los avances, me recomendaron mejoras a la experimentación y me inspiraron sin siquiera percatarse de lo acontecido, mil gracias: Dra. Krisztina Rios-Gonzalez, Dra. Dalia Lau, Dr. Diego Archila, Licda. Ana Luisa Mendizábal, MSc. Miguel Morales, MSc. Marie Cosenza, Dr. Daniel Ariano y a mi primera profesora de universidad, Dra. Zaida Pérez.

Prefacio.....	III
Lista de figuras.....	VIII
Lista de cuadros.....	X
Resumen.....	XI
Abstract.....	XII
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	3
A. Objetivo general.....	3
B. Objetivos específicos.....	3
III. Justificación.....	4
IV. Marco teórico.....	6
A. Importancia de los hongos en la tierra.....	6
B. Hongos mitospóricos.....	7
C. Hongos como contaminantes.....	7
D. Hongos como contaminantes espaciales.....	8
E. <i>Penicillium rubens</i>	9
F. Función de las biopelículas.....	10
G. Función de los peroxisomas.....	10
H. Método de inmunohistoquímica directo.....	11
I. Método de microscopía electrónica de barrido.....	12
V. Antecedentes.....	13
VI. Metodología.....	14
A. Enfoque y diseño de la investigación.....	14
B. Sitio de estudio.....	14
C. Tipo y tamaño de la muestra.....	14
D. Criterios de inclusión y exclusión.....	15

E.	VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
F.	HIPÓTESIS	16
G.	SUPUESTO DE INVESTIGACIÓN.....	17
H.	INSTRUMENTOS O TÉCNICAS	17
I.	ESTRATEGIA.....	17
J.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1.	Obtención de muestras del modelo fúngico fijadas para pruebas de microgravedad y gravedad Tierra.....	17
2.	Preparación de muestras y activación de axperimentos para el modelo fúngico en los regímenes gravitatorios	17
3.	Preparación de <i>Penicillium rubens</i> para la tinción inmunofluorescente con anti-PEX14	25
4.	Tinción inmunofluorescente de pruebas de <i>Penicillium rubens</i> en microgravedad y gravedad terrestre	25
5.	Preparación de <i>Penicillium rubens</i> para el análisis de microscopía electrónica de barrido	26
VII.	Resultados.....	27
A.	Resultados del microscopio de fluorescencia	27
B.	Resultados del microscopio electrónico de barrido.....	32
1.	Análisis de las estructuras del hongo en el sustrato.....	32
2.	Análisis químicos e imágenes del sustrato	40
VIII.	Análisis de Resultados	45
A.	Comparación de Peroxisomas en la Tierra y espacio	45
B.	Análisis de las muestras en el microscopio electrónico de barrido.....	47
IX.	Conclusiones	50
X.	Recomendaciones.....	51
	Referencias	52
XI.	Anexos	57

Lista de figuras

Figura 1.	Ruta metabólica de la síntesis de penicilina en <i>Penicillium rubens</i>	7
Figura 2.	Estructuras somáticas de los hongos mitospóricos	8
Figura 3.	Cultivo de <i>Penicillium rubens</i> ATCC (®) 28089 en agar PDA por 8 días a 25°C.	10
Figura 4.	Placas de 24 pocillos con cupones antes de la inoculación con <i>Penicillium rubens</i>	15
Figura 5.	Canasta de baño ultrasónico para la limpieza de los cupones de metal	18
Figura 6.	Limpieza de los cupones de silicona (blancos) y de metal (plateados) con 70 % de etanol.	19
Figura 7.	Siembra del inóculo inicial de <i>Penicillium rubens</i>	20
Figura 8.	Jeringas con émbolos Luer empleadas para inyectar agua en las muestras de gravedad Tierra.	21
Figura 9.	Jeringas 18 G ½ empleadas en las muestras de vuelo en la Estación Espacial Internacional.	22
Figura 10.	Cupones de silicón en placas de 24 pocillos.	23
Figura 11.	Proceso de inoculación de los cupones de acero inoxidable con <i>Penicillium rubens</i>	24
Figura 12.	Dispositivo PHAB empleado para llevarse a la Estación Espacial Internacional y probarse en gravedad terrestre.	25
Figura 13.	Preparación de las muestras de <i>Penicillium rubens</i> ATTC (®) 28089 TM en cupones de acero inoxidable en baño de oro bajo los regímenes gravitatorios a comparar.	26
Figura 14.	Hifa del hongo que marca los peroxisomas con anti- PEX-14, conjugado con Coralite (®) 488 para muestras de <i>Penicillium rubens</i> en SS316 con sustrato PDB.	27
Figura 15.	Moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (®) 28089 en cupón acero inoxidable SS316 por 15 días en exposición a microgravedad	28
Figura 16.	Moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (®) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316 por 15 días en gravedad terrestre.	29

Figura 17.	Moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316 por 20 días en microgravedad	30
Figura 18.	Moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316 por 20 días en gravedad terrestre.	31
Figura 19.	Imagen usada para la evaluación cuantitativa del diámetro de las hifas del moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 expuesto por 15 días a microgravedad	32
Figura 20.	Imagen usada para la evaluación cuantitativa del diámetro del hongo de las hifas del moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 expuesto por 15 días a microgravedad.	33
Figura 21.	Imagen usada para la evaluación cuantitativa del diámetro del hongo de las hifas del moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 expuestas por 15 días a gravedad terrestre.	34
Figura 22.	Imagen usada para el análisis del grosor de hifas encapsuladas en biopelículas <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 expuestas a 20 días a gravedad terrestre.	35
Figura 23.	Imagen usada para el análisis del grosor de hifas en biopelículas de <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 expuestas por 15 días a gravedad terrestre	36
Figura 24.	Imagen usada para el análisis del grosor de hifas encapsuladas en biopelículas de <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 expuestas por 20 días a microgravedad.	37
Figura 25.	Imagen usada para el análisis del grosor de hifas encapsuladas en biopelículas <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 expuestas por 20 días a gravedad terrestre.	38
Figura 26.	Imagen usada para el análisis del grosor del diametro de los conidios de <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 expuestas por 20 días a microgravedad.	39
Figura 27.	Moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316, en 15 días de regímenes gravitatorios para el análisis químico de hifas.	40
Figura 28.	Moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316, en 15 días de regímenes gravitatorios para el análisis químico de las hifas	41
Figura 29.	Moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316, en 20 días de regímenes gravitatorios para el análisis químico de hifas en biopelículas.	42
Figura 30.	Moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316, en 20 días de regímenes gravitatorios para el análisis químico de conidios.	43
Figura 31.	Composición química base del medio PDB en SS316, de la sección total del cupón SS316 del lado derecho está la composición total.	57
Figura 32.	Composición química base de medio PDB en SS316.	57
Figura 33.	Moho <i>Penicillium rubens</i> ATCC (R) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316. F-124 muestra la prueba de 20 días de microgravedad a 370x de aumento.	58

Figura 34. Prueba señuelo de <i>Penicillium rubens</i> ATCC ® 28089. Tinción azul de lactofenol después de 15 días de crecimiento en acero inoxidable SS316 con medio PDB. Se trató por 24 horas con 4% de PFA.	59
Figura 35. Comprobación de morfología de <i>Penicillium rubens</i> ATCC ® 28089 crecidas en agar PDA por 8 días por medio de la tinción azul de lactofenol en microscopio a 40 x.	59

Lista de cuadros

Cuadro 1.	variables para evaluar los análisis de las mediciones del estudio. . . .	16
Cuadro 2.	Análisis del grosor de las hifas encapsuladas en biopelículas de <i>Penicillium rubens ATCC</i> ® 28089 expuestas a 15 días en microgravedad sobre SS316 con PDA.	33
Cuadro 3.	Análisis del grosor de las hifas de <i>Penicillium rubens ATCC</i> ® 28089 expuestas a gravedad terrestre durante 15 días sobre SS316 con PDA.	33
Cuadro 4.	Análisis del grosor de las hifas encapsuladas en biopelículas de <i>Penicillium rubens ATCC</i> ® 28089 expuestas a 20 días en gravedad terrestre sobre SS316 con PDA.	35
Cuadro 5.	Análisis del grosor de las hifas encapsuladas en biopelículas de <i>Penicillium rubens ATCC</i> ® 28089 expuestas por 15 días a gravedad terrestre sobre SS316 con PDA.	36
Cuadro 6.	Análisis del grosor de las hifas encapsuladas en biopelículas de <i>Penicillium rubens ATCC</i> ® 28089 expuestas por 20 días a microgravedad sobre SS316 con PDA.	37
Cuadro 7.	Análisis del grosor de las hifas encapsuladas en biopelículas de <i>Penicillium rubens ATCC</i> ® 28089 expuesto por 20 días en gravedad terrestre sobre SS316 con PDA.	38
Cuadro 8.	Análisis del grosor de conidios de <i>Penicillium rubens ATCC</i> ® 28089 expuesto por 20 días a microgravedad sobre SS316 con PDA.	39
Cuadro 9.	Diferencias en la composición química porcentual de las hifas del moho <i>Penicillium rubens ATCC</i> ® 28089 crecido en cupón acero inoxidable SS316 en los 15 días de regímenes gravitatorios.	41
Cuadro 10.	Diferencias en la composición química porcentual de las hifas en biopelículas del moho <i>Penicillium rubens ATCC</i> ® 28089 en cupón acero inoxidable SS316 en los 15 días de regímenes gravitatorios.	42
Cuadro 11.	Diferencias en la composición química porcentual de las hifas del moho <i>Penicillium rubens ATCC</i> ® 28089 en cupón de acero inoxidable SS316 en los 20 días de regímenes gravitatorios.	43

Cuadro 12. Diferencias en la composición química porcentual de conidios del
moho *Penicillium rubens* ATCC [®] 28089 en cupón de acero inoxidable SS316 en
los 20 días de regímenes gravitatorios. 44

La NASA realiza investigaciones continuas sobre los hongos al estar relacionados con contaminaciones en la Estación Internacional Espacial. *Penicillium rubens* es uno de los hongos previamente encontrados en los cohetes espaciales que representa un riesgo para la salud de los astronautas. Puede también presentar cambios en la producción de metabolitos secundarios cuando se expone a microgravedad, lo cual presenta un interés económico para la industria farmacéutica. Se expone el siguiente estudio sobre los peroxisomas de *Penicillium rubens* bajo los efectos de la microgravedad, ya que son los organelos involucrados tanto en la producción de metabolitos secundarios de importancia farmacéutica como en la penicilina. Los peroxisomas están también involucrados en la biogénesis de las hifas y en la formación de los biofilms. Se utilizó la microscopía de fluorescencia y el microscopio electrónico de barrido para analizar la morfología y cantidad de peroxisomas. El análisis de los peroxisomas no detectó ninguna diferencia significativa en el número cuando el hongo se encuentra en condiciones de microgravedad comparado con la gravedad terrestre. Cuando se realizó el análisis de microscopía electrónica de barrido, se observaron variaciones de la hifa bajo el efecto de la microgravedad, así como variaciones en la composición química del sustrato como carbono, oxígeno y sodio, que pueden estar relacionados con la respiración celular y su disponibilidad en el medio. Este es uno de los primeros estudios realizados sobre hongos en microgravedad que ayuda a aclarar el rol de los peroxisomas bajo el efecto de la microgravedad y abre nuevas líneas de investigación que son importantes para la salud humana, así como a nivel industrial.

Palabras clave: Peroxisomas, *Penicillium rubens*, microscopía de fluorescencia, microscopía electrónica de barrido, Estación Espacial Internacional.

NASA conducts ongoing research on fungi as they are linked to contamination on the International Space Station. *Penicillium rubens* is one of the fungi previously found on space rockets that represents a health risk to astronauts. It can also exhibit changes in the production of secondary metabolites when exposed to microgravity, which is of economic interest to the pharmaceutical industry. The following study is presented on the peroxisomes of *Penicillium rubens* under the effects of microgravity, since they are the organelles involved in the production of secondary metabolites of pharmaceutical importance as well as penicillin. Peroxisomes are also involved in the biogenesis of hyphae and in the formation of biofilms. Fluorescence microscopy and scanning electron microscopy were used to analyze the morphology and quantity of peroxisomes. The analysis of peroxisomes did not detect any significant difference in the number when the fungus is in microgravity conditions compared to Earth's gravity. When the scanning electron microscopy analysis was performed, variations of the hypha under the effect of microgravity were observed, as well as variations in the chemical composition of the substrate such as carbon, oxygen and sodium, which may be related to cellular respiration and its availability in the medium. This is one of the first studies carried out on fungi in microgravity that helps to clarify the role of peroxisomes under the effect of microgravity and opens new lines of research that are important for human health, as well as at an industrial level.

Keywords: Peroxisomes, *Penicillium rubens*, fluorescence microscopy, scanning electron microscopy, International Space Station.

Los hongos desempeñan un papel importante en la Tierra al ser ecológicos activos importantes para el equilibrio ambiental. También poseen características que les permiten adaptarse a su ambiente, por lo que se estudian estas interacciones y la relación con el microambiente como especies claves en las comunidades microbianas (Bielčík et al., 2019).

Al estar en ambientes con contaminantes y en condiciones de cambio climático, los hongos pueden causar infecciones mortales, ya que, como mecanismo de defensa, tienden a propagarse rápidamente y desarrollar en ellos mecanismos como la evasión de drogas, lo que puede resultar en fallas en las terapias disponibles (van Rhijn & Bromley, 2021).

La erradicación de hongos como *Penicillium sp.*, que colonizan superficies, representa un desafío en materiales hospitalarios, como catéteres y prótesis. Los estudios en microgravedad representan un modelo ideal del comportamiento de las prótesis en el cuerpo humano, siendo un acercamiento para evaluar los mecanismos de contaminación de biopelículas en estos materiales. Los hallazgos de la evaluación de materiales contaminados con hongos bajo el efecto de la microgravedad, permiten elegir el mejor material para el paciente (Zea et al., 2018; Liu et al., 2022; Paul et al., 2013). Los hongos en el espacio representan otro desafío, ya que son contaminantes de interés que pueden afectar los alimentos y el agua. Además, en ocasiones, resultan corrosivos para los materiales de las estaciones espaciales, lo que puede requerir el reemplazo de estas superficies (Zea et al., 2020).

Estudios previos han reportado al *Penicillium rubens* como un contaminante que ha sido llevado al espacio (Novikova et al., 2006). La presente investigación utiliza *Penicillium rubens* como hongo modelo en microgravedad y analiza su comportamiento en acero inoxidable SS316 con medio PDB. Otros estudios han demostrado que los hongos están relacionados con alergias por la producción de micotoxinas, causando problemas en la salud tanto en la Tierra como en el espacio (Egbuta et al., 2017).

Esta cepa produce penicilina como metabolitos secundarios, razón por la cual se analizaron los peroxisomas por medio de microscopía de fluorescencia utilizando el método de inmunotinción con PEX-14, un marcador específico de peroxisomas (Opaliński et al., 2010). También se evaluaron muestras dirigidas no probabilísticas de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 crecidas en acero inoxidable SS316, brindadas por BioServe Space Technologies, en las que se evaluaron las variables de gravedad terrestre y microgravedad en periodos de exposición de 15 y 20 días, ya que es el primer experimento con este hongo y variables. La investigación se divide por análisis de los peroxisomas con microscopio a fluorescencia, seguido de la observación de la morfología de hifas, hifas en biopelículas y conidios en

el sustrato de acero inoxidable con microscopía electrónica de barrido, acompañado por un estudio de composición química del sustrato. Este es un estudio pionero que evalúa el comportamiento de estos organelos y plantea las bases para alternativas de producción de metabolitos secundarios en la industria de medicamentos, así como del comportamiento del hongo modelo en acero inoxidable SS316.

A. Objetivo general

Comparar el efecto de la microgravedad frente a la gravedad de la tierra en la morfología y tamaño de las hifas, así como en la producción de peroxisomas empleando *Penicillium rubens*, como hongo modelo.

B. Objetivos específicos

- Estandarizar inmunotinciones con el anticuerpo anti-PEX-14 conjugado con Coralite® 488 fluorescente de Proteintech empleando muestras de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 crecidas en acero inoxidable SS316 con el microscopio de fluorescencia Leica DM 2500 LED.
- Observar cambios en la cantidad y morfología de los peroxisomas crecidos en los cupones de acero sometidos a microgravedad y gravedad tierra por 15 y 20 días, por medio de microscopía de fluorescencia.
- Comparar por medio de microscopía electrónica de barrido el crecimiento del hongo en los cupones de acero inoxidable SS316 de 15 y 20 días de microgravedad y gravedad terrestre, usando el microscopio JSM-IT500, con el fin de observar diferencias en morfología y tamaños de las hifas, así como cambios en la composición química del sustrato.

En la presente propuesta se plantea un estudio complementario del proyecto Space Biofilms de la NASA, estudiando el hongo modelo *Penicillium rubens*. Se piensa que la microgravedad y la restricción de alimento, inducidas por una delgada capa de medio PDB (caldo de glucosa de papa), pueden inducir cambios significativos en la morfología del hongo y composición química del sustrato. Se hipotetiza que estos cambios están vinculados a una mayor saturación de hifas durante los regímenes gravitacionales, debido a la presencia de glucosa y extracto de papa en polvo en el medio de cultivo, así como a la interacción con los componentes del acero inoxidable. Estos factores pueden desencadenar adaptaciones metabólicas y estructurales que afectarán la fisiología y el crecimiento del organismo en este entorno desafiante (Kumar et al., 2012).

Se plantea observar cuantitativamente la morfología de los peroxisomas de *Penicillium rubens* después de 15 y 20 días en microgravedad y gravedad terrestre en cupones SS316. Para detectar la presencia de los peroxisomas se empleará un anticuerpo anti PEX-14 conjugado con Coralite [®]488 y se evaluará la fluorescencia mediante el microscopio Leica DM 2500 LED. Al mismo tiempo se usará el microscopio electrónico de barrido JSM- IT500 para evaluar la morfología de las hifas y analizar la composición química de los cupones donde crece el hongo bajo los diferentes regímenes gravitacionales. Los hongos forman biopelículas fúngicas que vuelven a el hongo resistente al momento de tratar la contaminación con drogas antifúngicas (Sham et al., 2021). Las biopelículas fúngicas se ha estudiado en las naves espaciales ya que representan un riesgo para la salud de los astronautas y para la integridad de las superficies de los materiales de las naves espaciales, causando un tema de interés para la Administración Nacional de Aeronáutica y del Espacio (NASA) las tiene en monitoreo continuo ((Novikova et al., 2006; Bartoszewska et al., 2011)). Estudios previos han identificado biopelículas fúngicas en las estaciones espaciales Salyuts, Mir, Skylab e ISS, por lo que representan un riesgo para los astronautas (Bartoszewska et al., 2011).

Penicillium rubens es un hongo ampliamente estudiado en el ámbito hospitalario, así como *Aspergillus sp.* y *Cladosporium sp.*, estos son hongos que se caracterizan por ser contaminantes ambientales, ya que poseen esporas fuertes y persistentes [62]. *Penicillium* al ser el principal contaminante del aire con un 70 % de presencia en la Tierra se ha transportado en las naves espaciales y se ha encontrado por su dominancia en la colonización superficial de la Estación Internacional Espacial (EEI) y el cohete Mir en compañía con *Aspergillus* (Klintworth et al., 1999). Al observar la prevalencia de los hongos en la EEI se han estudiado especies fúngicas modelo como *Candida albicans* en simulación de microgravedad a los 12 días como un acercamiento a esta problemática de contaminación. Este género tiene un aumento en las biopelículas y en el caso de la especie de *Candida albicans* pasa a

una dominancia con estructuras filamentosas demostrando una posible tendencia patogénica al estar en el espacio (Searles et al., 2011).

Además, Cortesao y sus compañeros encontraron que otro modelo fúngico *Aspergillus niger* el cual tiene estructuras filamentosas en tierra, durante la exposición en microgravedad simulada tiene aumento en el espesor de la biopelícula y persistencia de las esporas, esto representa un peligro para la salud de los astronautas (Cortese et al., 2022). En otros estudios más recientes realizados en la exposición de microgravedad por Bioserve Space Technologies, evaluaron el crecimiento de *Penicillium rubens* En distintos materiales de interés espacial, se demostró que el hongo aumenta la producción de biofilm cuando se cultiva sobre acero inoxidable SS316. Estos experimentos se evaluaron durante un lapso de exposición de 15 y 20 días en microgravedad, utilizando muestras crecidas en gravedad terrestre como control (Hupka et al., 2023).

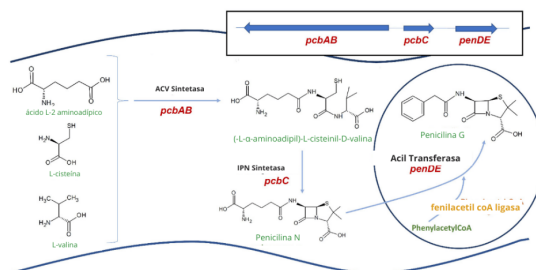
A. Importancia de los hongos en la tierra

Los hongos, al descomponer la materia vegetal, no solo cumplen un papel crucial en la ecología de los ecosistemas, sino que también promueven interacciones beneficiosas con la diversidad de plantas, éstas promueven el aumento de las fuentes de carbono y atribuyen a la estabilidad del ecosistema (Shen et al., 2022).

Esta interacción también resulta en la disminución de patógenos y en un aumento en la captación de nutrientes (Alekkett & Boddy, 2021). Un ejemplo de como los hongos brindan estabilidad en los ecosistemas mediante simbiosis con otros organismos es *Tricoderma sp.* este hongo tiene funciones de prevención y control de plagas fúngicas y de nemátodos, de manera simultánea ha demostrado disminuir contaminantes agro industriales (Yao et al., 2023).

Además de la versatilidad de roles en la tierra al contener metabolitos secundarios se han empleado en la industria farmacéutica, los hongos son usados como la materia prima que se emplea para la síntesis de alcoholes, enzimas y ácidos orgánicos (Adrio & Demain, 2003). En el caso de *Penicillium rubens* son usados para síntesis de los aminoácidos L-cisteína y L-valina u otros compuestos como el caso del ácido L-2-aminoadípico (Fierro et al., 2022). Nuestro hongo de estudio también es conocido como fábrica celular por la producción de penicilina (Fierro et al., 2022). Los siguientes pasos de la ruta metabólica son un resumen del paso de penicilina G a penicilina N, como se observa en la figura 4.1.

Figura 1: Ruta metabólica de la síntesis de penicilina en *Penicillium rubens*.



Se observa en la esquina superior derecha de la figura 4.1 los genes responsables de las activaciones enzimáticas en negritas, estos son los puntos claves para la síntesis de penicilina N, la que se usa en la industria farmacéutica (Fierro et al., 2022). Nota adaptado de (Fierro et al., 2022)

Con la base previa mostrada en la figura 4.1 y el conocimiento del rol de los peroxisomas en la β -oxidación, este estudio busca ser la base de estudios posteriores para estudiar los mecanismos de síntesis de lípidos en microgravedad y su posible participación en mecanismos de adhesión, formación de biopelículas y pared celular (Aliyu et al., 2019; Ueda et al., 2022; Zhang et al., 2022).

B. Hongos mitospóricos

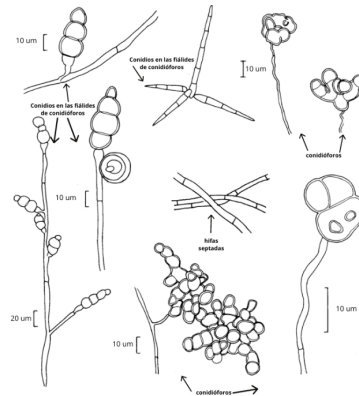
Una de las clases más presentes en el reino fungi son los *Hyphomycetes*, comúnmente llamados mitospóricos. Esta agrupación reúne las características de hifas septadas, reproducción por conidios y presencia de células conidiógenas (Sutton, 2014). Después de los avances de la biología molecular se ha determinado mediante la identificación de los genes ITS rADN especies que no se han clasificado sin embargo cumplen con los requerimientos de la clase (Franco-Duarte et al., 2022).

C. Hongos como contaminantes

El estrés ambiental como el cambio climático, contaminantes e incluso la presencia de químicos, propicia a ciertas especies fúngicas tiendan a propagarse de manera desmedida, por lo que son consideradas contaminantes en los ambientes (Khan & Karuppaiyl, 2012).

Además de colonizar espacios, tienden a generar estrategias para producir toxinas y asegurar la estancia en el área de distribución, como las micotoxinas. Estas son producidas por algunos hongos filamentosos y son principalmente contaminantes durante el proceso de almacenamiento de los cultivos y alimentos debido al manejo inapropiado, lo que repercute en infecciones y alergias en humanos y animales que consumen estos alimentos (Adeyeye, 2016). En el caso que estas micotoxinas presentes en alimentos estén en exposiciones prologadas con humanos, se ha observado que están correlacio-

Figura 2: Estructuras somáticas de los hongos mitospóricos



Estas estructuras son las que se utilizan para la identificación morfológica. Nota. Adaptada de Moreira y Schoenlein-Crusius, 2012.

nadas con cáncer colorrectal y hepatocelular tal es el caso de aflatoxinas, ocratoxinas, timosinas y patulinas (De Ruyck et al., 2015). En el caso que estas toxinas son inhaladas prolongadamente, pueden causar inflamación pulmonar y en casos extremos dificultar la respiración (Wong et al., 2016).

Algunas especies de hongos filamentosos que son causantes de estas contaminaciones en alimentos son *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Penicillium sp.* Entre las estrategias que se usan para erradicar la colonización en los alimentos son métodos de limpieza que se basan en el uso de detergentes, seguido de saneamiento y secado del alimento. Métodos como la limpieza in situ (CIP) que se emplean en lácteos y evita la aglomeración de los microorganismos mediante la ruptura de pared celular y disminución de carbohidratos disponibles, sin embargo requieren mucho tiempo para la implementación (Hamad et al., 2023).

D. Hongos como contaminantes espaciales

A pesar de los retos que representan los microorganismos al salir del planeta Tierra en las naves espaciales, las características que poseen de plasticidad y adaptabilidad de los hongos resultan ser similares a los espacios habitados por humanos en gravedad terrestre y en la Estación Espacial Internacional (Acres et al., 2021). Un ejemplo que relaciona la microgravedad y la variable de radiación espacial en la especie fúngica de *Aspergillus niger* se detalló en un experimento en el que se pone a prueba una simulación de radiación espacial y al comparar 3 tipos de cepas de la misma especie infirieron que las esporas resultan ser resistentes a rayos X y radiación cósmica por lo cual este hongo debe estar en constante vigilancia por la capacidad de permanencia prolongada que puede tener (Simões et al., 2023)

Dado que los hongos son microorganismos que se les ha relacionado como contaminantes en la Tierra, al partir los cohetes a la Estación Espacial Internacional (EEI) se ha encontrado que la estación Espacial al igual que en la Tierra ha tenido incidencia con patógenos oportunistas, esto se obtuvo a través de un análisis muestral recopilado por un lapso de 6 años, el cual confirmó que algunos de estos hongos y bacterias causan degradación de materiales espaciales (Novikova et al.,

2006).

Esta respuesta ha sido notoria e inevitable en las naves espaciales ya que han detectado hongos en la superficie de paneles, ventanas, tuberías y varios componentes de hardware en la Estación Espacial Internacional (EEI) (Novikova et al., 2006). Un estudio que recopiló mediciones periódicas de este sitio detalló la contaminación de la superficie de la EEI en un período de seis años, mostrando que la contaminación está correlacionada con la llegada de astronautas y la entrega de cargamento desde la Tierra al espacio, al mismo tiempo se observa dominancia de las especies en *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.* como hongos contaminantes (Novikova et al., 2006).

Asimismo, estas especies fueron encontradas en el aire generando preocupación sobre el riesgo para la salud de los astronautas debido a su condición de inmunosupresión, estos fueron encontrados en las estaciones espaciales Salyuts, Mir, Skylab y EEI (Bartoszewska et al., 2011; Klintworth et al., 1999). Además, estas biopelículas causan la degradación de las superficies de las naves espaciales, lo que ha llevado a la NASA a estudiar estos efectos con prioridad (Novikova et al., 2006). Especialmente, dado que la microgravedad puede inducir cambios en el crecimiento y la fisiología de la biopelícula, una experimento de microgravedad simulada mostró que *Penicillium* puede desarrollar una biopelícula robusta en 48 horas, mientras que en la Tierra se necesitan 96 horas para alcanzar una formación de biopelícula tan robusta (Zea et al., 2020; Novikova et al., 2006; Acres et al., 2021).

E. *Penicillium rubens*

Penicillium es un hongo filamentoso del grupo de hongos mitospóricos, como se mencionó previamente y es perteneciente al filo Ascomycota. Su colonia en cultivo tiende a ser aterciopelada con círculos adentro de ella, al inicio del crecimiento se identifica por tener un color blanco con textura terciopelada, sin embargo, a los 7-8 días esta colonia se adhiere más al medio y se torna en un color entre verde y gris (Xia et al., 2018).

El género *Penicillium* es conocido por su capacidad de adaptación a una variedad de ambientes y por sus diversas estrategias de supervivencia. Algunas especies de *Penicillium* pueden adherirse a superficies, lo que les permite formar biopelículas en ambientes como metales marinos, siendo de ayuda para perdurar en esas superficies. Además, son capaces de degradar proteínas como la caseína y la albúmina, lo que les proporciona una fuente de nutrientes y disminución de especies que compitan por el mismo espacio. También al producir ácido glucónico y diversas micotoxinas aseguran el espacio que colonizan. Estas adaptaciones hacen que *Penicillium* sea un género versátil y exitoso en una variedad de entornos (Jameel & Yassein, 2021; Mansfeld et al., 1991; Peng et al., 2014).

Penicillium rubens además de ser un hongo que se adapta en su ambiente natural es empleado como productor de antibióticos y otros materiales, ya que se usa comúnmente como bio fábrica en diferentes industrias. El antibiótico producido por el hongo, la penicilina, está en el enfoque de las investigaciones actuales para mejorar los rendimientos de la producción industrial (Pathak et al., 2020). Una de estas estrategias propuestas es modificar genéticamente cepas de *P. rubens* para aumentar la producción de penicilina, sin embargo, la información sobre los grupos silenciadores de genes que regulan la biosíntesis del antibiótico es limitada haciendo el proceso exploratorio ineficaz (Boruta, 2018).

La investigación actual se ha centrado en la identificación de productos intermediarios que pueden aumentar la síntesis del antibiótico por equilibrio metabólico, así como especies que tengan cambios enzimáticos por factores como radiación y microgravedad (Boruta, 2018). La información recolectada en estos hallazgos es prometedora para mejoras en la producción, favoreciendo el manejo de cepas mutantes, mediante ingeniería genética mejorando el rendimiento de los metabolitos secundarios.

El cultivo de la cepa *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 está presentada en la siguiente figura :

Figura 3: Cultivo de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 en agar PDA por 8 días a 25°C.



Del lado derecho se muestra el sembrado del estudio. Nota. Elaboración propia.

F. Función de las biopelículas

Las biopelículas o biofilms son conglomerados microbianos protegidos por una capa de exopolisacáridos. Esta agrupación facilita la comunicación con otros microorganismos mediante señales de quorum sensing, el resultado es un aumento en la diversidad del grupo, lo cual resulta problemático debido a la adaptación de los microorganismos a factores de estrés bióticos y abióticos resultando en la resistencia frente a antibióticos, antimicóticos y antisépticos (Parrilli et al., 2022). En el caso de los hongos, pueden convertirse en contaminantes fúngicos en dispositivos médicos y superficies hospitalarias en la Tierra (Costa-Orlandi et al., 2017; Janani et al., 2022; Penesyan et al., 2021).

G. Función de los peroxisomas

Los peroxisomas son organelos fundamentales presentes en los hongos, desempeñando diversas funciones esenciales como la producción de β -oxidación, la degradación de peróxido de hidrógeno, el movimiento de organelos, la producción de metabolitos secundarios y el sellado de la membrana plasmática en caso de rupturas (Steinberg, 2016). Uno de los metabolitos secundarios de gran interés para la industria farmacéutica es la penicilina, la cual está estrechamente vinculada con la presencia

de los peroxisomas. Por lo tanto, resulta de interés evaluar cepas de *Penicillium rubens* que pueden generar una mayor cantidad de peroxisomas (Opaliński et al., 2010). Estos organelos también están relacionados con la producción de conidiósporas y la germinación de esporas a hifas, desempeñando un papel crucial en el metabolismo del hongo y en la regulación de su ciclo reproductivo, por consiguiente, evaluarlos igualmente es importante en la viabilidad de la especie (Steinberg, 2016)

Se sabe que la penicilina que se encuentra dentro de los peroxisomas fúngicos se transporta del organelo al citoplasma y se dirige a la membrana celular para ser liberado al ambiente externo (Guzmán-Chávez et al., 2018). Algunas proteínas de membrana del peroxisoma (peroxinas) como PEX 5 o PEX 13 actúan como canales de difusión de proteínas en la membrana celular, y también pueden usarse para conectarse con otros orgánulos como el retículo endoplásmico (Bartoszevska et al., 2011; Brocard & Hartig, 2006; Gao et al., 2022; Meijer et al., 2010).

En 2010 se realizó una experimentación de las peroxinas PEX 14 y PEX 17 en *Penicillium rubens* para evaluar la función como componente peroxisomal (Opaliński et al., 2010). Al ser PEX 14 una peroxina con región homóloga conservada para todos los hongos, los autores infirieron un posible efecto directo en la estimulación enzimática para la esporulación en los hongos (Opaliński et al., 2010). En cuanto a la especie *Penicillium rubens*, al estudiarse la PEX 14 mediante bioinformática y técnicas de biología molecular, se evaluó el efecto de las deleciones de esta peroxina y la cuantificación de penicilina por técnicas de análisis químico. Se encontró que PEX 14, al estimular las señales de marcaje peroxisomal PST1 y PST2 en las cepas mutantes con sobreexpresión de peroxisomas, aumentó la producción de penicilina en un medio para estimular la producción del antibiótico (Opaliński et al., 2010).

H. Método de inmunohistoquímica directa

Este método se basa en la interacción antígeno-anticuerpo para etiquetar organelos o células de interés. Después de la permeabilización de la membrana celular y el bloqueo de proteínas inespecíficas, se procede a la localización de proteínas en la superficie de las estructuras celulares deseadas. Posteriormente, se marcan los organelos de interés y se observan utilizando microscopía. La luz emitida por el marcaje antígeno-anticuerpo proporciona una señal detectable mediante un microscopio de fluorescencia. Este enfoque permite la visualización y el análisis específico de células u organelos de interés.

Al evaluar la especificidad de la PEX-14 con los peroxisomas como un método para predecir la síntesis de metabolitos secundarios, se pensó en la inmunohistoquímica con algunas variaciones en la metodología de otros autores (Opaliński et al., 2010).

Para el marcaje de los peroxisomas, se utilizó anti-PEX 14, un anticuerpo que señala la peroxina PEX-14. Para revelar la interacción, se empleó el anticuerpo secundario, el cual es conjugado con el fluoróforo Coralite [®] 488. Después, se visualizó esta interacción con microscopía de fluorescencia (Magaki et al., 2019).

Se empleó el microscopio de fluorescencia, ya que las lámparas de arco de xenón o de gas de mercurio emiten una longitud de onda para la fluorescencia. La luz incidente pasa como luz emitida a través de la muestra con el fluoróforo. Luego, pasa por un espejo dicromático y la excitación de la luz resultante pasa por los objetivos del microscopio, con lo que se detectan los organelos o células marcados de la muestra (Majtner, 2015).

PEX14 es una proteína de membrana presente en todos los peroxisomas de las especies eucariotas, por lo que se ha utilizado como una buena proteína marcadora de peroxisomas para *Mus musculus*, *Felis catus*, *papio*, *Homo sapiens*, *Penicillium chrysogenum*, *Neurospora crassa* y *Magnaporthe oryzae* (Zea et al., 2020; Bartoszevska et al., 2011; Zhang et al., 2022; Grant et al., 2013; Rodrigues et al., 2022; Ruijten et al., 2020).

En informes anteriores, Opaliński mostró que los mutantes nulos de *Penicillium chrysogenum* de PEX 14 tenían problemas de esporulación y producción deficiente de penicilina. Al respecto, se puede inferir que la presencia de peroxisomas en *P. rubens* puede estar directamente relacionada con la producción de penicilina (Opaliński et al., 2010).

En este estudio, se usó el microscopio de fluorescencia para observar los peroxisomas marcados con los anticuerpos policlonales de conejo anti-PEX 14 (Proteintech) para evaluar si la exposición a la microgravedad influye en la morfología, en muestras de *P. rubens* cultivadas en microgravedad comparadas con los controles en Tierra.

I. Método de microscopía electrónica de barrido

El principio de la microscopía electrónica de barrido se basa en una pistola de electrones que emite un haz de electrones como fuente de luz incidente sobre la muestra a analizar. Esta muestra está colocada en un porta muestras de aluminio, fijada con cinta de carbón, tras ser bombardeada por los electrones, la muestra emite la luz resultante y los electrones secundarios que, al pasar por un detector, recreando la imagen basada en los electrones liberados de la muestra por el detector en conectado a un computador, el sistema puede amplificar la imagen hasta 500,000 veces el tamaño real de la muestra (Davies et al., 2022).

Se utilizó el método de microscopía electrónica de barrido para la comparación del grosor de las hifas en las muestras sometidas a diferentes regímenes gravitatorios de *P. rubens* sembradas en acero inoxidable SS316. El acero inoxidable es un material conductor, que facilita la visualización con esta técnica ya que aumenta la resolución de las muestras. Para asegurar la mejor resolución, se fija la muestra con cinta de carbón en el porta muestras y se baña la muestra con oro, para alcanzar una irradiación completa (Nastasi et al., 2020).

El principio por el cual se evalúa la muestra resulta en irradiar un haz de electrones por una pistola y después de que el detector analice el cambio de los electrones, el microscopio recrea la imagen por un detector de átomos, esta imagen es proyectada en el computador al recrear los electrones excitados presentes en la muestra, y mediante acercamientos del programa de computación Oxford Instruments se puede acercar la imagen y seleccionar los puntos de los que se quiere hacer el análisis químico de la muestra, esta metodología se emplea comúnmente para observar topografías de las experimentaciones (Nastasi et al., 2020).

El proyecto de Space biofilms tiene como objetivo evaluar los biofilms o biopelículas microbianas por grosor, espesor, morfología, así como la expresión genética en materiales de interés espacial. Han lanzado a órbita espacial dos modelos, uno bacteriano realizado en la misión espacial NG-12 y otro fúngico realizado en la misión espacial NG-17, del que es parte la investigación detallada en este documento Zea et al., 2018.

En la investigación del modelo fúngico, detallada por Hupka y sus compañeros del proyecto Space Biofilms, se utilizó *Penicillium rubens* como modelo para estudiar biofilm en microgravedad. Se sembró *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 en medio PDB sobre cupones de 1 x 1 cm de materiales de interés espacial y médico, los cuales incluyeron acero inoxidable SS316, aleación de aluminio, aleación de titanio, fibra de carbono, cuarzo, silicón nanograss y silicio. Los periodos de cultivo fueron de 10, 15 y 20 días, tanto en microgravedad como en gravedad terrestre.

Entre los hallazgos significativos de la investigación previa, se observó que el material nanograss fue el único en mostrar disminución de la biopelícula tanto en microgravedad como en gravedad terrestre. Todos los materiales presentaron una reducción en las biopelículas en el día 20 de crecimiento en los diversos sustratos en los que fueron incubados, lo cual se atribuyó a una disminución en el medio debido a un posible estado de depleción de nutrientes que experimentó el hongo Hupka et al., 2023.

Entre otros efectos que evaluaron los mismos autores fue la falta de cambios en los biofilms por medio de un mecanismo proteico que permite la sensibilidad de la microgravedad, por lo que observar mecanismos de evasión del estrés del hongo en microgravedad o su tolerancia son importantes para el comportamiento del organismo modelo en el espacio Hupka et al., 2023.

Estas investigaciones previas son consideradas bases para la investigación, ya que las muestras a evaluar son las mismas que se emplean en la misión espacial NG-17 con los ejemplares fúngicos de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 en 15 y 20 días de microgravedad y gravedad terrestre. El estudio que se detalla en este documento pretende ver la influencia de los regímenes gravitatorios sobre la producción de peroxisomas, como un posible mecanismo para adaptarse al ambiente del estrés en la microgravedad. De no observarse diferencia se puede suponer que los hongos tienen un mecanismo de sensibilización que evade la condición de microgravedad como un medio de estrés, que debe ser evaluado a profundidad para su acreditación.

A. Enfoque y diseño de la investigación

La investigación “*Penicillium rubens* como el primer hongo modelo para estudiar el efecto en la microgravedad para la producción de antibióticos” tiene un enfoque mixto ya que busca ver mediante la cantidad de los peroxisomas y cambios morfológicos, si se puede inferir una mayor producción de penicilina en 15 y 20 días de exposición a microgravedad.

Para el proyecto, se empleó muestras dirigidas no probabilísticas. Por lo que se realizaron las muestras en triplicado de 15 y 20 días en microgravedad y en gravedad terrestre. La variable independiente fue la condición gravitacional y la variable dependiente fue la cantidad de peroxisomas.

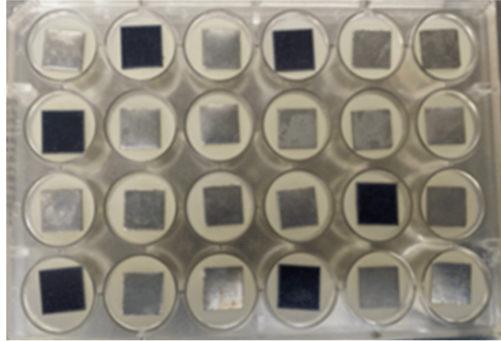
B. Sitio de estudio

El muestreo de las pruebas preliminares de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 crecidas en medio PDB en cupones de 1x1 cm de acero inoxidable SS316 se llevaron a cabo en la Universidad del Valle de Guatemala, mientras que las muestras del modelo fúngico expuestas a microgravedad y gravedad tierra fueron trabajadas por el equipo de Space Biofilms conformado por la Universidad Colorado Boulder, la Universidad del Valle de Guatemala y la Universidad Eastern Virginia Medical School (EVMS) durante el mes de Febrero del 2022, utilizando el protocolo que fue entregado por Space Biofilms de Bioserve . En la figura 6.1 se muestran los cupones de acero inoxidable empleados.

C. Tipo y tamaño de la muestra

Para el estudio exploratorio se usaron 12 muestras de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 crecidas en medio PDB en cupones de 1x1 cm de acero inoxidable SS316 de las cuales se clasifican en: 3 muestras con 15 días de exposición a microgravedad, 3 muestras con 15 días de exposición a gravedad Tierra, 3 muestras con 20 días de exposición a microgravedad y 3 muestras expuestas a gravedad Tierra.

Figura 4: Placas de 24 pocillos con cupones antes de la inoculación con *Penicillium rubens*



Las placas de 24 pocillos con cupones de silicón cilíndricos y cupones cuadrados de 1x1 de acero inoxidable SS316, presentados en la figura 6.1 se sellaron con membrane film. Nota. Tomado de (Hupka et al., 2023).

D. Criterios de inclusión y exclusión

No aplica.

E. Variables de la investigación

Cuadro 1: variables para evaluar los análisis de las mediciones del estudio.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional
La cantidad de peroxisomas por cantidad de hifas	La cantidad de los peroxisomas en la hifa está relacionada en mayor proporción con la punta de la hifa debido a su agrupación con los lípidos, así como una distribución homogénea por su transporte mediante las endosomas.	El grosor de la hifa, hifa en biopelícula o conidios.
El grosor se delimita en el caso de las hifas e hifas en biopelículas del extremo de la pared celular al otro extremo, tomando en cuenta la parte más angosta.	El grosor de los conidios se mide como el diametro de la circunferencia.	La escala de medición se mide con una regla de Canva que tiene un error de 0.05 um y la dimensión de la medición se basa en la longitud de la escala de referencias de las imagenes del microscopio electrónico de barrido.

Nota. Elaboración propia

F. Hipótesis

- Ho1:

la variación de microgravedad tendrá un efecto significativo en la variable de producción y morfología de peroxisomas contrastando con la gravedad terrestre, empleando la cepa *Penicillium rubens* ATCC ® 28089.

- Hi1:

la variación de microgravedad no tendrá un efecto en la variable de producción y morfología de peroxisomas empleando la cepa *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 contrastando con la gravedad terrestre.

- Ho2:

las inmunotinciones con el anticuerpo PEX-14 de Proteintech empleando muestras de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 crecidas en acero inoxidable SS316 nos permitirá ver peroxisomas con el microscopio de fluorescencia Leica DM500 LED.

- Hi2:

las inmunotinciones con el anticuerpo PEX-14 de Proteintech empleando muestras de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 crecidas en acero inoxidable SS316 no nos permitirá ver peroxisomas con el microscopio de fluorescencia Leica DM500 LED.

- Ho3:

la condición de microgravedad causará un aumento en la producción de peroxisomas comparando contra la gravedad tierra, en las muestras de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089.

- Hi3:

la condición de microgravedad no causará un aumento en la producción de peroxisomas comparando contra la gravedad tierra, en las muestras de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 .

G. Supuesto de investigación

La microgravedad influirá en la cantidad y morfología de los peroxisomas en las muestras de *Penicillium rubens* en 15 y 20 días de exposición a regímenes gravitatorios.

H. Instrumentos o técnicas

Las técnicas de evaluación serán mediante muestreo y observación de las muestras de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 brindadas por Bioserve Space Technologies. por medio de microscopía electrónica de barrido y a fluorescencia.

I. Estrategia

Se usará anti-PEX-14 marcado con Coralite ® 488 para observar las muestras de los peroxisomas de *Penicillium rubens* al microscopio de fluorescencia. Así mismo se utilizará la microscopía electrónica de barrido para evaluar diferencia en el grosor de las hifas y conidios.

J. Materiales y métodos

1. Obtención de muestras del modelo fúngico fijadas para pruebas de microgravedad y gravedad Tierra

Las cepas de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089TM y el anticuerpo anti-Pex14 conjugado con Coralite 488 fueron amablemente obtenidas por el Dr. Luis Zea, investigador principal de Space Biofilms apoyado en conjunto con la NASA (80NSSC17K0036, 80NSSC21K1950). La Universidad del Valle de Guatemala también financió reactivos complementarios para el crecimiento de los hongos y experimentos preliminares de tinción para su uso en la microscopía de fluorescencia. Así mismo, la empresa Cementos Progreso apoyo en el uso del microscopio electrónico de barrido JSM-IT500 y el procesamiento de las imágenes de las topografías de las muestras.

2. Preparación de muestras y activación de experimentos para el modelo fúngico en los regímenes gravitatorios

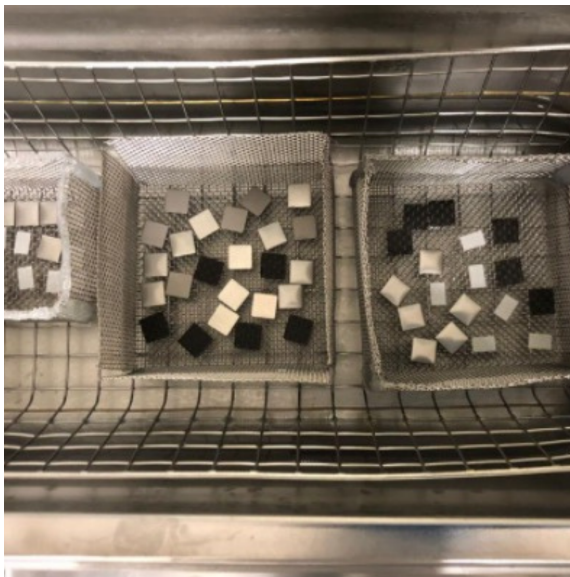
Se siguió la preparación de las muestras según la investigación detallada por Morphology of *Penicillium rubens*, Biofilms Formed in Space, empleando como material de importancia acero inoxidable SS316 (Hupka et al., 2023).

Limpieza de los instrumentos a utilizar

En ese paso, realizado por BioServe Space Technologies se imprimieron segmentos de menos de 1x1 cm de tape 3M (No.9731) para la rotulación de los cupones y jeringas que se utilizarón en las pruebas gravitatorias, después de rotularlos se limpiaron los cupones de acero inoxidable SS316. Se rotularon los cupones previos a la limpieza excluyendo a los de silicón. Después se contabilizaron los cupones con 120 cupones de 1x1cm de acero inoxidable (LOT 5183), 84 de fibra de carbono (LOT 5012), 84 de silicón (LOT 6092), 78 de MIT Nanograss (LOT 2022), 84 de cuarzo (LOT 6090), 84 de aluminio 6061 (LOT 4999) y 84 de titanio (LOT 4999). Se rotuló los cupones en la parte plana para evitar variaciones en el crecimiento del hongo y se colocaron en platos de pesaje para la inoculación. Previamente, los cupones de silicón con forma cilíndrica (Saint Gobain cat. D1069809) habían sido cortados y lavados con liquinox a una altura de 13mm, posterior a lavarse con agua desionizada se almacenó en bolsas autoclaveables de 3.5"x9" en segmentos de 24 unidades por bolsa.

Los cupones de silicon se limpian con el método *bag wash* en el que se le coloca liquinox y luego de sacudirlo se enjuaga con agua desmineralizada hasta que ya no se observe jabón. Los cupones de metal exceptuando el MIT Nanograss se lavaron con liquinox por 15 min a 30 °C en una canasta metálica, la cual es observada en la figura 6.2. Posteriormente se hicieron 3 lavados por 30 s quitando el liquinox sobrante y se secó 30 min en un horno a 100°C. En seguida se sumergieron en etanol al 70% por 15 min y luego se secaron por 15 min en la orilla de una caja Petri, figura 6.3. Se observa la canasta en la que se colocan los cupones de metal para lavarlos por sonicación con una solución de liquinox en la siguiente figura.

Figura 5: Canasta de baño ultrasónico para la limpieza de los cupones de metal



Se observa del lado izquierdo los cupones de metal etiquetados y sumergidos en 70% de etanol, mientras del lado derecho se observan colocados en la orilla de las cajas Petri mientras se secan por 15 minutos del etanol. Nota. Adaptado (Hupka et al., 2023)

Figura 6: Limpieza de los cupones de silicona (blancos) y de metal (plateados) con 70 % de etanol.



Nota. Adaptado (Hupka et al., 2023)

Preparación de PBS

Esta solución fue utilizada para la preparación de la cepa madre de *p.rubens* a partir de la cepa de *Penicillium rubens* ATCC [®] 28089 [™] liofilizada. También se usó para la recuperación de las esporas del hongo de primera generación de la liofilización y pasarlo a una siembra hija, este proceso se repite con la siguiente siembra hasta llegar a 5 generaciones. Después de lavar un bote de vidrio de 1000 mL 5 veces con 400mL de agua desionizada, se prepararon dos tabletas de PBS con cloruro de sodio (Sigma P4417), este se disolvió con una plancha caliente. Luego se tapó con aluminio y se autoclaveó durante 30min a 121°C, para almacenarse a 4°C previo a la implementación.

Agar de papa glucosa (PGA)

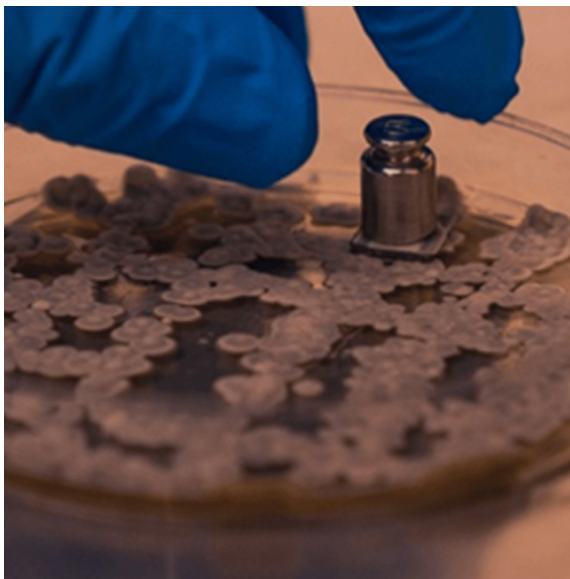
Se lavó un Erlenmeyer de 1000mL con más de 5 lavados de líquinox utilizando un agitador magnético, luego se quitó el líquinox con agua destilada. Por aparte empleando la recomendación de la cepa ATCC, se pesó 23.40g de agar de glucosa de papa (PGA) (LOT BCBS6247V). Luego se midió 600mL de agua ultrapura y se mezclaron y calentaron en el erlenmeyer de 1000 mL hasta ver la homogeneidad de la solución. Posterior se tapó el contenedor que contenía el medio de cultivo homogéneo con aluminio y se autoclaveó por 30 min a 121°C, en el ciclo de líquidos de la autoclave Northrop Grumman. Se distribuyó el agar en placas Petri en una campana de flujo laminar distribuidas en: el estriado de 2 placas petri para cultivos madre, 2 placas petri para la siembra del vial de cryostock y 2 placas que tenían para dejar el hongo por 10 días de crecimiento. Este procedimiento para elaborar el agar se repitió cada vez que fueron necesarias placas de PGA, las cuales, fueron almacenadas 4°C previo a la utilización.

Inoculo madre de *Penicillium rubens* ATCC [®] 28089 [™]

Para la segunda generación de la cepa liofilizada de *P.rubens*, se inició a partir de viales cryostock con *Penicillium rubens* ATCC [®] 28089 [™] congeladas, estas con agua tibia o a temperatura ambiente fueron atemperadas y se centrifugaron a 4000 rpm durante 3min para condensar los mi-

croorganismos en el fondo del tubo. Otra razón por las que se centrifugo fue quitar el glicerol al 10% con el que se preservaba la cepa. A continuación, se re suspendió con 1mL de PBS y se volvió a centrifugar como previamente fue descrito. Se removió el sobrenadante y repitió el proceso otras tres veces para eliminar por completo el glicerol. En el lavado y resuspensión final se removió el sobrenadante dejando alrededor de 200uL del hongo y sembrandolo en las placas de PDA como se observa en la figura . Se inocularon 100uL de la resuspensión de *Penicillium rubens* en PBS en placas de PGA dentro de una campana de flujo laminar. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (alrededor de 24°C) durante 5 días, transcurrido ese tiempo se almacenaron a 4° C como recurso en caso de necesidad de repetición por errores.

Figura 7: Siembra del inóculo inicial de *Penicillium rubens*.



El inóculo se sembró en un medio de cultivo de agar PDA y se cultivó durante 8 días. Se muestra el intercepto de las líneas de 6x6, indicativo de la distribución del hongo antes de su exposición a condiciones de microgravedad y gravedad terrestre. Nota. Elaboración propia

Al mismo tiempo se preparó un cultivo madre a partir de la cepa liofilizada, en caso de que las células del cryostock no fueran viables. En una campana de flujo laminar, se rehidrató con agua destilada una ampolla de cepa ATCC de *Penicillium rubens*® 28089™ liofilizada, según instrucciones de la hoja de ATCC se prepararon en placas Petri con PDA a 25 °C por 8 días. Luego se reinoculó en platos Petri con PGA e incubó por 8 días a 25°C en un contenedor de poliestireno, el estriado fue en líneas de 6X6 como se observa en la figura anterior 6.4, se tomaba el inóculo de la intercepción ya que los conidióforos producen más esporas en este segmento.

Las esporas sobrantes de la recolección previa se colocaron en tubos eppendorf de 15mL, se agitó por 30 segundos en vortex y se sembraron más placas de PGA, de nuevo se estrearon con una distribución de 6x6 líneas.

Se realizaron los siguientes pasos en la Universidad de Colorado Boulder.

Preparación de medio líquido para crecimiento de *Penicillium rubens* ATTC ® 28089™

Se lavó con líquinox 5 veces un contenedor de vidrio de 1000 mL con un agitador magnético usando agua desmineralizada. Luego se preparó el medio en el contenedor de 1000mL con 12g de medio líquido de dextrosa y extracto de papa (lote SLBR0579V) se mezcló con 1000mL de

agua desionizada. Al obtener una mezcla homogénea en un beaker calentado con una plancha calentadora fue filtrado usando un papel filtro de 0.2µm (Thermo Scientific, Nalgene Cat, 566-0020, LOT 1337579) y una jeringa adaptable. Se transfirió el medio filtrado en el recipiente estéril y se guardó a 4°C.

Preparación de paraformaldeído para preservar *Penicillium rubens* ATTC® 28089TM

Se empleo para preservar las células y ver su morfología, al crear enlaces covalentes evita que la célula tenga interacciones de superficie celular. Se utilizó una solución de paraformaldeído ya preparada al 16 % de Alfa Aesar (Cat No.43368) en 240mL de PBS 1X con pH 7.2. La solución final fue de 320mL de PFA al 4 %, este se almacenó a 4°C hasta su uso.

Llenado y Preparación de Jeringas para gravedad Tierra El tipo de jeringas con PFA(paraformaldeído) y RNAlater fue distinta para las muestras de Tierra vs. las de vuelo(microgravedad), se tomó en cuenta que para esta metodología solo se emplearon las que contenían PFA. Se lavaron 156 jeringas con émbolos Luer en Liquinox al 10 % luego se enjuagaron con agua destilada, se observan en la figura 6.5 . Posteriormente se autovlavearon a 121°C durante 30min en bolsas de autoclave y luego se secaron por 30 minutos. Cada pocillo de la placa de 24 , figura 6.1, se llenó con 5 mL de preservante o fijador en este caso paraformaldeído, se tenían 47 jeringas con PFA al 4 % y 36 con RNA later. Se cargaron las agujas con 4.2 mL del fijador, luego se completó el volumen a 5 mL eliminando las burbujas de aire con golpes leves.

Figura 8: Jeringas con émbolos Luer empleadas para inyectar agua en las muestras de gravedad Tierra.



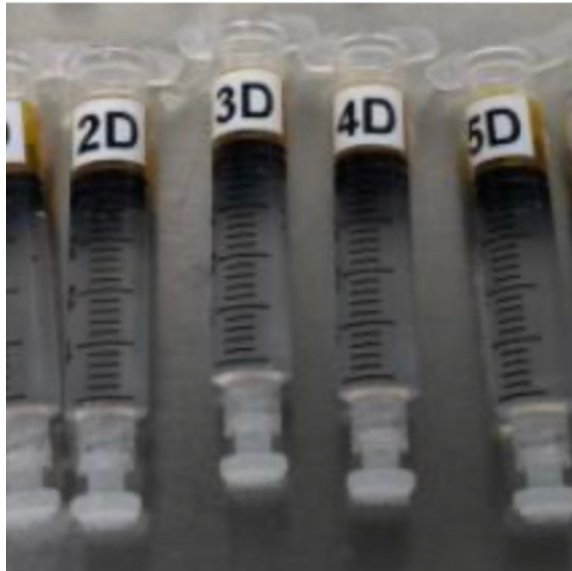
Sistema PHAB empleado para activar el crecimiento celular del hongo. Nota. Adaptado de (Hupka et al., 2023)

Llenado y Preparación de Jeringas para microgravedad

Por limitación de espacio en este régimen gravitatorio se emplearon émbolos especiales de BioServe que se acomodaron a las jeringas 18 G ½ (BD Precision Glide) de 5mL. Se inserto el

embolo en las jeringas y se esterilizaron en campana de flujo laminar , se llenó la jeringa a 4.2 mL y lentamente luego se completó a 5 mL dándole a la solución golpecitos en las jeringas para evitar burbujas y se guardaron hasta usarse.

Figura 9: *Jeringas 18 G $\frac{1}{2}$ empleadas en las muestras de vuelo en la Estación Espacial Internacional.*

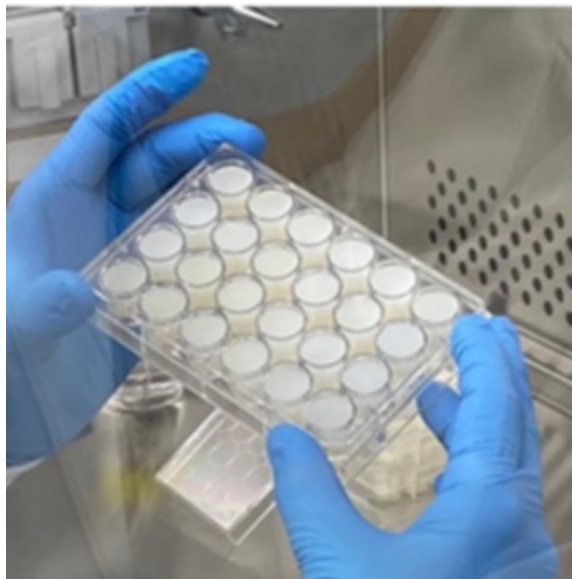


Adaptado de (Hupka et al., 2023).

Preparación de placas de 24 pocillos

Las placas de 24 pocillos se usaron como contenedores de los cupones de silicon, cupones de acero inoxidable y la solución de PFA. Su ensamblaje empezó al ser llenadas con cupones cilíndricos de silicon, estos fueron previamente autoclaveados a 121°C por 30 min, después se secaron por 5 minutos. Estos cilindros tuvieron la función de disminuir la solución de paraformaldeído en el caso de esta investigación o en RNA later en el caso de los otros experimentos evaluados por otros miembros del grupo de investigación. Se dejaron las placas listas para el siguiente paso en la Inoculación de *Penicillium rubens* ATTC® 28089™.

Figura 10: Cupones de silicón en placas de 24 pocillos



Nota. Adaptado de (Hupka et al., 2023).

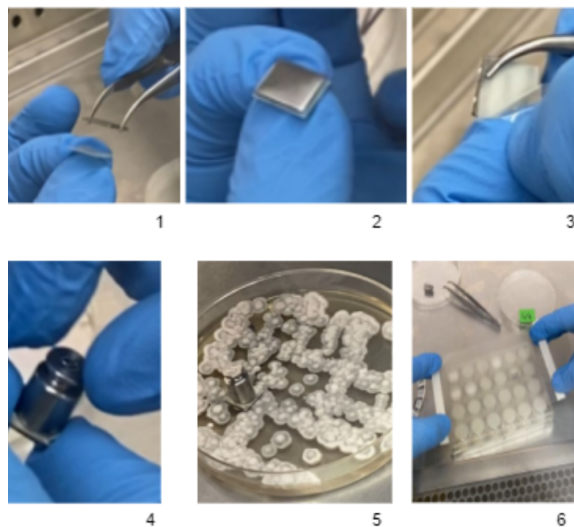
Nota. La imagen anterior muestra la adaptación de los cupones cilíndricos de silicón en la placa de 24 pocillos en donde se colocaron las muestras, evitando colocar una cantidad excesiva de PFA 4% en este caso y en otras muestras RNA later.

Inoculación de *Penicillium rubens* ATTC® 28089™

Este segmento describe el uso del sustrato de acero inoxidable con medio líquido de dextrosa y papa, acompañado del hongo modelo. Después de rotular la parte concava del cupón de acero inoxidable SS316, en la parte recta del cupón se colocó medio líquido seco de dextrosa y papa, luego se sembró el hongo a partir del intercepto del hongo madre mostrado en la Figura 6.8.5. La toma de las esporas del intercepto de las líneas de 6x6, se realizó con una pesa de 5 g y 0.07 psi adherida a un tape a el cupón de 1x1 cm de acero inoxidable con medio líquido seco, mostrado en la figura 6.8.4. La toma de las esporas fue hasta contar de 1 a 10 mississippi para estandarizarse la metodología. Luego se colocó en la placa de 24 pocillos encima del cupón de silicona cilíndrico y se selló con una membrana bitran para evitar contaminaciones y para inyectar el PFA.

En la figura

Figura 11: Proceso de inoculación de los cupones de acero inoxidable con *Penicillium rubens*.



Nota. Adaptado de (Hupka et al., 2023).

6.8.1 se muestra el cupón de acero inoxidable adherido al tape de doble cara 3M. En la figura 6.8.2, se observa que el tape 3M fue colocado en el lado cóncavo del cupón. Luego, en la figura 6.8.3, se retiró el otro lado del tape 3M, dejando el cupón preparado para el siguiente paso. A continuación, en la figura 6.8.4, el cupón de acero inoxidable se unió a una pesa de 5 g y 0.07 psi. En la figura 6.8.5, la pesa se coloca en los interceptos de las líneas 6x6. Finalmente, en la figura 6.8.6, se coloca la bolsa bitarán sobre el montaje.

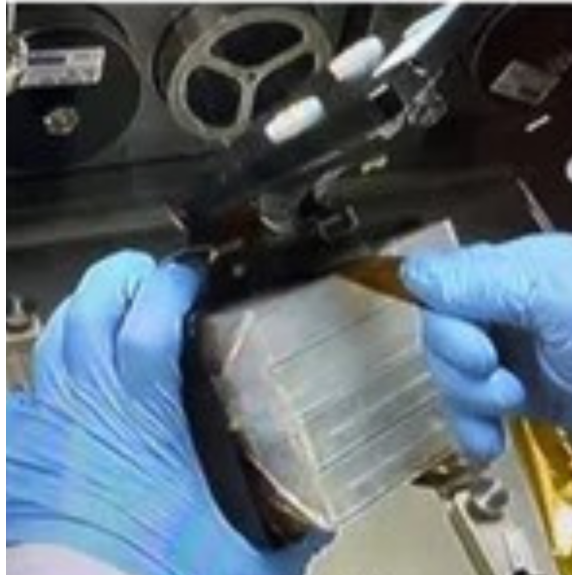
Activación de los regímenes gravitatorios *Penicillium rubens* ATTC ® 28089™

En la Universidad Eastern Virginia Medical School se realizaron las muestras del estudio para la comparación de los regímenes gravitatorios, las placas de 24 pocillos cubrieron con una bolsa de Bitarán y se colocaron en PHAB a 4°C antes del lanzamiento espacial o para las condiciones de la Tierra, tal como se mostró en la figura 6.1 (Hupka et al., 2023).

Se realizó la activación de las muestras en microgravedad y gravedad terrestre sobre las muestras del hongo modelo, se aumentó la temperatura a 25 °C y se incrementó la humedad relativa > 90 mediante la suplementación de las muestras con 1 mL de agua en la tapa del contenedor PHAB.

Posterior al crecimiento del hongo en los lapsos de 15 y 20 días de los regímenes gravitatorios, variando solamente las jeringas a utilizar. Las muestras se fijaron con 0.8 mL 4% de paraformaldehído, se realizó atravesando la bolsa bitran como se observa en la figura 6.9.C , consiguiente se colocó otra bolsa bitarán y fueron llevados a 4 °C. Esto permaneció así hasta su análisis de morfología en el microscopio electrónico de barrido y fluorescencia (Hupka et al., 2023).

Figura 12: Dispositivo PHAB empleado para llevarse a la Estación Espacial Internacional y probarse en gravedad terrestre.



Estó se emplea para facilitar el traslado de las muestras, suministrar la humedad relativa por jeringas de agua y distribuir el agua. En la figura 6.3.a observamos el contenedor PHAB de la parte externa, 6.3.b la caja con la bolsa bitarón que contiene la caja de 24 pozos y las muestras y por último 6.3.c muestra la parte interna del contenedor PHAB con esponjas y agujas para regular la humedad. Nota. Adaptado de (Hupka et al., 2023)

3. Preparación de *Penicillium rubens* para la tinción inmunofluorescente con anti-PEX14

Para optimizar la tinción anti-PEX-14, se cultivaron cepas de *P. rubens* como se describió el cultivo anterior durante 8 y 15 días en portaobjetos de vidrio cubiertos con PDA como sustrato, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en una incubadora (Opaliński et al., 2010).

4. Tinción inmunofluorescente de pruebas de *Penicillium rubens* en microgravedad y gravedad terrestre

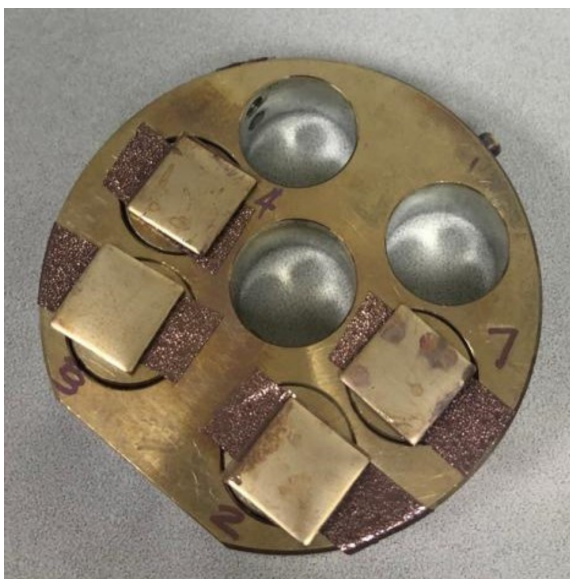
Este método se usó para observar y cuantificar los peroxisomas en las pruebas que se expusieron a microgravedad y su control terrestre, ya que al tener la muestra de acero inoxidable se dificulta la transferencia de luz clave para observar los ejemplares. Como alternativa se emplearon alícuotas de 10 uL de las soluciones de paraformaldeído al 4% ya que la membrana *Breathe Easy Membrane* estaba adherida a los cupones al tener un desprendimiento de ellos de los cupones de silicón, al evaluar las muestras como se observa en la figura 6.1. Después del tratamiento de la inmunotinción con las muestras enviadas de la Universidad de Colorado Boulder, se continúa como se describió en la sección Optimización de la tinción inmunofluorescente empleando las muestras de los cupones de acero inoxidable SS316.

5. Preparación de *Penicillium rubens* para el análisis de microscopía electrónica de barrido

Se emplearon las muestras del hongo en 15 y 20 días tanto de microgravedad como en gravedad terrestre, esto fue para observar las variaciones de las hifas en su composición y grosor.

Se emplearon las muestras de *P. rubens* ATTC ® 28089™ ya tratadas en microgravedad y gravedad terrestre con paraformaldehído, se secaron en campana de extracción durante 24 horas previo a el tratamiento de la experimentación. En la adaptación de los cupones de acero en el microscopio se colocaron en el porta muestras con tape de carbón, seguido de un baño en oro con el equipo Denton Vacuum, se detalla en la figura 6.10 como estaban las muestras en este tratamiento. Después se colocaron las muestras con el microscopio electrónico de barrido JSM-IT500, con esto se asegura una completa detección de los electrones presentes en la muestra.

Figura 13: Preparación de las muestras de *Penicillium rubens* ATTC ® 28089™ en cupones de acero inoxidable en baño de oro bajo los regímenes gravitatorios a comparar.



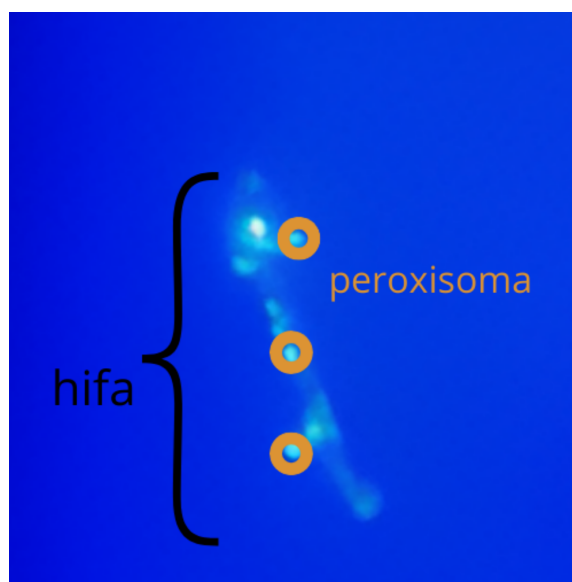
El cupón 1 es F-124 con 15 días en microgravedad, el cupón 2 es F-E9 con 20 días en microgravedad, el cupón 3 G-E9 con 15 días en gravedad terrestre y el cupo 4 es G-IG24 con 20 días en gravedad terrestre. Nota. Elaboración propia.

A. Resultados del microscopio de fluorescencia

Este apartado muestra los hallazgos de la microscopía electrónica de fluorescencia, esta se empleó para visualizar el marcaje de los peroxisomas en las muestras de *Penicillium rubens* ATCC® 28089 con el sustrato de acero inoxidable SS316 con medio PDB. Se emplearán alícuotas de 10 uL de la muestra total de 0.8 mL de 4% PFA.

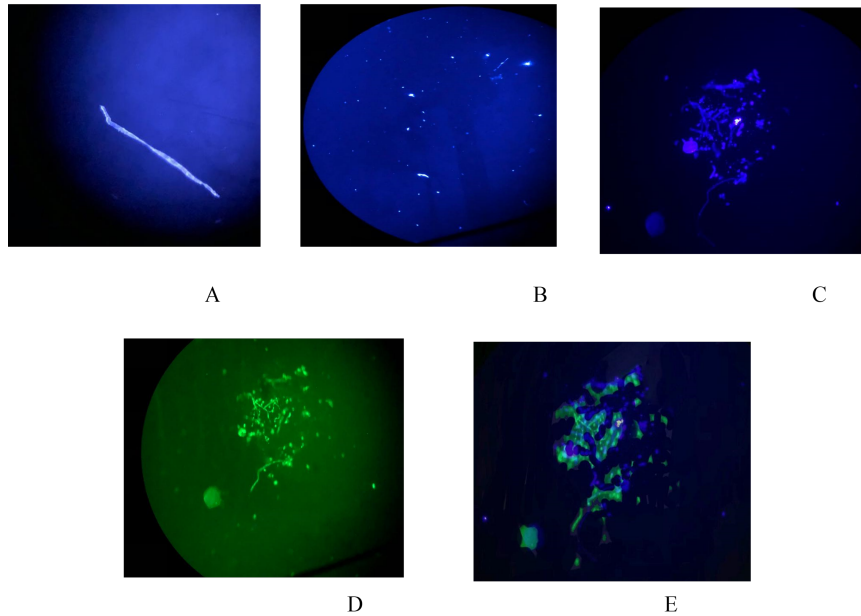
La siguiente figura muestra la estandarización de anti- PEX-14 conjugado con Coralite® 488 de 1:200, acompañado con un protocolo de permeabilización de la membrana plasmática con Triton X-100 al 0.4% y PBS al 1X.

Figura 14: Hifa del hongo que marca los peroxisomas con anti- PEX-14, conjugado con Coralite® 488 para muestras de *Penicillium rubens* en SS316 con sustrato PDB.



Se empleó para marcar los peroxisomas, en las siguientes 4 figuras que emplean el mismo método de inmunotinción empleando el anti- PEX-14 conjugado con Coralite® 488 para señalar los peroxisomas en los diferentes regímenes gravitatorios *Penicillium rubens* en SS316. Nota. Elaboración propia.

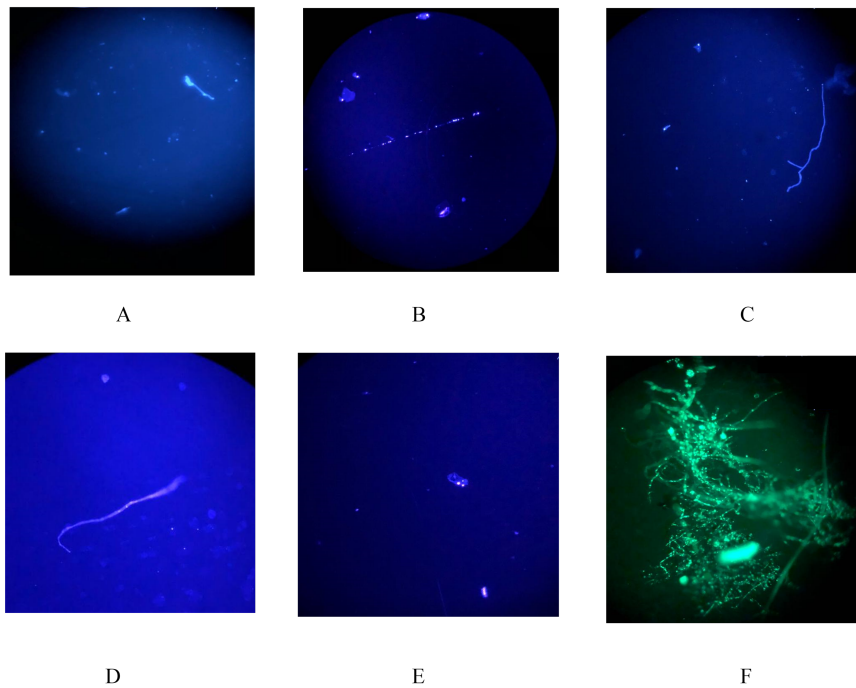
Figura 15: Moho *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 en cupón acero inoxidable SS316 por 15 días en exposición a microgravedad



Las muestras se prepararon a partir de alícuotas de 10 μ L tomadas de soluciones que contenían 800 μ L del hongo en PFA, utilizado para su fijación y preservación. Las imágenes fueron capturadas a una magnificación de 40x utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM 2500 LED. Cada imagen corresponde a una alícuota diferente colocada en un portaobjetos. Nota. Elaboración propia.

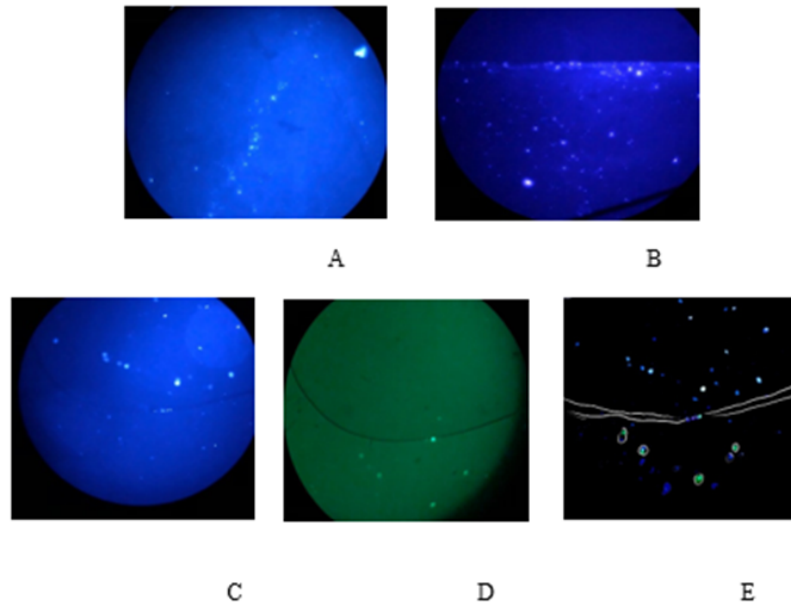
En la figura 15 en el **imagen A** se muestra una tinción con el anti-PEX14 y se observan 21 peroxisomas en la hifa de la parte inferior. Así mismo, la **imagen B** tuvo un total de 84 peroxisomas, situadas en hifas con formas de líneas alargadas y esporas con contorno circular. También en la **imagen C** se contabilizaron 3 peroxisomas, esta muestra se usó también para la **imagen D** como control positivo interno, señalizando 64 núcleos con colorante verde fluorescente. En la **imagen E** se observa el sobreposición entre la imagen C y D al emplear Infinite Painter de App store como herramienta para sobreponer las imágenes observando tanto peroxisomas como núcleos.

Figura 16: *Moho Penicillium rubens* ATCC ® 28089 en cupón de acero inoxidable SS316 por 15 días en gravedad terrestre.



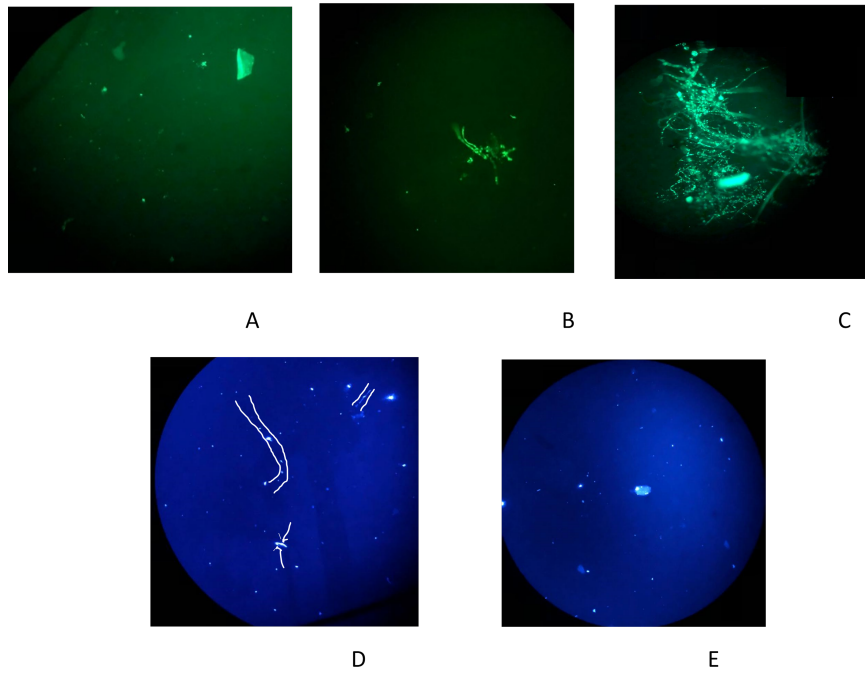
En la figura 16 en la **imagen A** muestra una tinción con el anti-PEX14 **un** anticuerpo que marca específicamente peroxisomas, se observan 32 peroxisomas sin embargo se enfatizan en la hifa de la esquina superior derecha con 4 peroxisomas. En la **imagen B** al igual que imagen A muestra la misma tinción y se tiene un total de 39 peroxisomas, estas se concentran en la hifa central. Así mismo, la **imagen C** fue tratado con el anticuerpo de los peroxisomas en esta se observan 23 peroxisomas. También la **imagen D** fue tratada con el anticuerpo marcador de peroxisomas y se visualizaron 8 peroxisomas. Con el filtro azul en la **imagen E** se observan 14 peroxisomas, los más brillantes están en las esporas. Por último, la **imagen F** con una tinción de QuantiFluo® r one dsDNA como control interno positivo se observan núcleos e hifas sobrepuestas. Nota. Elaboración propia.

Figura 17: Moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316 por 20 días en microgravedad



En la figura 17 en la **imagen A** se muestra una tinción con el anti-PEX14 observándose 86 peroxisomas, enfatizándose en la hifa central, la hifa más larga. En la **imagen B** al igual que la imagen A se observó la misma técnica de tinción y se tiene un total de 124 peroxisomas, estas se concentran en hifas situadas en la orilla del portaobjetos. Por otro lado la **imagen C** fue tratada con el anticuerpo de los peroxisomas y se observaron 26 peroxisomas, con 4 en la hifa central. La **imagen D** con la misma muestra de la imagen C se observó empleando el filtro verde y se observan 7 núcleos, enfatizando 1 núcleo en la hifa remarcada. Además, la **imagen E** se colocó para generar la superposición de las **imagenes C y D**, se observan peroxisomas y núcleos al mismo tiempo al emplear Infinite Painter de App store se superpusieron ambas imágenes, resaltando en medio una hifa representativa en la que los círculos azules son los peroxisomas y los verdes son núcleos. Nota. Elaboración propia.

Figura 18: *Moho Penicillium rubens* ATCC ® 28089 en cupón de acero inoxidable SS316 por 20 días en gravedad terrestre.



En la figura 18 en la **imagen A** se obtuvo un tratamiento con QuantiFluo® r one dsDNA y se observan 37 núcleos. En la **imagen B** al igual que imagen A muestra la misma tinción y se observan 46 núcleos. En la **imagen C** se observan hifas sobrepuestas con núcleos. Por otro lado la **imagen D** se preparó con anti-PEX14 y se observaron 35 peroxisomas, las líneas blancas que se remarcaron muestran donde se supuso que está la pared de la hifa, mientras que las líneas señalizan los peroxisomas de la hifa pequeña. De igual forma en la **imagen E** es una prueba de núcleos, el círculo más brillante es una espora con peroxisomas, en total se contabilizaron 35 peroxisomas en este imagen. Nota. Elaboración propia.

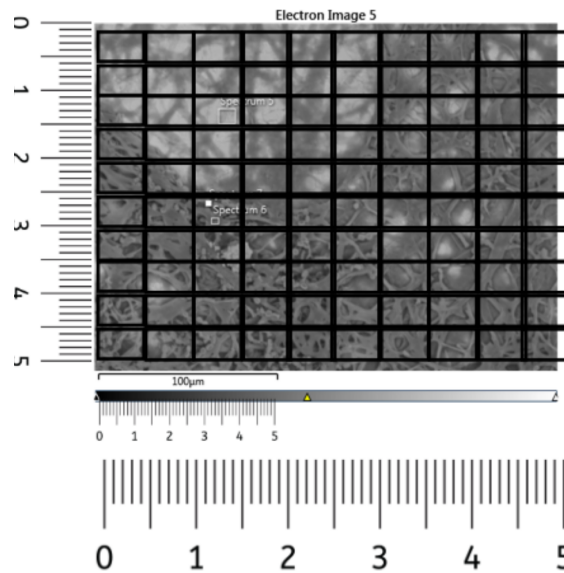
B. Resultados del microscopio electrónico de barrido

La metodología del microscopio electrónico de barrido se utilizó para evaluar la topografía de las muestra y su composición química, teniendo un acercamiento a su comportamiento en microgravedad y gravedad terrestre.

1. Análisis de las estructuras del hongo en el sustrato

En esta sección, se realiza una evaluación cuantitativa del diámetro del hongo separándolos hifa, hifa en biopelícula o conidios. A continuación se puede observar un ejemplo de la metodología empleada:

Figura 19: Imagen usada para la evaluación cuantitativa del diámetro de las hifas del moho *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 expuesto por 15 días a microgravedad



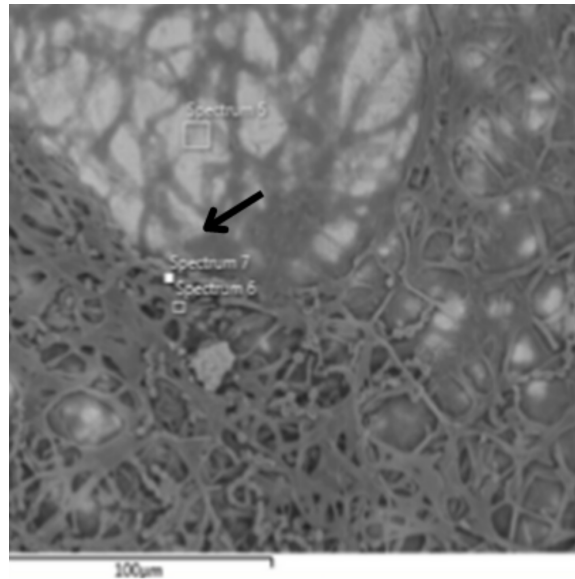
Nota. Elaboración propia.

Se utilizó la escala de medición μm del microscopio electrónico de barrido y se dividió en 25 partes iguales, con base en está, se hicieron divisiones en 10×10 partes iguales con la aplicación de diseño gráfico Canva. La misma metodología se empleó para las 5 tablas de la sección. Se midió el diámetro de las hifas. Este procedimiento se repite con los estadios de hifa encapsulada en biopelícula y conidios.

A continuación, se proporcionan los datos con el paquete de estadística descriptiva empleando el Excel, donde se muestra un promedio de los rectángulos totales como una metodología de comparación, se tomó en cuenta la incertidumbre de $0.1 \mu\text{m}$, debido al uso del programa Canva.

Las muestras se prepararon a partir de alícuotas de $10 \mu\text{L}$ tomadas de soluciones que contenían $800 \mu\text{L}$ del hongo en PFA, utilizado para su fijación y preservación. Las imágenes fueron capturadas con una magnificación de $40\times$, utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM 2500 LED. Cada imagen corresponde a una alícuota diferente colocada en un portaobjetos.

Figura 20: Imagen usada para la evaluación cuantitativa del diámetro del hongo de las hifas del moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 expuesto por 15 días a microgravedad.



Nota.Elaboración propia.

Cuadro 2: Análisis del grosor de las hifas encapsuladas en biopelículas de *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 expuestas a 15 días en microgravedad sobre SS316 con PDA.

Mx	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
\bar{X}	0.16	0.18	0.20	0.10	0.11	0.15	0.03	0.11	0.02	0.00
S	0.07	0.08	0.10	0.00	0.15	0.13	0.08	0.10	0.04	0.00
S^2	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
IC	[0.11, 0.21]	[0.13, 0.23]	[0.02, 0.17]	0	[0, 0.21]	[0.06, 0.24]	[-0.03, 0.08]	[0.04, 0.19]	[-0.01, 0.05]	0
\bar{x}	0.10									

Nota: Elaboración propia.

Nota. Se evaluó el grosor de hifas en biopelículas sometidas a 15 días de microgravedad del moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089. Se empleó la escala de medición de 50 μm a 650 x en micrómetros, tal como se muestra en la metodología de la figura 19. El análisis se basa en la división de la figura 20 en segmentos de 10 x 10 usando μm como unidad de longitud de las hifas. los parámetros usados son \bar{X} para la media del grosor de la hifa por fila, siendo en total 10 filas; S para la desviación estándar del promedio; S^2 para la varianza del promedio; IC para el intervalo de confianza del 95%; y \bar{x} para la media muestral de todas las filas.

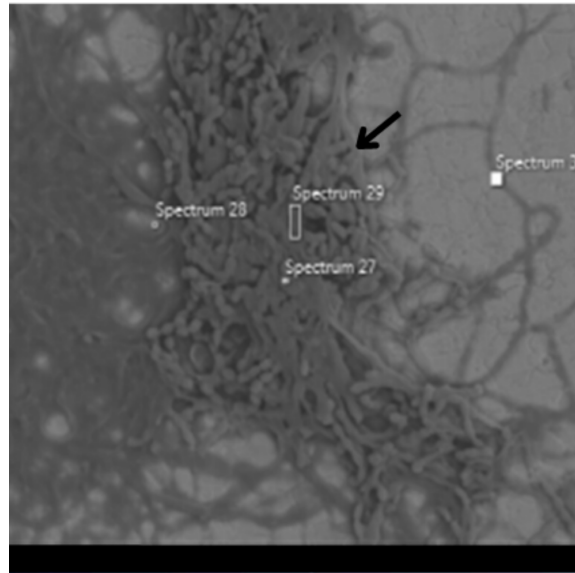
Cuadro 3: Análisis del grosor de las hifas de *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 expuestas a gravedad terrestre durante 15 días sobre SS316 con PDA.

Mx	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
\bar{X}	0.20	0.45	0.20	0.23	0.32	0.32	0.14	0.32	0.21	0.19
S	0.34	0.40	0.37	0.00	0.36	0.36	0.22	0.61	0.34	0.31
S^2	0.12	0.16	0.14	0.00	0.13	0.13	0.05	0.37	0.12	0.10
IC	[-0.043,0.44]	[0.17,0.73]	[-0.04,0.49]	[0]	[0.06, 0.58]	[-0.02,0.30]	[-0.02,0.30]	[-0.02,0.85]	[-0.04, 0.45]	[-0.04,0.41]
\bar{x}	0.3									

Nota: Elaboración propia.

Nota. Se evaluó el grosor de hifas sometidas a 15 días a gravedad terrestre del moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089. Se empleó la escala de medición de 25 μm a 450 x en micrómetros, tal como

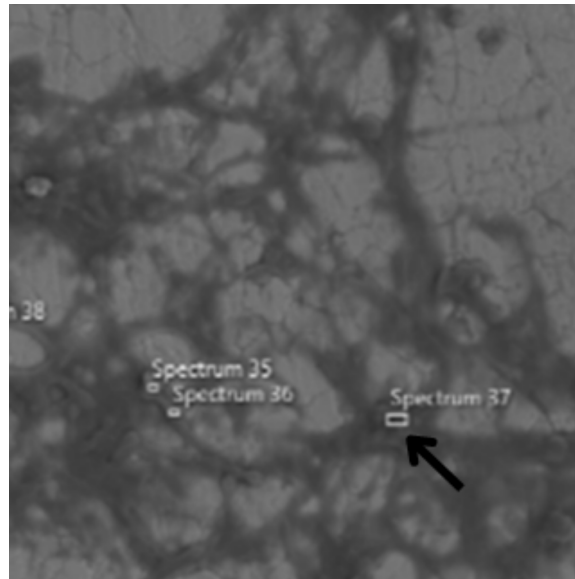
Figura 21: Imagen usada para la evaluación cuantitativa del diámetro del hongo de las hifas del moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 expuestas por 15 días a gravedad terrestre.



Nota.Elaboración propia.

se muestra en la metodología de la figura 20. El análisis se basa en la división de la figura 21 en segmentos de 10 x 10 usando μm como unidad de longitud de las hifas. los parámetros usados son \bar{X} para la media del grosor de la hifa por fila, siendo en total 10 filas; S para la desviación estándar del promedio; S^2 para la varianza del promedio; IC para el intervalo de confianza del 95%; y \bar{x} para la media muestral de todas las filas.

Figura 22: Imagen usada para el análisis del grosor de hifas encapsuladas en biopelículas *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 expuestas a 20 días a gravedad terrestre.



Nota. Elaboración propia

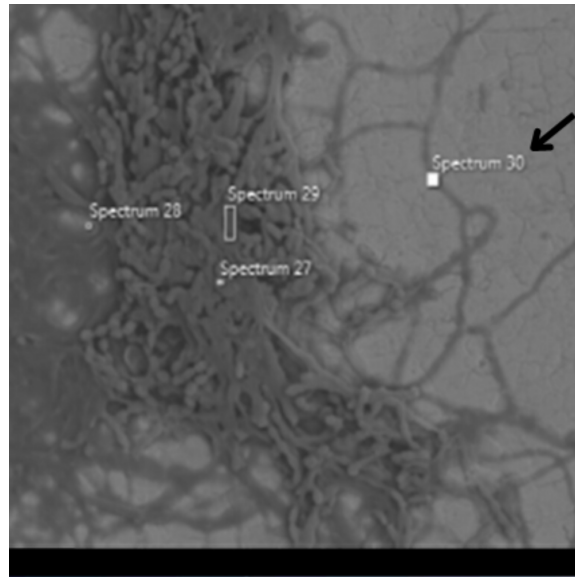
Cuadro 4: Análisis del grosor de las hifas encapsuladas en biopelículas de *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 expuestas a 20 días en gravedad terrestre sobre SS316 con PDA.

Mx	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
\bar{X}	0.16	0.18	0.20	0.10	0.11	0.15	0.03	0.11	0.02	0
S	0.07	0.08	0.10	0.00	0.15	0.13	0.08	0.10	0.04	0
S^2	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0
IC	[0.11,0.21]	[0.13,0.23]	[0.02, 0.17]	0	[0, 0.21]	[0.06,0.24]	[-0.03,0.08]	[0.04,0.19]	[-0.01,0.05]	0
\bar{x}	0.104									

Nota: Elaboración propia.

Nota. Se evaluó el grosor de hifas en biopelículas sometidas a 20 días de microgravedad del moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089. Se empleó la escala de medición de 25 μm a 450 x en micrómetros, tal como se muestra en la metodología de la figura 19. El análisis se basa en la división de la figura 22 en segmentos de 10 x 10 usando μm como unidad de longitud de las hifas. los parámetros usados son \bar{X} para la media del grosor de la hifa por fila, siendo en total 10 filas; S para la desviación estándar del promedio; S^2 para la varianza del promedio; IC para el intervalo de confianza del 95 %; y \bar{x} para la media muestral de todas las filas.

Figura 23: Imagen usada para el análisis del grosor de hifas en biopelículas de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 expuestas por 15 días a gravedad terrestre



Nota. Elaboración propia

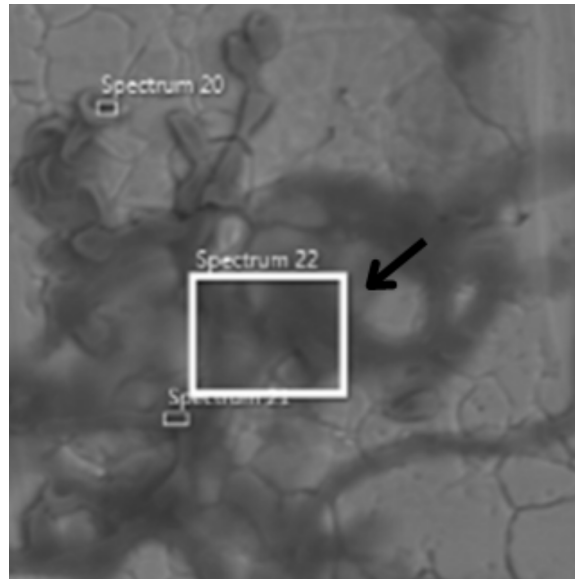
Cuadro 5: Análisis del grosor de las hifas encapsuladas en biopelículas de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 expuestas por 15 días a gravedad terrestre sobre SS316 con PDA.

Mx	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
\bar{X}	0.16	0.18	0.20	0.10	0.11	0.15	0.03	0.11	0.02	0.00
S	0.07	0.08	0.10	0.00	0.15	0.13	0.08	0.10	0.04	0.00
S^2	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
IC	[0.11,0.21]	[0.13,0.23]	[0]	[0,0.21]	[0.06,0.24]	[-0.03, 0.08]	0	[0.04,0.19]	[-0.01,0.05]	0
\bar{x}	0.10									

Nota: Elaboración propia.

Nota. Se evaluó el grosor de hifas en biopelículas sometidas a 15 días de gravedad terrestre del moho *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 . Se empleó la escala de medición de 50 μm a 650 X en micrómetros, tal como se muestra en la metodología de la figura 19. El análisis se basa en la división de la figura 23 en segmentos de 10 x 10 usando μm como unidad de longitud de las hifas. los parámetros usados son \bar{X} para la media del grosor de la hifa por fila, siendo en total 10 filas; S para la desviación estándar del promedio; S^2 para la varianza del promedio; IC para el intervalo de confianza del 95%; y \bar{x} para la media muestral de todas las filas.

Figura 24: Imagen usada para el análisis del grosor de hifas encapsuladas en biopelículas de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 expuestas por 20 días a microgravedad.



Nota. Elaboración propia.

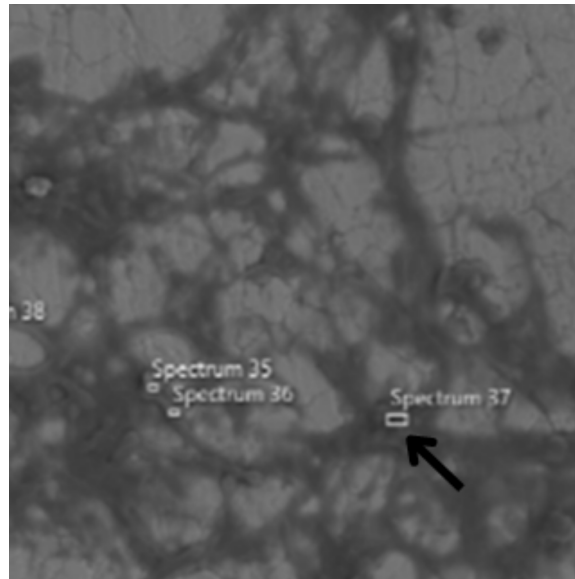
Cuadro 6: Análisis del grosor de las hifas encapsuladas en biopelículas de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 expuestas por 20 días a microgravedad sobre SS316 con PDA.

Mx	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
\bar{X}	0.29	0.44	0.20	0.36	0.38	0.22	0.18	0.38	0.15	0.07
S	0.29	0.59	0.19	0.00	0.25	0.23	0.24	0.12	0.09	0.12
S^2	0.08	0.35	0.04	0.00	0.06	0.05	0.06	0.01	0.01	0.01
IC	[0.08,0.5]	[0.02,0.86]	[0.22,0.49]	0	[0.20,0.56]	[0.06,0.38]	[0,0.35]	[0.15,0.31]	[0.08,0.21]	[-0.02,0.15]
$\bar{\bar{x}}$	0.26									

Nota. Elaboración propia.

Nota. Se evaluó el grosor de hifas en biopelículas sometidas a 20 días de microgravedad del moho *Penicillium rubens* ATCC ® 28089. Se empleó la escala de medición de de 25 μm a 1000 x en micrómetros, tal como se muestra en la metodología de la figura 19. El análisis se basa en la división de la figura 24 en segmentos de 10 x 10 usando μm como unidad de longitud de las hifas. los parámetros usados son \bar{X} para la media del grosor de la hifa por fila, siendo en total 10 filas; S para la desviación estándar del promedio; S^2 para la varianza del promedio; IC para el intervalo de confianza del 95%; y $\bar{\bar{x}}$ para la media muestral de todas las filas.

Figura 25: Imagen usada para el análisis del grosor de hifas encapsuladas en biopelículas *Penicillium rubens* ATCC (R) 28089 expuestas por 20 días a gravedad terrestre.



Nota. Elaboración propia.

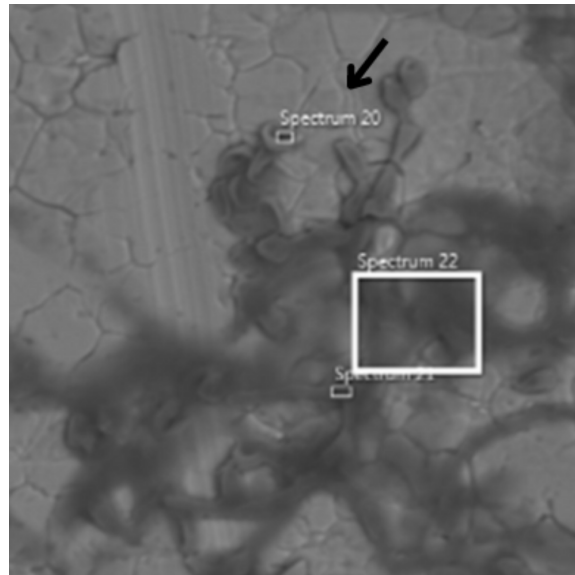
Cuadro 7: Análisis del grosor de las hifas encapsuladas en biopelículas de *Penicillium rubens* ATCC (R) 28089 expuesto por 20 días en gravedad terrestre sobre SS316 con PDA.

Mx	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
\bar{X}	0.38	0.17	0.20	0.26	0.26	0.00	0.00	0.26	0.03	0.04
S	0.20	0.12	0.16	0.34	0.34	0.00	0.00	0.00	0.08	0.07
S^2	0.04	0.01	0.03	0.11	0.11	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
IC	[0.23,0.52]	[0.08,0.25]	[0.14,0.38]	0	[0.02,0.50]	0	0	0	[-0.03,0.08]	[-0.01,0.09]
\bar{x}	0.16									

Nota. Elaboración propia.

Nota. Se evaluó el grosor de hifas en biopelículas sometidas a 20 días a gravedad terrestre del moho *Penicillium rubens* ATCC (R) 28089. Se empleó la escala de medición medición 50 μm en 700 x en micrómetros, tal como se muestra en la metodología de la figura 19. El análisis se basa en la división de la figura 25 en segmentos de 10 x 10 usando μm como unidad de longitud de las hifas. los parámetros usados son \bar{X} para la media del grosor de la hifa por fila, siendo en total 10 filas; S para la desviación estándar del promedio; S^2 para la varianza del promedio; IC para el intervalo de confianza del 95%; y \bar{x} para la media muestral de todas las filas.

Figura 26: Imagen usada para el análisis del grosor del diámetro de los conidios de *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 expuestas por 20 días a microgravedad.



Nota. Elaboración propia.

Mx	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
\bar{X}	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01
S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.08	0.02
S^2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00
IC	0	0	0	0	0	0	0	[-0.02,0.08]	[-0.03,0.08]	[-0.01,0.02]
\bar{x}	0.02									

Cuadro 8: Análisis del grosor de conidios de *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 expuesto por 20 días a microgravedad sobre SS316 con PDA.

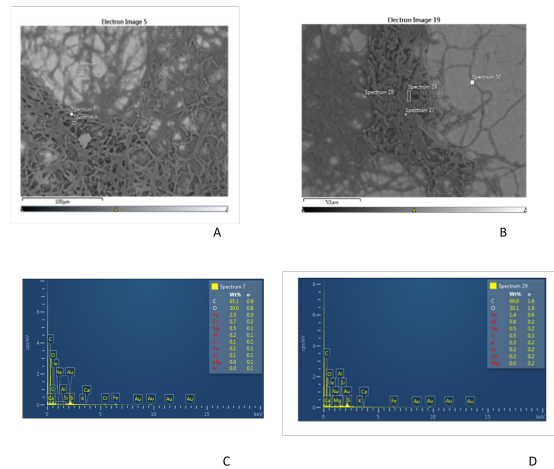
Nota. Elaboración propia.

Nota. Se evaluó el grosor de los conidios sometidas a 20 días de microgravedad del moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089. Se empleó la escala de medición de de 25 μm a 1000 x en micrómetros, tal como se muestra en la metodología de la figura 19. El análisis se basa en la división de la figura 26 en segmentos de 10 x 10 usando μm como unidad de longitud de las hifas. los parámetros usados son \bar{X} para la media del grosor de la hifa por fila, siendo en total 10 filas; S para la desviación estándar del promedio; S^2 para la varianza del promedio; IC para el intervalo de confianza del 95%; y \bar{x} para la media muestral de todas las filas.

2. Análisis químicos e imágenes del sustrato

Se empleó el análisis porcentual de elementos brindado con el programa Oxford tomando en cuenta la composición base del medio de cultivo PDB y el acero inoxidable. Este se utilizó para inferir acerca de la interacción con el material y estadio morfológico. Esta medición se describió como un aumento en la composición con la convención de un signo negativo previo a la presencia del elemento.

Figura 27: *Moho Penicillium rubens* ATCC ® 28089 en cupón de acero inoxidable SS316, en 15 días de regímenes gravitatorios para el análisis químico de hifas.



En la **imagen A** (F-124) se muestra la prueba de los 15 días microgravedad mientras en la **imagen B** (G E-9) se muestra la prueba de los 15 días gravedad tierra. En la imagen C y D se analiza la composición de segmento por spectrum, los signos negativos indican aumento del elemento. Nota. Elaboración propia.

En las **imagenes C y D** de la figura 27 se analiza la composición del segmento seleccionada como spectrum 5 con 15 días de microgravedad y el spectrum 30 con 15 días de gravedad terrestre.

Con base en las imagenes 5 y 19 el moho *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 constituye un conglomerado de hifas y esporas. En la **imagen A** (F E-9), las muestras fueron sometidas a 20 días de microgravedad. En el spectrum 7, se ve una biopelícula con una hifa de 4 μm y un halo oscuro sobre ella. En el **segmento B** (GI-G24), con 20 días de gravedad terrestre, se observa una biopelícula en el spectrum 29 con 5 μm de diámetro.

En la **imagen C** se muestra el análisis químico del spectrum 7 con 65.1% de C, 2.5% de Fe, 30.6% de O, 0.7% de Cr, 0.5% de Na, 0.2% de Al y 0.1% de Si. En la **imagen D** se muestra el análisis químico del spectrum 29, con 66.0% de C, 30.1% de O, 0.8% de Al, 1.4% de Fe y 0.5% de S.

Cuadro 9: Diferencias en la composición química porcentual de las hifas del moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 crecido en cupón acero inoxidable SS316 en los 15 días de regímenes gravitatorios.

elemento	Teórico SS316	cupón con PDB	S7	S29
Fe	69.39	35.9	35.2	34.5
C	0.018	30.8	-34.3	-35.2
O	-	18.1	-12.5	-
Cr	16.65	9.2	-	-
Ni	10.07	4.8	-	-
S	0.004	0.5	0.4	0
Si	0.35	0.4	0.3	0.1
Na	-	0.2	-0.3	-0.3
Mg	-	0.1	-	-
Al	-	0	-0.1	-0.8
Mo	2.08	0	0	-
K	-	0	0	-0.3
Ca	-	0	-0.1	-0.2

Nota. Elaboración propia.

Basado en los espectros químicos base del cupón con medio PDB y composición estándar del acero inoxidable SS316 tomado de Kumar y compañeros (Kumar et al., 2012). Los números con signo negativo en S7 y S29 indican aumento del elemento químico.

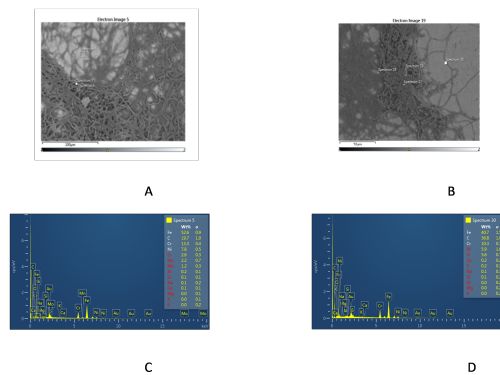


Figura 28: Moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316, en 15 días de regímenes gravitatorios para el análisis químico de las hifas

Nota. Elaboración propia.

La **imagen A** (F-124) muestra la prueba de los 15 días de microgravedad. la **imagen B** (G E-9) muestra la prueba de los 15 días de gravedad terrestre. En las **imágenes C y D** de la figura 28 se analiza la composición del segmento seleccionada como spectrum 5 con 15 días de microgravedad y el spectrum 30 con 15 días de gravedad terrestre.

Con base en las imagenes 5 y 19 el moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 constituye un conglomerado de hifas y esporas. En la **imagen A** (F E-9), las muestras fueron sometidas a 20 días de microgravedad. En el spectrum 22, se ve una biopelícula con una hifa de 4 μm y un halo oscuro sobre ella. En el **segmento B** (GI-G24), con 20 días de gravedad terrestre, se observa una biopelícula en el spectrum 37 con 5 μm de diámetro. En la **imagen C** se muestra el análisis químico

del spectrum 5 con 19.7% de C, 52.6% de Fe, 2.6% de O, 13.3% de Cr, 7.8% de Ni, 0.1% de Na, 0.2% de Al y 0.1% de Si. En la **imagen D** se muestra el análisis químico del spectrum 30, con 36.8% de C, 5.6% de O, 10.3% de Cr, 5.9% de Ni, 0.1% de Na y 40.7% de Fe.

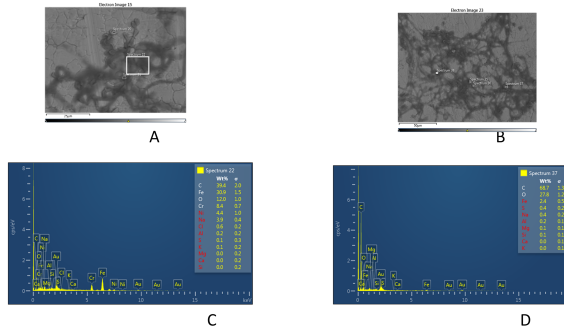
Cuadro 10: Diferencias en la composición química porcentual de las hifas en biopelículas del moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 en cupón acero inoxidable SS316 en los 15 días de regímenes gravitatorios.

Elemento	Teórico SS316	Cupón con PDB	S5	S30
Fe	69.39	35.9	-16.7	-4.8
C	0.018	30.8	11.1	-6
O	-	18.1	15.5	12.5
Cr	16.65	9.2	-4.1	-1.1
Ni	10.07	4.8	-3	-1.1
S	0.004	0.5	-	0.3
Si	0.35	0.4	0.3	0.3
Na	-	0.2	0.1	-
Mg	-	0.1	-	-
Al	-	0	-0.2	-
Mo	2.08	0	-2.2	-
K	-	0	-	-
Ca	-	0	-0.1	-0.2

Nota. Elaboración propia.

Basado en los espectros químicos base del cupón con medio PDB y composición estándar del acero inoxidable SS316 tomado de Kumar y compañeros (Kumar et al., 2012). Los números con signo negativo en S5 y S30 indican aumento del elemento químico.

Figura 29: Moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316, en 20 días de regímenes gravitatorios para el análisis químico de hifas en biopelículas.



En la **imagen A** (G- E9) se muestra la prueba de los 20 días microgravedad mientras en la **imagen B** (G- IG24) se muestra la prueba de los 20 días gravedad tierra. En la imagen C y D se analiza la composición de segmento por spectrum, los signos negativos indican aumento del elemento. Nota. Elaboración propia

Con base en las imagenes 15 y 23 el moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 constituye un conglomerado de hifas y esporas. En la **imagen A** (G E-9), las muestras fueron sometidas a 20 días de microgravedad. En el spectrum 22, se ve una biopelícula con una hifa de 4 μ m y un halo oscuro sobre ella. En el **segmento B** (GI-G24), con 20 días de gravedad terrestre, se observa una biopelícula en el spectrum 37 con 5 μ m de diámetro.

Basado en la imagen 15 y 23 el moho *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 un conglomerado de hifas y esporas. En la **imagen A (G E-9)** las muestras fueron sometidas a 20 días **microgravedad** y en la **imagen B** las muestras fueron sometidas a 20 días microgravedad. El spectrum 22 se ve una biopelícula con un halo negro mientras el 37 se observa una hifa encapsulada, comparado con espectros química base del cupón con medio PDB y composición estándar del acero inoxidable SS316 tomado de Kumar y compañeros (Kumar et al., 2012). Los números con signo negativo en S22 y S27 indican aumento del elemento.

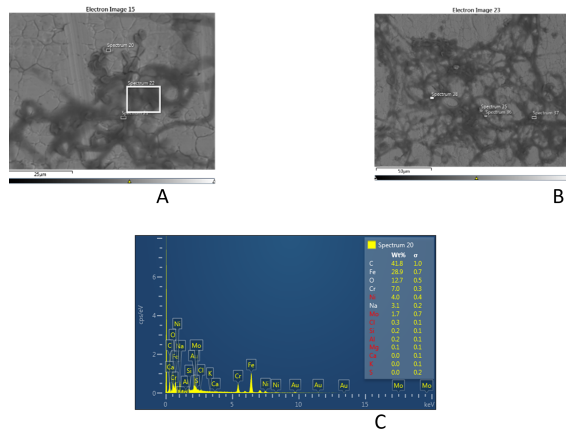
Cuadro 11: Diferencias en la composición química porcentual de las hifas del moho *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 en cupón de acero inoxidable SS316 en los 20 días de regímenes gravitatorios.

Elemento	Teórico SS316	Cupón con PDB	S22	S37
Fe	69.39	35.9	5	33.5
C	0.018	30.8	-8.6	-37.9
O	-	18.1	6.1	-9.7
Cr	16.65	9.2	0.8	-
Ni	10.07	4.8	0.4	-
S	0.004	0.5	0.4	0.1
Si	0.35	0.4	-	-
Na	-	0.2	0	-0.2
Mg	-	0.1	-	0
Al	-	0	-0.2	-0.2
Mo	2.08	0	-	-
K	-	0	-	-
Ca	-	0	-	-
Cl	0.1	-	-	-

Nota. Elaboración propia.

Basado en los espectros químicos base del cupón con medio PDB y composición estándar del acero inoxidable SS316 tomado de Kumar y compañeros (Kumar et al., 2012). Los números con signo negativo en S22 y S27 indican aumento del elemento químico. Los números con signo negativo en S22 y S27 indican aumento del elemento químico.

Figura 30: Moho *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 en cupón de acero inoxidable SS316, en 20 días de regímenes gravitatorios para el análisis químico de conidios.



Nota. Elaboración propia.

En la **imagen A** (F- E9) se muestra muestra la prueba de los 20 días de microgravedad, mientras en la **imagen B** (G-IG24) se muestra la prueba con 20 días gravedad terrestre. En la **imagen C** de la figura 27 se analiza la composición del segmento seleccionada como spectrum 20 con 20 días de microgravedad.

Con base en las imagenes 15 y 23 el moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 constituye un conglomerado de hifas y esporas. En la **imagen A** (F- E9), las muestras fueron sometidas a 20 días de microgravedad. En el spectrum 20, se ve conidio saliendo del conidióforo.

En la **imagen C** se muestra el análisis químico del spectrum 20 con 41.8% de C, 28.9% de Fe, O con 12.7%, 7.0% de Cr, 4.0% de Ni, 3.1% de Na, 1.7% de Mo, 0.3% de Cl, 0.2% de Si, 0.2% de Al y 0.1% de Mg.

Cuadro 12: Diferencias en la composición química porcentual de conidios del moho *Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316 en los 20 días de regímenes gravitatorios.

Elemento	Teórico	Cupón con PDB	S20
Fe	69.39	35.9	7
C	0.018	30.8	-11
O	-	18.1	5.4
Cr	16.65	9.2	5.2
Ni	10.07	4.8	1.7
S	0.004	0.5	-
Si	0.35	0.4	0.2
Na	-	0.2	0.2
Mg	-	0.1	-
Al	-	0	-0.2
Mo	2.08	0	-1.7
K	-	0	-
Ca	-	0	-
Cl	0.1		-0.3

Nota. Elaboración propia.

Basado en los espectros químicos base del cupón con medio PDB y composición estándar del acero inoxidable SS316 tomado de Kumar y compañeros (Kumar et al., 2012). Los números con signo negativo en S20 indican aumento del elemento químico.

A. Comparación de Peroxisomas en la Tierra y espacio

Penicillium rubens es desde los años 1940 la cepa usada para la síntesis de penicilina, por lo que está en continuo estudio por la industria farmacéutica. Por otro lado, también es de gran interés aeroespacial, al tener incidencia en la contaminación de misiones espaciales, su monitoreo resulta vital para evitar enfermedades que resultan mortales para los astronautas, durante su estancia en la Estación Espacial Internacional (EEI).

La investigación continua en la industria farmacéutica sobre la cepa *Penicillium rubens* se ha enfocado en estudios que incrementan la producción de intermediarios clave en la síntesis de antibióticos como la penicilina. Esta síntesis se lleva a cabo principalmente en compartimientos celulares de los peroxisomas y citosol. Se ha observado que la interacción entre estos intermediarios y compartimientos celulares, junto con funciones como la interacción celular, comunicación organelo-organelo y regulaciones fisiológicas aumentan la eficiencia de los fármacos, la aplicación de estos conocimientos resulta prometedora para aumentar la eficiencia de producción de estos metabolitos secundarios en hongos como este (Domínguez-Santos et al., 2017; Kistler & Broz, 2015).

Como se mencionó previamente, los peroxisomas son organelos en los que se sintetizan metabolitos secundarios y son clave en la supervivencia de *Penicillium rubens*, estos se han vinculado con la producción en conjunto de conidiosporas, teniendo un rol importante en la propagación de su especie (Steinberg, 2016). También tienen incidencia en el crecimiento de las hifas y en el movimiento de organelos como las endosomas, así como en el sellado de rupturas de membranas plasmáticas. Por la diversidad de las funciones que tiene el organelo son importantes en la movilización del hongo y en la regulación de su ciclo reproductivo (Steinberg, 2016).

Considerando que los peroxisomas son cruciales para la supervivencia y podrían estar vinculados con la adaptación de estas especies en ambientes extremos como el espacio, se analizó la cantidad de los peroxisomas en muestras sometidas a diferentes regímenes gravitatorios, ya que se querían marcar los peroxisomas como una comparación de una posible variación en la producción de penicilina al correlacionar la producción de penicilina en estos organelos. Estas muestras se procesaron estimando hifas de tamaño similar y se contabilizaron, ya que las imágenes fueron capturadas con un celular y observadas a 40X debido a que tenían mayor claridad en esa amplificación. El proceso incluyó el tratamiento previo de las muestras con 4% de paraformaldehído, seguido de la permeabilización con 0.4% de trixton X-100, posteriormente se llevó a cabo la inmunotinción utilizando el anti-PEX14

conjugado con Coralite 488 empleando como control negativo Quantifluor one dsDNA. Al realizar esta preparación de las muestras algunas de las figuras mostraron saturación en las hifas; las más evidentes fueron la **figura 15 A** y la **figura 15 E**.

El fenómeno de las estructuras sobresaturadas en las imágenes obtenidas del método de inmunotinción, es mencionado como un factor interferente en las mediciones realizadas con el microscopio de fluorescencia, se relaciona con la ruptura de la membrana. Esto fue confirmado mediante una prueba interna realizada con el hongo cultivado en una superficie de vidrio con PDA y expuesto durante 24 horas a una solución al 4% de PFA. En este caso, se utilizó azul de lactofenol para observar la membrana permeabilizada, tal como se muestra en la **figura 34 en anexos**.

La inferencia previa de las figuras **14 A** y **14 E** se refuerza al considerar el tiempo de almacenamiento de las muestras después de su regreso a la Tierra en el cohete espacial NG-17, en la Universidad del Valle de Guatemala (Hupka et al., 2023). Estas investigaciones están respaldadas por el estudio realizado por Cheng y colaboradores, quienes demostraron que las células de cultivos de tejidos, al ser tratadas con fijación y permeabilización, tienden a degradarse, perdiendo hasta un 10% de su membrana plasmática (Cheng et al., 2019). A pesar de esta limitación, el anticuerpo anti-PEX14 fue capaz de marcar los peroxisomas, como se observa en la **Figura 14**, lo que indica una mejora en la estandarización de la inmunotinción.

Durante esta fase, se observó que, a los 15 días de exposición tanto en microgravedad como en gravedad terrestre, se obtuvo una mayor cantidad de peroxisomas en microgravedad, como se muestra en las **figuras 14 y 15**. En la única hifa de la imagen A de la **figura 14**, se contaron 21 peroxisomas en la muestra expuesta a microgravedad, mientras que, en la muestra de gravedad terrestre, localizada en la imagen D, se encontraron 8 peroxisomas en la única hifa observada.

Se realizaron varias comparaciones adicionales bajo las mismas condiciones de tratamiento. En estos casos también se encontró una mayor cantidad de peroxisomas en microgravedad. Por ejemplo, en la imagen A de la **figura 14** (muestra en microgravedad a los 15 días) se contaron 21 peroxisomas, mientras que en la imagen C de la **figura 14** (muestra en gravedad terrestre) se contaron 4 peroxisomas en la hifa situada en el lado derecho de la imagen.

Sin embargo, en la última comparación realizada a los 15 días con microscopía de fluorescencia, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de peroxisomas entre microgravedad y gravedad terrestre. Tanto en la imagen B (gravedad terrestre) como en la imagen A (microgravedad), se contaron 3 peroxisomas en ambos casos.

Estos hallazgos sugieren que durante los primeros 15 días en microgravedad, hay una mayor cantidad de peroxisomas. No obstante, a los 20 días de exposición, no se observaron variaciones significativas en la cantidad de peroxisomas. Estos resultados pueden estar relacionados con la investigación de Hupka y colaboradores, quienes encontraron que a los 20 días hubo una disminución de nutrientes, lo que podría estar vinculado con una menor producción de organelos en microgravedad (Hupka et al., 2023).

Dado el interés en *Penicillium rubens* en esta investigación, la siguiente fase evaluará el efecto de la microgravedad sobre la morfología de los peroxisomas, el tamaño de las hifas, las hifas en biopelículas y los conidios durante 15 y 20 días de exposición a microgravedad y gravedad terrestre. Además, se analizará la composición topográfica del sustrato de crecimiento, acero inoxidable SS316, mediante microscopía electrónica de barrido.

A los 15 días, se observó una tendencia hacia el aumento de peroxisomas, hifas e hifas en biopelículas tanto en microgravedad como en gravedad terrestre. Sin embargo, a los 20 días, esta tendencia no se mantuvo constante en el sustrato. En algunos casos, se observó una menor cantidad de hifas, posiblemente debido a una disminución de nutrientes, lo que podría haber reducido la presencia de hongos en el sustrato. Estas variaciones podrían estar relacionadas con los cambios en la humedad durante la experimentación en la Estación Espacial Internacional (EEI), donde la humedad relativa

fluctuó entre 56.1% y 60% (Hupka et al., 2023). La dificultad para observar las muestras directamente sin pasarlas a portaobjetos también podría haber influido, por lo que se propone utilizar un microscopio confocal invertido de fluorescencia para las muestras de *Penicillium rubens* ATCC® 28089 crecidas en acero inoxidable SS316. Esta recomendación se basa en la apariencia en tres dimensiones mostrada en el control negativo de la inmunotinción en las **figuras 16 F y 18 C**.

A pesar de las divergencias en la tendencia de los peroxisomas, las limitaciones en la conservación de las muestras impiden una extracción simultánea de penicilina, afectando la evaluación de si la microgravedad promueve la producción del metabolito secundario penicilina. Por lo tanto, se sugiere cambiar el preservante a RNA Later, ya que facilitará la extracción del antibiótico.

Aunque estudios previos realizados por Sathishkumar y colegas indicaron que la microgravedad no afecta el número de peroxisomas en *Penicillium rubens* usando un simulador de microgravedad de bajo cizallamiento (LSMMG), estas inconsistencias deben aclararse con futuras investigaciones (Sathishkumar et al., 2014).

A pesar de la falta de una tendencia clara en la producción de peroxisomas a los 20 días en este estudio, se trata de una investigación pionera en la evaluación de los peroxisomas de *Penicillium rubens* expuestos a microgravedad. Se espera que la metodología empleada sea fundamental para futuras investigaciones, permitiendo recolectar información sobre la producción de estas organelas en conjunto con las variables de microgravedad y la activación del gen PST1, crucial para la conversión de penicilina G a penicilina N (Brocard & Hartig, 2006).

La activación del gen PST1, el conteo de peroxisomas y la evaluación del metabolismo de intermediarios son esenciales para estrategias de ingeniería genética destinadas a mejorar la cepa (Simões et al., 2023). Un ejemplo de cómo los compuestos intermediarios pueden estimular la producción de peroxisomas es la disminución de L-alanina, que previene la activación del gen. Aunque esta relación aún no se ha aclarado en *Penicillium*, podría estar relacionada con los cambios observados en la morfología del sustrato en este experimento, abriendo nuevas líneas de investigación sobre el comportamiento del hongo bajo la influencia de la gravedad (Tanabe et al., 2011).

B. Análisis de las muestras en el microscopio electrónico de barrido

La segunda metodología del experimento fue la prueba de identificación de la morfología de las estructuras en el microscopio electrónico de barrido, el cual reveló la densidad de conidios, conidióforos e hifas en microgravedad y gravedad terrestre. Se observó la topografía del sustrato del acero inoxidable con *Penicillium rubens* usando el microscopio electrónico de barrido, como complemento al estudio de la cuantificación de los peroxisomas.

Al observar la morfología de las estructuras de nuestro hongo modelo se conjeturó que las hifas observadas de estructuras oscuras nubosas se asemejan a las de *Aspergillus fumigatus*, las cuales según Joubert y compañeros por su estructura química son biopelículas de *Aspergillus fumigatus* esto lo confirmaron por un análisis NMR el cual detalla la composición de una matriz extracelular de polisacáridos y se asemeja a la estructura nubosa del análisis acá presentado en la **sección B.1 de resultados** (Joubert et al., 2017).

Como otras observaciones generales de esta metodología, se notó en la topografía a los 20 días algunos espacios sin hifas ni hifas encapsuladas en biopelículas del hongo modelo del estudio, a diferencia de la mayor densidad observada en las mismas muestras a los 15 días. Lo que se puede compararse con la investigación de Ruijten en la que se asocia la disminución de la humedad con la disminución de las hifas, esto ocurre por la deshidratación que pudo tener el acero inoxidable impidiendo su crecimiento. (Ruijten et al., 2020).

La inferencia previa sobre la cepa modelo se ve respaldada por lo que los miembros del grupo de investigación Space Biofilms publicaron en su estudio "Morphology of *Penicillium rubens* Biofilms Formed in Space". En este estudio, se señala que el período de 20 días bajo condiciones gravitacionales podría haber provocado un estado de depleción de nutrientes, lo cual concuerda con la menor cantidad de hongo observada en las zonas del cupón analizadas (Hupka et al., 2023).

Continuando con el análisis de las muestras usadas en la segunda metodología, se evaluó el grosor de las hifas, hifas encapsuladas en biopelículas y conidios, este fue el primer análisis de los datos con ejemplares fúngicos obtenidos con el microscopio electrónico de barrido en Guatemala detallado en la **sección B.1**. En esta sección se encontraron rasgos en la densidad del hongo en los regímenes gravitatorios, en el caso de las hifas en biopelículas se observó un aumento de 0.1 μm en 15 días de microgravedad contrastado con gravedad terrestre. Una observación importante a resaltar es que los intervalos de confianza en la **Figura 23** de las mediciones muestran valores negativos en el lado izquierdo lo que se infiere como escalas no detectables, ya que el error es mayor a 0.05 μm . Una posible causa de este fenómeno pudo ser que a los 15 días el alimento PDB no disminuye homogéneamente y tuvo mayor disponibilidad en la superficie del lado en la que se detectó el valor positivo (Hupka et al., 2023).

En el otro régimen gravitatorio, al evaluar el grosor de las hifas en biopelículas, se observó un aumento de 0.04 μm a los 20 días de exposición a microgravedad en comparación con la gravedad terrestre. Dado que este aumento es menor que el error de la escala de medición, que es de 0.1 μm , es posible que la diferencia no sea significativa. Sin embargo, si se utilizara un instrumento con mayor precisión en el análisis, esta diferencia en el grosor de las hifas en biopelículas podría resultar relevante para el crecimiento del hongo en el sustrato.

En cuanto a los conidios se encontró que a los 20 días de gravedad tierra presentaron un diámetro de 0.02 μm , la medición a diferencia de las hifas en biopelículas mostró mayor precisión al tener intervalos de confianza del 95 % positivos. Algo que vale la pena mencionar es que los conidios tuvieron el 30 % de cobertura en el sustrato y esto podría estar relacionado con la adaptación del hongo en microgravedad.

Además, en la sección de la investigación mediante el análisis químico de microscopía electrónica de barrido utilizando el programa Oxford, se identificaron variaciones en la composición del sustrato. Estas variaciones están relacionadas con los segmentos de la hifa, la hifa en biopelícula y el conidióforo, como se detalla en la **sección B.2**.

En los 15 días de microgravedad y gravedad terrestre se obtuvo un aumento en la composición de oxígeno comparándolo con los controles internos de PDB y acero inoxidable teórico, estos se usaron para todos los análisis químicos, detallados en la **figura A. 1 en anexos**. Ambos regímenes gravitacionales aumentaron en el % de oxígeno, pero en microgravedad presentó un 0.5 % de aumento de oxígeno con respecto a la gravedad terrestre a los 15 días. Este comportamiento también se presentó en el carbono teniendo un 35.2 % de aumento en gravedad terrestre y 34.1 % de aumento en microgravedad, al igual que en el hierro con un aumento de 16.7 % en exposición tierra y un aumento un 4.8 %, los cambios se infieren por la corrosión del material.

El aumento del oxígeno en ambos regímenes gravitatorios se correlaciona con la respiración celular del hongo, así como lo demostrado en el modelo *iPrub 22*, donde relacionaron la respiración celular con el oxígeno desmedido que toma el hongo al incrementar el 80 % de su biomasa (Nègre et al., 2023). Las correlaciones previas se afianzan a los datos de NASA (Administración Nacional de Aeronáutica y Espacio), en las que se describe que el oxígeno suministrado en las pruebas de microgravedad es el mismo que en la tierra con 79 % de nitrógeno y 21 % de oxígeno el cual se encuentra en un constante regulación debido al suministro por un sistema de síntesis de oxígeno electrolítico. Esto se vincula con los lugares de experimentación en la Estación Espacial Internacional y en la Universidad Estearn Virginia Medical School en donde se activaron los experimentos (Lv et al., 2021).

En otros estudios también se ha vinculado el oxígeno con el aumento de biomasa, Luo y compañeros observaron que cuando la biopelícula de los hongos aumentaba en muestras tomadas de agua subterránea con el hongo que se está estudiando y 2 más, el oxígeno incrementaba de la misma manera. Esta observación se comprobó con mediciones de OD a 520 nm usando tinciones cristal violeta y se midió la cantidad del nutriente por cinética enzimática (Luo et al., 2021).

Otro compuesto evaluado fue el carbono, el cual tiene como función regulación enzimática y producción de metabolitos secundarios, por lo que el incremento en este elemento se atribuye al medio y a la cantidad de los hongos que observamos en las **figuras 7.23 y 7.25** (Luo et al., 2021).

Los análisis químicos del calcio resultaron ser otro elemento que mostró aumento en el porcentaje de composición a los 15 días de regímenes gravitatorios. Ocurrieron en un segmento de una hifa en biopelícula del hongo crecido en cupones de acero inoxidable SS316 en 15 días de microgravedad y gravedad terrestre. El aumento en gravedad terrestre fue de 0.2 % , mientras que en la microgravedad fue de 0.1 % . Estos resultados se pueden relacionar con la revisión recopilada por Orsherov, en la que ellos sintetizan el rol del calcio en la germinación de los conidios a hifas (Osherov & May, 2001)

De la misma forma se evaluaron las muestras en 15 y 20 días de microgravedad, teniendo cambios en la cantidad en porcentaje de sodio. Está vario en todas los spectrums o segmentos evaluados, y se consideró que las variables influyentes fueron la humedad relativa, en el caso de las hifas aumentan en presencia de humedad y la ausencia de los conidios tiende a ser una respuesta de regulación osmótica (Opaliński et al., 2010; Nègre et al., 2023; Adnan et al., 2017; Navarro-Espíndola et al., 2020).

Al analizar el carbono en muestras, se encontró que en todas los segmentos de las morfologías de hifas, hifas en biopelículas y conidios el aumento fue notorio y esto se debe a su uso enzimático y en el caso de la biopelícula es característico de la matriz de exopolisacáridos (Luo et al., 2021)

Al comparar, mediante análisis químico con el programa Oxford, un segmento de conidios en microgravedad durante 20 días con la composición del sustrato con medio PDB, se observó en la microgravedad un aumento del 11 % en el valor del carbono. Asimismo, se registró un incremento del 1.7 % en molibdeno y del 0.3 % en cloro.

El aumento de molibdeno, como otro elemento evaluado a los 20 días, ya ha sido evaluado por Dudziak y sus colegas en pruebas de resistencia a la oxidación y temperatura en el acero inoxidable SS316 L, un acero similar al SS316, pero con un menor porcentaje de carbono. Este, al oxidarse, genera la fase sigma a 900 °C. En este estado, el aumento de molibdeno y la estructura de levantamiento en el material se asemejan a la observada en los regímenes de 20 días. Dado que el aumento en molibdeno se dio únicamente en el análisis químico de la microgravedad (**ver Figura 30, imagen C**), esto se relaciona con otro ángulo de la misma prueba observada en la **Figura 34** de los anexos. Se confirman los enlaces Fe-Cr característicos de los cristales de espinel en la oxidación del acero inoxidable. Puede ser que en la **Figura 30**, imagen A, no se hayan observado las estructuras de espinel debido al espesor de las biopelículas que encapsulan a las hifas (Dudziak et al., 2023b).

Conclusiones

Los peroxisomas en *Penicillium rubens* ATCC® 28089 se marcaron utilizando la técnica de inmunotinción con el anticuerpo anti-PEX14 conjugado con Coralite 488 ® de Proteintech. Las muestras se cultivaron en acero inoxidable SS316, y, luego, se observaron mediante microscopía de fluorescencia con el microscopio Leica DM 2500 LED, el cual emplea un portaobjetos de vidrio. A pesar de las limitaciones, como el alcance del microscopio de 100 x y la saturación de las hifas con el colorante, se comparó la cantidad de peroxisomas en muestras cultivadas tanto en microgravedad como en gravedad terrestre. Para reducir errores, se seleccionaron hifas de tamaños similares, aunque la falta de una escala de referencia limitó el análisis a una evaluación cualitativa.

En la observación por microscopía de fluorescencia, se visualizaron los peroxisomas de *Penicillium rubens* en cupones de acero inoxidable tras 15 y 20 días de crecimiento, tanto en gravedad terrestre como en microgravedad. No obstante, no se detectaron cambios en la morfología de estos orgánulos. Las ampliaciones de 40 x se emplearon, ya que proporcionaron mayor claridad en las imágenes.

Al comparar el crecimiento del hongo en cupones de acero inoxidable SS316 durante 15 días en microgravedad y 20 días en gravedad terrestre utilizando las densidades de hifas, hifas encapsuladas en biopelículas y conidios con microscopía electrónica de barrido, se observó un aumento en la densidad de las hifas en microgravedad a los 20 días, con 0.2 um en comparación las de los 15 días. En el caso de las hifas en biopelículas, se encontró un aumento de 0.1 a los 20 días en gravedad terrestre en comparación con los 15 días. Además, en el análisis químico brindado por la técnica de microscopía de barrido en los regímenes gravitatorios, se observó un aumento en la composición del sustrato en elementos como carbono, oxígeno, sodio, hierro, calcio, aluminio y cromo.

Este estudio representa el primer análisis de peroxisomas en *Penicillium rubens* expuestos a microgravedad, utilizando acero inoxidable como sustrato. La investigación se centró en la visualización y cuantificación de estos orgánulos mediante microscopía de fluorescencia, debido a su papel en la síntesis de metabolitos secundarios. Asimismo, se evaluó la composición química y morfológica de las muestras utilizando un microscopio electrónico de barrido. Se espera que esta metodología, pionera en Guatemala para muestras fúngicas, abra nuevas líneas de investigación en la región. Este estudio marca un hito, siendo el segundo material biológico procesado en el microscopio electrónico de barrido del laboratorio de Cementos Progreso en Guatemala, planteando interrogantes sobre el comportamiento del hongo en dos regímenes gravitacionales (espacio y Tierra) y explorando cómo la microgravedad puede influir en la producción de metabolitos secundarios, biopelículas y la bioquímica del hongo.

Recomendaciones

Se plantea el uso de un microscopio confocal invertido de fluorescencia para analizar muestras de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 cultivadas en acero inoxidable SS316 bajo diferentes regímenes gravitatorios. Al emplear cupones sumergidos en solución de paraformaldeído para la inmunotinción, se sospecha que la superposición de las muestras dificultó el conteo preciso de los peroxisomas al observarlas con microscopía de fluorescencia. Esta alternativa permitirá visualizar las muestras de manera directa, mejorando significativamente la precisión del análisis.

Asímismo, se recomienda hacer simulaciones de microgravedad con muestras de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 crecidas en acero inoxidable SS316 y fijadas en 4% de paraformaldeído. Una opción para estas simulaciones son los clinostats 2D, con los que se pueden evaluar los cambios de la microgravedad en la producción de peroxisomas, empleando microscopía a fluorescencia.

A pesar de marcar los peroxisomas, no se observó la morfología de estos organelos, se sugiere adaptar una cámara de microscopio para el microscopio de fluorescencia Leica DM 2500 LED para amplificar la señal y observar en que fase de proliferación está el peroxisoma y relacionarlo con los fenómenos de la microgravedad y gravedad terrestre.

Se recomienda que el análisis de cuantificación de peroxisomas sea complementado con un estudio genómico del grupo biosintético de genes (BBG) *pcbAB*, *pcbC*, y *penDE*, los cuales son cruciales en la producción de penicilina en hongos, dado que están asociados con una mayor síntesis de este antibiótico. El enfoque sugerido implica medir el rendimiento de producción de penicilina, acompañado de una cuantificación de la expresión genética utilizando Syber Green, lo que puede proporcionar información valiosa sobre las condiciones que inducen a la cepa a producir metabolitos secundarios. Sin embargo, debido a limitaciones de tiempo, BioServe Space Technologies no pudo secuenciar el genoma del espécimen en esta ocasión.

Referencias

- Acres, J. M., Youngapelian, M. J., y Nadeau, J. (2021). The influence of spaceflight and simulated microgravity on bacterial motility and chemotaxis. *npj Microgravity*, 7(1), 7.
- Adeyeye, S. A. (2016). Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1213127.
- Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y. S., Wang, Z., y Lu, G. (2017). Carbon catabolite repression in filamentous fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 48.
- Adrio, J. L., y Demain, A. L. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6, 191–199.
- Aleklett, K., y Boddy, L. (2021). Fungal behaviour: a new frontier in behavioural ecology. *Trends in Ecology & evolution*, 36(9), 787–796.
- Aliyu, S. R., Lin, L., Chen, X., Abdul, W., Lin, Y., Otieno, F. J., ... Norvienyeku, J. (2019, junio). Disruption of putative short-chain acyl-CoA dehydrogenases compromised free radical scavenging, conidiogenesis, and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 127, 23–34. Descargado 2024-01-05, de <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184518301324> doi: 10.1016/j.fgb.2019.02.010
- Bartoszewska, M., Opaliński, , Veenhuis, M., y Van Der Klei, I. J. (2011, octubre). The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 33(10), 1921–1931. Descargado 2024-01-05, de <http://link.springer.com/10.1007/s10529-011-0664-y> doi: 10.1007/s10529-011-0664-y
- Bielčík, M., Aguilar-Trigueros, C. A., Lakovic, M., Jeltsch, F., y Rillig, M. C. (2019). The role of active movement in fungal ecology and community assembly. *Movement ecology*, 7(1), 1–12.
- Boruta, T. (2018). Uncovering the repertoire of fungal secondary metabolites: From Fleming's laboratory to the international space station. *Bioengineered*, 9(1), 12–16.
- Brocard, C., y Hartig, A. (2006, diciembre). Peroxisome targeting signal 1: Is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1565–1573. Descargado 2024-01-05, de <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016748890600228X> doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.022
- Cheng, R., Zhang, F., Li, M., Wo, X., Su, Y.-W., y Wang, W. (2019). Influence of fixation and permeabilization on the mass density of single cells: a surface plasmon resonance imaging study. *Frontiers in chemistry*, 7, 588.
- Cortese, M., Holland, G., Schütze, T., Laue, M., Moeller, R., y Meyer, V. (2022, septiembre). Colony growth and biofilm formation of *Aspergillus niger* under simulated microgravity. *Frontiers in Microbiology*, 13, 975763. Descargado 2024-01-05, de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.975763/full> doi: 10.3389/fmicb.2022.975763
- Costa-Orlandi, C. B., Sardi, J. C., Pitangui, N. S., De Oliveira, H. C., Scorzoni, L., Galeane, M. C., ... others (2017). Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *Journal of Fungi*, 3(2), 22.
- Davies, T. E., Li, H., Bessette, S., Gauvin, R., Patience, G. S., y Dummer, N. F. (2022). Experimental methods in chemical engineering: Scanning electron microscopy and x-ray ultra-microscopy—sem and xum. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 100(11), 3145–3159.
- De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I., y De Saeger, S. (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766, 32–41.
- Domínguez-Santos, R., Kosalková, K., García-Estrada, C., Barreiro, C., Ibáñez, A., Morales, A., y Martín, J.-F. (2017, marzo). Casein phosphopeptides and CaCl₂ increase penicillin production and cause an increment in microbody/peroxisome proteins in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Proteomics*, 156, 52–62. Descargado 2024-01-05, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391916305498> doi: 10.1016/j.jprot.2016.12.021
- Dudziak, T., Buzolin, R., Rząd, E., Wójcicki, M., Kateusz, F., Arneitz, S., y Polkowska, A. (2023). Effect of 316l stainless steel fabrication on oxidation resistance, surface morphology, and hot tensile behavior. *Journal of Materials Engineering and Performance*, 1–12.

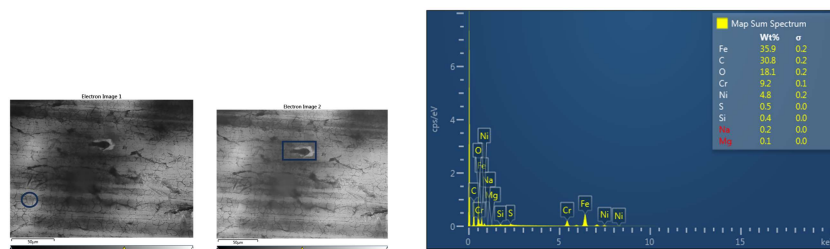
- Egbuta, M. A., Mwanza, M., y Babalola, O. O. (2017). Health risks associated with exposure to filamentous fungi. *International journal of environmental research and public health*, *14*(7), 719.
- Fierro, F., Vaca, I., Castillo, N. I., García-Rico, R. O., y Chávez, R. (2022). Penicillium chrysogenum, a vintage model with a cutting-edge profile in biotechnology. *Microorganisms*, *10*(3), 573.
- Franco-Duarte, R., Fernandes, I., Gulis, V., Cássio, F., y Pascoal, C. (2022). Its rdna barcodes clarify molecular diversity of aquatic hyphomycetes. *Microorganisms*, *10*(8), 1569.
- Gao, Y., Skowrya, M. L., Feng, P., y Rapoport, T. A. (2022, diciembre). Protein import into peroxisomes occurs through a nuclear pore-like phase. *Science*, *378*(6625), eadf3971. Descargado 2023-01-31, de <https://www.science.org/doi/10.1126/science.adf3971> doi: 10.1126/science.adf3971
- Grant, P., Ahlemeyer, B., Karnati, S., Berg, T., Stelzig, I., Nenicu, A., ... Baumgart-Vogt, E. (2013, octubre). The biogenesis protein PEX14 is an optimal marker for the identification and localization of peroxisomes in different cell types, tissues, and species in morphological studies. *Histochemistry and Cell Biology*, *140*(4), 423–442. Descargado 2024-01-05, de <http://link.springer.com/10.1007/s00418-013-1133-6> doi: 10.1007/s00418-013-1133-6
- Guzmán-Chávez, F., Zwahlen, R. D., Bovenberg, R. A. L., y Driessen, A. J. M. (2018). Engineering of the Filamentous Fungus Penicillium chrysogenum as Cell Factory for Natural Products. *Frontiers in Microbiology*, *9*. Descargado 2022-09-25, de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02768>
- Hamad, G. M., Mehany, T., Simal-Gandara, J., Abou-Alella, S., Esua, O. J., Abdel-Wahhab, M. A., y Hafez, E. E. (2023). A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. *Food Control*, *144*, 109350. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713522005436> doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109350>
- Hosseini, V. A., Karlsson, L., Wessman, S., y Fuertes, N. (2018, junio). Effect of Sigma Phase Morphology on the Degradation of Properties in a Super Duplex Stainless Steel. *Materials*, *11*(6), 933. Descargado 2024-01-05, de <https://www.mdpi.com/1996-1944/11/6/933> doi: 10.3390/ma11060933
- Hupka, M., Kedia, R., Schauer, R., Shepard, B., Granados-Presa, M., Vande Hei, M., ... Zea, L. (2023, abril). Morphology of Penicillium rubens Biofilms Formed in Space. *Life*, *13*(4), 1001. Descargado 2024-01-05, de <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/4/1001> doi: 10.3390/life13041001
- Jameel, F. A. R., y Yassein, S. N. (2021). Virulence potential of penicillium chrysogenum isolated from subclinical bovine mastitis. *Iraqi Journal of Science*, 2131–2142.
- Janani, S. P., Arasu, P. T., Muzaddadi, I. U., Murugan, A., Ravikumar, C., Yadav, N. N., y Yadav, H. S. (2022). Photodynamic therapy with nanomaterials to combat microbial infections. En *Emerging nanomaterials and nano-based drug delivery approaches to combat antimicrobial resistance* (pp. 531–576). Elsevier.
- Joubert, L.-M., Ferreira, J. A., Stevens, D. A., Nazik, H., y Cegelski, L. (2017, enero). Visualization of Aspergillus fumigatus biofilms with Scanning Electron Microscopy and Variable Pressure-Scanning Electron Microscopy: A comparison of processing techniques. *Journal of Microbiological Methods*, *132*, 46–55. Descargado 2024-01-05, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701216303116> doi: 10.1016/j.mimet.2016.11.002
- Khan, A. H., y Karuppayil, S. M. (2012). Fungal pollution of indoor environments and its management. *Saudi journal of biological sciences*, *19*(4), 405–426.
- Kistler, H. C., y Broz, K. (2015). Cellular compartmentalization of secondary metabolism. *Frontiers in microbiology*, *6*, 68.
- Klintworth, R., Reher, H., Viktorov, A., y Bohle, D. (1999, abril). Biological induced corrosion of materials II: New test methods and experiences from mir station. *Acta Astronautica*, *44*(7-12), 569–578. Descargado 2024-01-05, de <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0094576599000697> doi: 10.1016/S0094-5765(99)00069-7
- Kumar, N., Jyothirmayi, A., Soma Raju, K., y Subasri, R. (2012). Effect of functional groups (methyl, phenyl) on organic–inorganic hybrid sol–gel silica coatings on surface modified ss 316. *Ceramics International*, *38*(8), 6565–6572. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/>

- science/article/pii/S027288421200449X doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.05.040>
- Liu, S., Le Mauff, F., Sheppard, D. C., y Zhang, S. (2022, octubre). Filamentous fungal biofilms: Conserved and unique aspects of extracellular matrix composition, mechanisms of drug resistance and regulatory networks in *Aspergillus fumigatus*. *npj Biofilms and Microbiomes*, 8(1), 83. Descargado 2024-01-05, de <https://www.nature.com/articles/s41522-022-00347-3> doi: 10.1038/s41522-022-00347-3
- Luo, X., Xu, X., Cao, R., Wan, Q., Wang, J., Xu, H., ... Huang, T. (2021, noviembre). The formation kinetics and control of biofilms by three dominant fungi species isolated from groundwater. *Journal of Environmental Sciences*, 109, 148–160. Descargado 2024-01-05, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074221001418> doi: 10.1016/j.jes.2021.04.002
- Lv, M., Li, X., Li, Y., Zhang, W., y Guo, R. (2021). Ukf-based state estimation for electrolytic oxygen generation system of space station. *Applied Sciences*, 11(5), 2021.
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., y Yong, W. H. (2019). An introduction to the performance of immunohistochemistry. *Biobanking: Methods and Protocols*, 289–298.
- Majtner, T. (2015). Texture-based image description in fluorescence microscopy. *Doctoral theses, dissertations, Masaryk University, Faculty of Informatics, Brno*.
- Mansfeld, F., Shih, H., Postyn, A., Devlin, J., Islander, R., y Chen, C. (1991). Corrosion monitoring and control in concrete sewer pipes. *Corrosion*, 47(5), 369–376.
- Meijer, W., Gidijala, L., Fekken, S., Kiel, J., Berg, M., Lascaris, R., ... van der Klei, I. (2010, enero). Peroxisomes Are Required for Efficient Penicillin Biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and environmental microbiology*, 76, 5702–9. doi: 10.1128/AEM.02327-09
- Moreira, C. G., y Schoenlein-Crusius, I. H. (2012). New species and new records for brazil of hyphomycetes on submerged leaf litter collected in parque municipal alfredo volpi, são paulo, são paulo state, brazil. *Hoehnea*, 39, 521–527.
- Nastasi, N., Haines, S. R., Xu, L., da Silva, H., Divjan, A., Barnes, M. A., ... Dannemiller, K. C. (2020). Morphology and quantification of fungal growth in residential dust and carpets. *Building and environment*, 174, 106774.
- Navarro-Espíndola, R., Suaste-Olmos, F., y Peraza-Reyes, L. (2020). Dynamic regulation of peroxisomes and mitochondria during fungal development. *Journal of Fungi*, 6(4), 302.
- Novikova, N., De Boever, P., Poddubko, S., Deshevaya, E., Polikarpov, N., Rakova, N., ... Mergeay, M. (2006, enero). Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Research in Microbiology*, 157(1), 5–12. Descargado 2022-08-02, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250805002627> doi: 10.1016/j.resmic.2005.07.010
- Nègre, D., Larhlimi, A., y Bertrand, S. (2023, agosto). Reconciliation and evolution of *Penicillium rubens* genome-scale metabolic networks—What about specialised metabolism? *PLOS ONE*, 18(8), e0289757. Descargado 2024-01-05, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10468094/> doi: 10.1371/journal.pone.0289757
- Opaliński, , Kiel, J. A., Homan, T. G., Veenhuis, M., y Van Der Klei, I. J. (2010, agosto). *Penicillium chrysogenum* Pex14/17p – a novel component of the peroxisomal membrane that is important for penicillin production. *The FEBS Journal*, 277(15), 3203–3218. Descargado 2024-01-05, de <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2010.07726.x> doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07726.x
- Osharov, N., y May, G. S. (2001, 05). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*, 199(2), 153-160. Descargado de <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x> doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x
- Parrilli, E., Tutino, M. L., y Marino, G. (2022). Biofilm as an adaptation strategy to extreme conditions. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 33(3), 527–536.
- Pathak, A., Nowell, R. W., Wilson, C. G., Ryan, M. J., y Barraclough, T. G. (2020, septiembre). Comparative genomics of Alexander Fleming’s original *Penicillium* isolate (IMI 15378) reveals sequence divergence of penicillin synthesis genes. *Scientific Reports*, 10(1), 15705.

- Descargado 2024-01-05, de <https://www.nature.com/articles/s41598-020-72584-5> doi: 10.1038/s41598-020-72584-5
- Paul, S., Diekema, D., y Moye-Rowley, W. S. (2013, diciembre). Contributions of *Aspergillus fumigatus* ATP-Binding Cassette Transporter Proteins to Drug Resistance and Virulence. *Eukaryotic Cell*, 12(12), 1619–1628. Descargado 2024-01-05, de <https://journals.asm.org/doi/10.1128/EC.00171-13> doi: 10.1128/EC.00171-13
- Penesyan, A., Paulsen, I. T., Kjelleberg, S., y Gillings, M. R. (2021). Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 80.
- Peng, Q., Yuan, Y., Gao, M., Chen, X., Liu, B., Liu, P., ... Wu, D. (2014). Genomic characteristics and comparative genomics analysis of penicillium chrysogenum kf-25. *BMC genomics*, 15, 1–15.
- Rodrigues, A., Alves, M., Gutierrez-Patricio, S., Miller, A. Z., y Macedo, M. F. (2022, julio). From Biodeterioration to Creativity: Bioreceptivity of Spruce Pine 87 Glass Batch by Fungi. *Applied Sciences*, 12(15), 7672. Descargado 2024-01-05, de <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/15/7672> doi: 10.3390/app12157672
- Ruijten, P., Huinink, H. P., y Adan, O. C. (2020, diciembre). *Penicillium rubens* germination on desiccated and nutrient-depleted conditions depends on the water activity during sporogenesis. *Fungal Biology*, 124(12), 1058–1067. Descargado 2024-01-05, de <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878614620301586> doi: 10.1016/j.funbio.2020.10.006
- Sathishkumar, Y., Velmurugan, N., Lee, H. M., Rajagopal, K., Im, C. K., y Lee, Y. S. (2014, agosto). Effect of low shear modeled microgravity on phenotypic and central chitin metabolism in the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(2), 197–209. Descargado 2024-01-03, de <http://link.springer.com/10.1007/s10482-014-0181-9> doi: 10.1007/s10482-014-0181-9
- Scarles, S. C., Woolley, C. M., Petersen, R. A., Hyman, L. E., y Nielsen-Preiss, S. M. (2011, octubre). Modeled Microgravity Increases Filamentation, Biofilm Formation, Phenotypic Switching, and Antimicrobial Resistance in *Candida albicans*. *Astrobiology*, 11(8), 825–836. Descargado 2024-01-05, de <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ast.2011.0664> doi: 10.1089/ast.2011.0664
- Sham, N. M., Ahmad, N. I., Pahrol, M. A., y Leong, Y.-H. (2021, abril). Fungus and mycotoxins studies in hospital environment: A scoping review. *Building and Environment*, 193, 107626. Descargado 2024-01-05, de <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036013232100038X> doi: 10.1016/j.buildenv.2021.107626
- Shen, C., Wang, J., Jing, Z., Qiao, N.-H., Xiong, C., y Ge, Y. (2022). Plant diversity enhances soil fungal network stability indirectly through the increase of soil carbon and fungal keystone taxa richness. *Science of The Total Environment*, 818, 151737. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721068133> doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151737>
- Simões, M., Cortesão, M., Azua-Bustos, A., Bai, F., Canini, F., Casadevall, A., ... others (2023). The relevance of fungi in astrobiology research—astromycology. *Mycosphere*, 14(1), 1190–1253.
- Steinberg, G. (2016, diciembre). The mechanism of peroxisome motility in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 97, 33–35. Descargado 2024-01-04, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184516301244> doi: 10.1016/j.fgb.2016.10.006
- Sutton, B. (2014). Fungi | classification of the deuteromycetes. En C. A. Batt y M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology (second edition)* (Second Edition ed., p. 30-34). Oxford: Academic Press. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300001403> doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00140-3>
- Tanabe, Y., Maruyama, J.-i., Yamaoka, S., Yahagi, D., Matsuo, I., Tsutsumi, N., y Kitamoto, K. (2011, septiembre). Peroxisomes Are Involved in Biotin Biosynthesis in *Aspergillus* and *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30455–30461. Descargado 2024-01-04, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3162405/> doi: 10.1074/jbc.M111.247338
- Ueda, K., Anderson-Baron, M. N., Haskins, J., Hughes, S. C., y Simmonds, A. J.

- (2022, abril). Recruitment of Peroxin 14 to lipid droplets affects lipid storage in *Drosophila*. *Journal of Cell Science*, 135(7), jcs259092. Descargado 2024-01-05, de <https://journals.biologists.com/jcs/article/135/7/jcs259092/275042/Recruitment-of-Peroxin-14-to-lipid-droplets> doi: 10.1242/jcs.259092
- van Rhijn, N., y Bromley, M. (2021). The consequences of our changing environment on life threatening and debilitating fungal diseases in humans. *Journal of Fungi*, 7(5), 367.
- Wong, J., Magun, B. E., y Wood, L. J. (2016). Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 1391–1401.
- Xia, M.-C., Bao, P., Liu, A.-J., Zhang, S.-S., Peng, T.-J., Shen, L., ... Zeng, W.-M. (2018). Isolation and identification of penicillium chrysogenum strain y5 and its copper extraction characterization from waste printed circuit boards. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(1), 78-87. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172317309799> doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.001>
- Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., y Chen, J. (2023). Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1160551.
- Zea, L., McLean, R. J., Rook, T. A., Angle, G., Carter, D. L., Delegard, A., ... others (2020). Potential biofilm control strategies for extended spaceflight missions. *Biofilm*, 2, 100026.
- Zea, L., Nisar, Z., Rubin, P., Cortesão, M., Luo, J., McBride, S., ... Stodieck, L. (2018, julio). Design of a spaceflight biofilm experiment. *Acta Astronautica*, 148, 294–300. doi: 10.1016/j.actaastro.2018.04.039
- Zhang, T., Li, Y.-N., Li, X., Gu, W., Moeketsi, E. K., Zhou, R., ... Zhang, H. (2022, enero). The Peroxisomal-CoA Synthetase MoPcs60 Is Important for Fatty Acid Metabolism and Infectious Growth of the Rice Blast Fungus. *Frontiers in Plant Science*, 12, 811041. Descargado 2024-01-05, de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.811041/full> doi: 10.3389/fpls.2021.811041

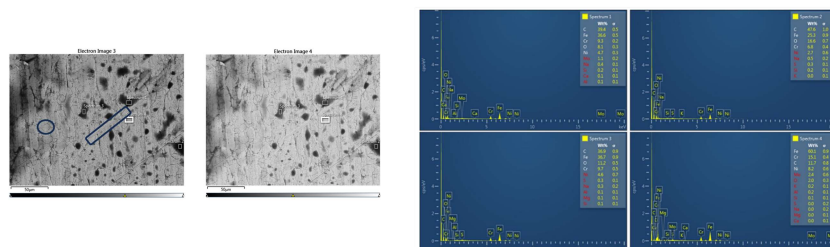
Figura 1: Composición química base del medio PDB en SS316, de la sección total del cupón SS316 del lado derecho está la composición total.



Nota. Elaboración propia.

Nota. En el óvalo, se observa la estructura cristalina austenítica con una cara céntrica de cubo, característica del acero inoxidable. En el rectángulo, se observa un rayón, una estructura sigma del SS316 por ausencia de molibdeno, característico para formar los enlaces Fe-Cr de la cristalografía. Está es la composición base usada en las comparaciones de regímenes gravitacionales.

Figura 2: Composición química base de medio PDB en SS316.

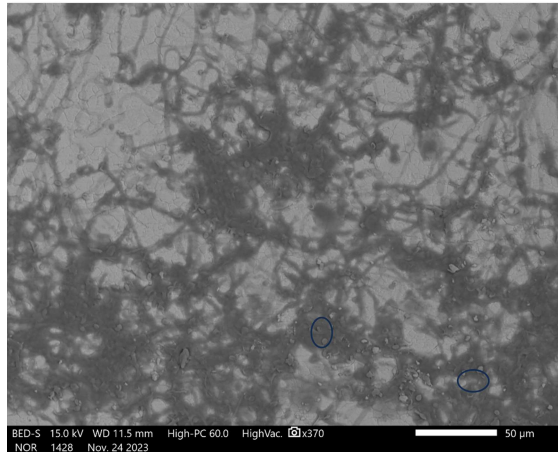


Nota. Elaboración propia.

Nota. Se estandarizó empleando gotas del medio y la morfología del acero inoxidable SS316 en microscopía SEM.

El análisis químico se hizo por spectrum. Todos los spectrum, menos el 4, son de medio PDB. En el óvalo y spectrum 4, se muestra la estructura cristalina auténtica con una cara céntrica de cubo, característica del acero inoxidable. En el rectángulo se observa un rayón, una estructura sigma del SS316 por ausencia de molibdeno, característico para formar los enlaces Fe-Cr de la cristalografía (Dudziak y cols., 2023; Hosseini, Karlsson, Wessman, y Fuertes, 2018).

Figura 3: *Moho Penicillium rubens* ATCC (®) 28089 en cupón de acero inoxidable SS316. F-124 muestra la prueba de 20 días de microgravedad a 370x de aumento.



Nota. Elaboración propia.

En los óvalos se observa la spinel característica de FeCr_2O_4 o de MnCr_2O_4 en la oxidación. Se empleó una referencia de SS316L a una prueba de 900 °C; El material de referencia tiene mayor resistencia a oxidación (Dudziak y cols., 2023). La identificación de la morfología de las estructuras en la microscopía electrónica de barrido fue intuitiva, la cual se observó como la identificación de conidios, conidióforos e hifas mediante la tinción azul de lactofenol. Sin embargo, se observaron hifas de estructuras oscuras nubosas, las cuales, según Joubert y compañeros, se asemejan a biopelículas de *Aspergillus fumigatus* confirmando la estructura con un análisis NMR el cual concordaba con la composición de una matrix extracelular con polisacáridos (Hosseini y cols., 2018).

En cuanto a la morfología, se empleó como referencia la medida que se detalló en el microscopio electrónico de barrido JSM-IT500. La muestra de 15 días de microgravedad tuvo mayor grosor con 6 μm . Por otro lado, la muestra de 20 días de gravedad terrestre presentó mayor grosor de la hifa con 5 μm . Como se mencionó, un factor que influyó en el grosor de la hifa fue el tiempo de exposición.

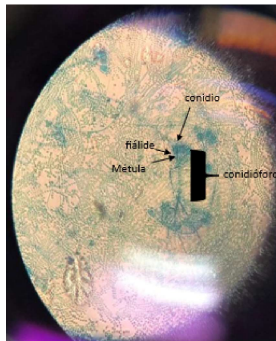
Figura 4: Prueba señuelo de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089. Tinción azul de lactofenol después de 15 días de crecimiento en acero inoxidable SS316 con medio PDB. Se trató por 24 horas con 4 % de PFA.



Nota. Elaboración propia.

Nota. Alrededor de la pared celular se observa degradación, por lo que esta prueba es una medición para percibir el estado de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 en muestras de la tierra y vuelo.

Figura 5: Comprobación de morfología de *Penicillium rubens* ATCC ® 28089 crecidas en agar PDA por 8 días por medio de la tinción azul de lactofenol en microscopio a 40 x.



Nota. Elaboración propia.

Se observa la estructura característica del conidioforo de *Penicillium* a 40 x con una tinción de azul de lactofenol.

Procedimiento Normado de Operación	Sop en Colaboración UVG con Space Biofilms, Páginas totales: 5.
Tratamiento de cupones de acero inoxidable con <i>Penicillium rubens</i> en PDA para visualización en el microscopio a fluorescencia	Autores: Patrizia Lupo y Alejandra Barrientos

1. Propósito

Observar los peroxisomas de *Penicillium rubens* .

2. Aplicaciones

En la Estación Espacial Internacional se ha detectado contaminación por *Penicillium rubens* en las superficies, atribuida a la llegada de los astronautas a este hábitat. Esta contaminación provoca problemas de degradación de materiales y un riesgo potencial de infecciones para los astronautas, por lo que los investigadores realizan un monitoreo continuo (Klintworth et al., 1999). Dado que especies como *Penicillium* se han adaptado al espacio, se llevan a cabo estudios morfológicos que analizan los cambios en los organelos, proporcionando información crucial para predecir el comportamiento de los hongos en condiciones de microgravedad (Zea et al., 2020). Entre estas técnicas de análisis se encuentra la inmunotinción, que utiliza anticuerpos para el marcaje de células diana y permite la visualización de organelos. Los tintes fluorescentes son los más empleados para el marcaje de estos compartimientos celulares (Lesli et al., 2005). Sin embargo, dado que las muestras a analizar a veces son tratadas con preservantes que debilitan la pared celular, la estandarización de la metodología es clave para permeabilizar adecuadamente la pared celular y bloquear proteínas celulares inespecíficas, asegurando así un marcaje preciso.

3. Referencias

- Klintworth, R., Reher, H. J., Viktorov, A. N., & Bohle, D. (1999). Biological induced corrosion of materials II: New test methods and experiences from Mir Station. *Acta Astronautica*, 44(7-12), 569-578. [https://doi.org/10.1016/s0094-5765\(99\)00069-7](https://doi.org/10.1016/s0094-5765(99)00069-7)
- Leslie M. (2005). Tagging an organelle. *The Journal of Cell Biology*, 171(2), 195. <https://doi.org/10.1083/jcb1712fta2>
- Zea, L., McLean, R. J. C., Rook, T. A., Angle, G., Carter, D. L., Delegard, A., Denvir, A., Gerlach, R., Gorti, S., McIlwaine, D., Nur, M., Peyton, B. M., Stewart, P. S., Sturman, P., & Velez Justiniano, Y. A. (2020). Potential biofilm control strategies for extended spaceflight missions. *Biofilm*, 2, 100026. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100026>

4. Terminología

Preservantes: soluciones que forman enlaces con proteínas de membrana y aminoácidos evitando la comunicación intercelular, manteniendo la estructura celular y morfología.

5. Documentos asociados

- *CL488-10594 protocolo para IF*. (s/f). Recuperado el 2 de agosto de 2022, de

- <https://www.ptglab.com/products/PEX14-Antibody-CL488-10594.htm>

6. Seguridad

- **Debe tomarse condiciones especiales en caso de:**

La preparación de las soluciones se necesita emplear una campana de extracción para evitar la exposición a gases tóxicos.

Preparar el anticuerpo para la inmunotinción y tintes fluorescentes requiere de oscuridad total.

Evitar la manipulación de reactivos y las muestras del proyecto al limitar el acceso al laboratorio.

- Aplicar prácticas estandarizadas siguiendo los rubros de:

No comer, beber, almacenar alimentos o fumar en el laboratorio.

Descontaminar las superficies de trabajo antes y después de su uso.

Desechar el material biológico de seguridad 1 en los contenedores para su eliminación adecuada.

Utilizar micropipetas con puntas descartables para asegurar el marcaje de la inmunotinción.

Control de la cepa de *Penicillium rubens* ATTC ®28089™ en un contenedor de bioseguridad nivel 1.

Usar equipo de protección (guantes de nitrilo y lentes protectores).

7. Equipo, materiales y reactivos

- **Equipo:**

Micropipetas de 1000, 100, 10 y 2 uL

Centrifuga.

Campana de extracción.

Plancha caliente con agitador.

Laminas de vidrio para microscopio.

8. Materiales/ cristalería:

Frasco de 250 mL.

Hazas desechables.

Tubos eppendorff 1.5 mL..

Tubos de vidrio estériles de 10 mL.

Papel aluminio.

Erlenmeyers de 250 mL.

Jeringas de 1.5 mL.

Filtros de 0.2 um de nylon.

Tubos de vidrio de 10 mL.

■ **Reactivos:**

PBS 1X.

Solución de leche descremada 0.3%.

Solución de 0.4% de Triton

Solución de glicerol al 15%

PFA 4%.

Medio PDB

8. Procedimiento

- Pasar 10 uL de las soluciones de los cupones de acero inoxidable con *Penicillium rubens* crecidos sobre medio PDB y preservados con PFA al 4% a láminas de vidrio para el microscopio, después dejar en la campana de extracción para su secado por 24 horas.
- Lavar 3 veces las láminas de vidrio previamente secadas con 10 uL de PBS al 1X teniendo cuidado de desprender las células fúngicas de la lámina.
- Incubar con 200 uL de Triton al 0.4% durante 5 minutos.
- Retirar el exceso de la solución previa y lavar 3 veces con la solución de PBS al 1X dejando que esté permanezca por 3 minutos.
- Incubar la muestra con 200 uL de la solución de 0.3% de leche descremada, durante 1 hora.
- Después de aspirar la solución de bloqueo, lentamente lavar con 200 uL de la solución de PBS al 1X.
- En completa oscuridad con ayuda de papel aluminio colocar 100 uL de QuantiFluor one dsDNA e incubar por una hora, al transcurrir el tiempo añadir el Anti PEX-14 conjugado con Coralite 488 y esperar otra hora.
- Colocar 2 uL de glicerol al 15% y un portaobjetos.
- Ver el resultado tomando en cuenta que el de QuantiFluor one dsDNA es un control negativo y se usa para ver núcleos empleando el filtro verde y el Anti PEX-14 se emplea para ver peroxisomas con el filtro azul.

9. Esterilización de material

Todas las soluciones deben ser autoclaveados a 121 ° C por 30 minutos, exceptuando el PBS 1X, la solución de conjugado con Coralite 488 que debe ser filtrado con filtros para jeringa de 0.20 um.

10. Cálculos

Se emplea la siguiente ecuación de diluciones para los cálculos de todas las soluciones a preparar:

$$(C1)(V1)=(C2)(V2)$$

Siendo:

C1: concentración inicial de la solución.

V1: volumen inicial de la solución.

C2: concentración final de la solución.

V1: volumen final de la solución.

■ Solución PBS 1X

A partir de una solución de PBS 8 X, se utilizó 31.25 mL de PBS a 8X con 218.75 mL de agua destilada para preparar 250 mL de PBS 1X.

Procedimiento:

A partir de la solución de PBS 8X se preparó bajo una campana de flujo laminar 250 mL de la solución de PBS 1X, se filtró con una jeringa de 1.5 mL un filtro de 0.2 μ m, para asegurar la esterilidad.

■ Solución de leche descremada 0.3 %.

Se colocaron 0.3 g de leche descremada en 10 mL de PBS 1X.

Procedimiento

Se mezcló homogéneamente 0.3 g de leche descremada con 10 mL de PBS 1x, después se filtró en un tubo de vidrio estéril de 10 mL con una jeringa de 1.5 mL usando un filtro de 0.2 μ m en una campana de flujo laminar, para asegurar la esterilidad.

■ Solución de 0.4 % de Trixton X-100

Se agregó 40 μ L de Trixton X-100 a una solución de 9960 μ L de PBS 1x, para tener 10 mL de solución de 0.4 % de Trixton X-100.

Procedimiento

Se mezcló 40 μ L de Trixton X-100 con un solución de 9960 μ L de PBS 1x en un tubo de vidrio estéril, bajo una campana de flujo laminar. Después se mezcló homogéneamente y se filtró en otro tubo de vidrio estéril de 10 mL con una jeringa de 1.5 mL empleando un filtro de 0.2 μ m, para asegurar la esterilidad.

■ Solución de glicerol al 15 %

Se agregó 1.5 mL de glicerol en 8.5 mL de PBS 1X.

Procedimiento

Se mezcló 1.5 mL de glicerol con 8.5 mL de PBS 1X en un tubo de vidrio de 10 mL, en una campana de flujo laminar. Después se mezcló homogéneamente y se filtró en otro tubo de vidrio estéril de 10 mL con una jeringa de 1.5 mL empleando un filtro de 0.2 um, para asegurar la esterilidad.

- Solución de PFA al 4%

Se agregó 4 mL de PFA al 16% en 6mL de PBS 1X, obteniendo 10 mL de PFA al 4%.

Procedimiento

Se mezcló bajo la campana de extracción 4 mL de PFA al 16% con 6 mL de PBS 1X usando un tubo de vidrio de 10 mL, después se mezcló homogéneamente y se filtró en otro tubo de vidrio estéril de 10 mL con una jeringa de 1.5 mL empleando un filtro de 0.2 um, para asegurar la esterilidad.

- Medio PDB

Se agregó 2.4 g a 100 mL de agua destilada.

Procedimiento

Se mezclaron los 2.4 g con los 100 mL de agua destilada y se calentó en una plancha térmica hasta que ebulló. Después se autoclaveo a 21 °C por 30 minutos, se guardó en la refrigeradora a 4 °C y se utilizó bajo campana de flujo laminar.

- Solución 1:200 Anti PEX14

Se agregó 4 uL de Anti PEX-14 en 796 uL de PBS 1X.

Procedimiento

En oscuridad y empleando papel aluminio se mezclaron 4 uL de Anti PEX-14 en 796 uL de PBS 1X y se mezcló homogéneamente.

11. Control de Calidad

- Verificar que los reactivos y las cepas mantengan la temperatura adecuada 4 ° C y -80 ° C .

Procedimiento Normado de Operación	Sop en Colaboración UVG con Space Biofilms , Páginas totales: 2.
Tratamiento de cupones de acero inoxidable con <i>Penicillium rubens</i> en PDA para visualización en el microscopio electrónico de barrido	Autores: Patrizia Lupo y Alejandra Barrientos

1. Propósito

Observar la topografía de la muestra del cupon de *Penicillium rubens* crecido sobre PDA **2. Aplicaciones**

La microscopia electrónica de barrido puede dar información acerca de la composición química y distribución del microorganismo en este caso en las condiciones de microgravedad (Joubert et.al, 2017). Está resulta ser de utilidad ya que puede relacionarse con las condiciones que enfrenta *Penicillium rubens* en microgravedad, una de las dificultades que representa la metodología es la dificultad de la amplificación de todos los segmentos del cupon, sin embargo, amplifica la imagen hasta 30,000 X.

3. Referencias

Joubert, L.-M., Ferreira, J. A., Stevens, D. A., Nazik, H., Cegelski, L. (2017). Visualization of *Aspergillus fumigatus* biofilms with Scanning Electron Microscopy and Variable Pressure-Scanning Electron Microscopy: A comparison of processing techniques. *Journal of Microbiological Methods*, 132, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.002>

4. Terminología

- Topografía: es la morfología superficial de las muestras.

5. Documentos asociados

- Minuti, A. E., Labusca, L., Herea, D.-D., Stoian, G., Chiriac, H., Lupu, N. (2023). A Simple Protocol for Sample Preparation for Scanning Electron Microscopic Imaging Allows Quick Screening of Nanomaterials Adhering to Cell Surface. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 430. <https://doi.org/10.3390/ijms24010430>

6. Seguridad

- **Debe tomarse condiciones especiales en caso de:**

Secar la muestra de los cupones en la campana de flujo laminar para evitar que el agua destruya la muestra durante el sellado al vacío previo a el bombardeo de electrones en el microscopio electrónico de barrido. No comer, beber, almacenar alimentos o fumar en el laboratorio.

Descontaminar las superficies de trabajo antes y después de su uso.

Desechar el material biológico de seguridad 1 en los contenedores para su eliminación adecuada.

Control de los cupones con *Penicillium rubens* ATTC $\text{\textcircled{R}}28089^{\text{TM}}$ en un contenedor de bioseguridad nivel 1 a 25 ° C.

Usar equipo de protección (guantes de nitrilo y lentes protectores).

7. Equipo, materiales y reactivos

■ Equipo:

- Denton Vacuum.
- Microscopio electrónico de barrido JSM-IT500.

■ Materiales:

- Cinta de carbón.

7.3. Reactivos:

- etanol al 70 %.

8. Procedimiento

Secar los cupones que tienen en su superficie PDA, Penicillium y PFA al 4% en campana de flujo laminar para su secado por 24 horas, éstas se resguardaron secas en una bolsa de limpiada con etanol por una semana.

Después de colocar la muestra en el porta muestras del microscopio electrónico de barrido se le coloca un baño con oro usando el equipo Denton Vacuum.

Se observa el cupón con el PDA sin el hongo, al igual que cupones para tener la línea base del material y del medio de cultivo con el material.

Se analizan las topografías de las muestras por segmentos implementando el análisis químico de Raman.

9. Esterilización de material

No aplica

10. Cálculos No aplica

11. Control de Calidad

- Verificar que las muestras previas al baño con oro esten secas.