
Efectos de la variación de medios de cultivo y superficies de crecimiento en las dimensiones de células planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa*, cultivadas en la Estación Espacial Internacional comparadas con células cultivadas en gravedad terrestre

Katherinne Herrera-Jordan



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Efectos de la variación de medios de cultivo y superficies de crecimiento en las dimensiones de células planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa*, cultivadas en la Estación Espacial Internacional comparadas con células cultivadas en gravedad terrestre

Trabajo de graduación presentado por Katherinne Herrera-Jordan para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,
2022

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

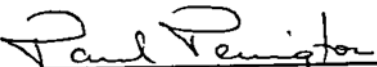


Efectos de la variación de medios de cultivo y superficies de crecimiento en las dimensiones de células planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa*, cultivadas en la Estación Espacial Internacional comparadas con células cultivadas en gravedad terrestre

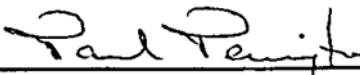
Trabajo de graduación presentado por Katherinne Herrera-Jordan para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

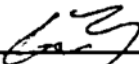
Guatemala,
2022

Vo.Bo.:

(f) 
Dra. Pamela Pennington

Tribunal Examinador:

(f) 
Dra. Pamela Pennington

(f) 
Dr. Luis Pedro Zea

(f) 
Dra. Dalia Lau

Fecha de aprobación: Guatemala, 14 de enero del 2022.

El presente trabajo de tesis surge gracias al proyecto "Space Biofilms", de BioServe Space Technologies. En dicho proyecto, se busca principalmente caracterizar los cambios que los biofilms bacterianos de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, sufren al ser cultivados en microgravedad, con poco oxígeno y en acompañamiento de diferentes materiales de interés industrial y médico.

La investigación aquí presentada es el resultado del trabajo realizado por la Dra. Pamela Pennington y el Dr. Luis Zea para generar oportunidades de investigación espacial en Guatemala y cooperaciones entre países e Instituciones. Este proyecto es resultado además, de años de esfuerzo y mentoría por parte del Dr. Luis Zea para aconsejar sobre el inicio de la investigación espacial en Guatemala. Desde la creación del primer simulador de microgravedad de bajo costo realizado por estudiantes de la Universidad del Valle de Guatemala (el Ing. Fredy España y mi persona), como trabajos en conjunto entre estudiantes y profesionales en BioServe Space Technologies. El proyecto sufrió retrasos debido a la pandemia y sin embargo, fue posible traer las muestras a Guatemala.

Dicho esto, agradezco al Ing. Fredy España por su apoyo en el proceso del desarrollo de tecnologías innovadoras para la realización de investigación de biología espacial en el país, ya que me acompañó no solamente como profesional, sino también como amigo durante mi proceso de crecimiento en el área espacial. Iualmente, agradezco a Pamela Flores, por todo el trabajo y esfuerzo empeñado en el desarrollo del proyecto, además de la ayuda con el análisis de los datos, los tutoriales y el apoyo.

Finalmente, agradezco a mi familia (tías, tío y abuelos) que me ha apoyado a lo largo de los años para lograr cumplir mis metas y sueños en el sector espacial. A mi mamá, Waleska Jordán por ser mi inspiración para entrar al mundo de la ciencia y también mi motor. A mi papá, Mario Vinicio Herrera por ser mi impulso para lograr mis sueños e inspirarme a ser mejor siempre. Y a mi hermano, Mario Herrera por apoyarme a lo largo de los años. También agradezco a mi mejor amigo y pareja, Andres Novales, por acompañarme y apoyarme en el camino de la licenciatura y el estrés de la tesis.

Prefacio	III
Lista de figuras	VII
Lista de cuadros	IX
Resumen	XI
1. Introducción	1
2. Justificación	4
3. Objetivos	5
3.1. Objetivo general	5
3.2. Objetivos específicos	5
4. Alcance	6
5. Marco teórico	7
5.1. Biofilms	7
5.2. Células planctónicas	8
5.3. Relación entre células planctónicas y biofilm	10
5.4. Importancia de <i>P. aeruginosa</i> en la Estación Espacial Internacional	10
5.5. Medios de cultivo	11
5.5.1. Luria Bertani suplementado con nitrato de potasio	11
5.5.2. mAUMg-high Pi	11
5.6. Materiales en la formación de biofilms	12
6. Metodología de desarrollo e investigación	13
6.1. Matriz de experimentación	13
6.2. Preparación PBS 0.01X	14
6.3. Preparación dilución	14
6.3.1. Preparación Agarosa al 2%	14
6.3.2. Preparación de muestra	15
6.4. Microscopía de contraste de fase	18
6.5. Uso de la cámara Moticam 10+	19
6.6. Medición de células con programa FIJI	19
6.6.1. Calibración del programa	19

6.6.2. Mediciones	19
6.7. Optimización de metodología	20
6.8. Análisis estadístico	20
6.8.1. Prueba de normalidad	20
6.8.2. Prueba de homogeneidad de varianzas	20
6.8.3. Comparación de medias	21
7. Resultados	22
7.1. Optimización del método	22
7.2. Mediciones	24
7.3. Comprobación de normalidad de datos	24
7.4. Comprobación de homogeneidad de varianzas	25
7.5. Estadísticos	25
7.5.1. Medio de cultivo LBK	26
7.5.2. Medio de cultivo mAUMg-high Pi	35
8. Conclusiones	44
9. Recomendaciones	45
10. Bibliografía	46
Referencias	46
11. Anexos	51
11.1. Pruebas de normalidad	51
11.1.1. Por grupos	51
11.1.2. Por réplica biológica: micro-g	55
11.1.3. Por réplica biológica: g-terrestre	56
11.2. Pruebas de Dunn	59

Lista de figuras

5.1. Cambios morfológicos de las células de <i>P. aeruginosa</i> al formar biofilms	8
5.2. Células planctónicas de <i>P. aeruginosa</i> de fijación lenta.	9
5.3. Células planctónicas de <i>P. aeruginosa</i> de fijación rápida.	9
6.1. Proceso de preparación de muestras previo al vuelo.	14
6.2. Proceso de preparación de muestras previo al vuelo.	15
7.1. Cuadrícula de calibración de la cámara Moticam10+ y su tamaño representativo. . .	22
7.2. Muestra de la obtención de píxeles por micrómetro para la calibración de mediciones con el software FIJI.	23
7.3. Muestra de proceso de medición de largo de células haciendo uso del software FIJI. .	23
7.4. Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en LBK en g-terrestre con los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS. Clave de significancia: valor-p<0.5 0.1 ".", 0.01 "**", 0.001 "***", 0.0001 "****".	26
7.5. Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en LBK en micro-g con los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS. Clave de significancia: valor-p<0.5 0.1 ".", 0.01 "**", 0.001 "***", 0.0001 "****".	27
7.6. Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en LBK en el primer día, con el material SS316, p-SS316 y MIT-LIS. Clave de significancia: valor-p<0.5 0.1 ".", 0.01 "**", 0.001 "***", 0.0001 "****".	28
7.7. Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en LBK en el segundo día, con el material SS316, p-SS316 y MIT-LIS. Clave de significancia: valor-p<0.5 0.1 ".", 0.01 "**", 0.001 "***", 0.0001 "****".	29
7.8. Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en LBK en el tercer día, con el material SS316, p-SS316 y MIT-LIS. Clave de significancia: valor-p<0.5 0.1 ".", 0.01 "**", 0.001 "***", 0.0001 "****".	29
7.9. Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en LBK en g-terrestre, utilizando los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS	32
7.10. Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en LBK en micro-g, utilizando los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS.	33
7.11. Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en LBK en micro-g y g-terrestre, utilizando los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS en el día 1	34
7.12. Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en LBK en micro-g y g-terrestre, utilizando los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS en el segundo día. . .	35
7.13. Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en LBK en micro-g y g-terrestre, utilizando los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS en el tercer día. . . .	35

7.14. Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre y micro-g, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP. . .	36
7.15. Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en micro-g y g-terrestre, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP. . .	37
7.16. Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre y micro-g, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP en el primer día.	38
7.17. Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre y micro-g, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP en el segundo día.	38
7.18. Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre y micro-g, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP en el tercer día.	39
7.19. Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP. . .	40
7.20. Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en micro-g, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP.	41
7.21. Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP, en el primer día.	41
7.22. Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP, en el segundo día.	42
7.23. Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP, en el segundo día.	42

Lista de cuadros

6.1. Matriz de experimentación en micro-g y g-terrestre	15
6.1. Matriz de experimentación en micro-g y g-terrestre	16
6.1. Matriz de experimentación en micro-g y g-terrestre	17
6.1. Matriz de experimentación en micro-g y g-terrestre	18
7.1. Muestras de prueba medidas con células de optimización.	24
7.2. Prueba de Kruskal-Wallis, todos los grupos de datos tienen por lo menos un tratamiento cuya media no es igual a la media del resto de tratamientos.	26
11.1. Todos los datos del GAP 1 en micro-g, mostraron distribución normal.	51
11.2. Todos los datos del GAP 2 en micro-g, mostraron distribución normal.	51
11.2. Todos los datos del GAP 2 en micro-g, mostraron distribución normal.	52
11.3. Todos los datos del GAP 3 en micro-g, mostraron distribución normal.	52
11.4. Todos los datos del GAP 7 en micro-g, mostraron distribución normal.	52
11.4. Todos los datos del GAP 7 en micro-g, mostraron distribución normal.	53
11.5. Todos los datos del GAP 8 en micro-g, mostraron distribución normal.	53
11.6. Todos los datos del GAP 9 en micro-g, mostraron distribución normal.	53
11.7. Todos los datos del GAP 13 en micro-g, mostraron distribución normal.	54
11.8. Todos los datos del GAP 14 en micro-g, mostraron distribución normal.	54
11.9. Todos los datos del GAP 15 en micro-g, mostraron distribución normal.	54
11.9. Todos los datos del GAP 15 en micro-g, mostraron distribución normal.	55
11.10. Todos los datos de cada tratamiento en micro-g, obtenidos de las réplicas biológicas, mostraron distribución normal.	55
11.10. Todos los datos de cada tratamiento en micro-g, obtenidos de las réplicas biológicas, mostraron distribución normal.	56
11.11. Todos los datos del GAP 1 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	56
11.12. Todos los datos del GAP 2 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	56
11.13. Todos los datos del GAP 3 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	57
11.14. Todos los datos del GAP 7 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	57
11.15. Todos los datos del GAP 8 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	57
11.15. Todos los datos del GAP 8 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	58
11.16. Todos los datos del GAP 9 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	58
11.17. Todos los datos del GAP 13 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	58
11.17. Todos los datos del GAP 13 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	59
11.18. Todos los datos del GAP 14 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	59
11.19. Todos los datos del GAP 15 en g-terrestre, mostraron distribución normal.	59
11.20. Análisis de Dunn del largo celular en el grupo de cultivos en LBK en g-terrestre	60

11.21Análisis de Dunn del diámetro celular en el grupo de cultivos en LBK en g-terrestre	60
11.21Análisis de Dunn del diámetro celular en el grupo de cultivos en LBK en g-terrestre	61
11.22Análisis de Dunn del largo celular en el grupo de cultivos en LBK en micro-g	61
11.22Análisis de Dunn del largo celular en el grupo de cultivos en LBK en micro-g	62
11.23Análisis de Dunn del largo celular en el grupo de cultivos en LBK en micro-g	62
11.23Análisis de Dunn del largo celular en el grupo de cultivos en LBK en micro-g	63
11.24Cambios en el largo celular en el Día 1 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK	63
11.25Cambios en el diámetro celular en el Día 1 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK	63
11.25Cambios en el diámetro celular en el Día 1 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK	64
11.26Cambios en el largo celular en el Día 2 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK	64
11.27Cambios en el diámetro celular en el Día 2 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK	64
11.28Cambios en el largo celular en el Día 3 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK	65
11.29Cambios en el diámetro celular en el Día 3 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK	65
11.30Cambios en el largo celular en medio mAUMg-high Pi en g-terrestre	65
11.30Cambios en el largo celular en medio mAUMg-high Pi en g-terrestre	66
11.31Cambios en el diámetro celular en medio mAUMg-high Pi en g-terrestre	66
11.31Cambios en el diámetro celular en medio mAUMg-high Pi en g-terrestre	67
11.32Cambios en el largo celular en medio mAUMg-high Pi en micro-g	67
11.32Cambios en el largo celular en medio mAUMg-high Pi en micro-g	68
11.33Cambios en el diámetro celular en medio mAUMg-high Pi en micro-g	68
11.33Cambios en el diámetro celular en medio mAUMg-high Pi en micro-g	69
11.34Cambios en el largo celular en el Día 1 en las dos gravedades y los 3 materiales usadoscon mAUMg-high Pi	69
11.35Cambios en el diámetro celular en el Día 1 en las dos gravedades y los 3 materiales usadoscon mAUMg-high Pi	69
11.36Cambios en el largo celular en el Día 2 en las dos gravedades y los 3 materiales usadoscon mAUMg-high Pi	70
11.37Cambios en el diámetro celular en el Día 2 en las dos gravedades y los 3 materiales usadoscon mAUMg-high Pi	70
11.38Cambios en el largo celular en el Día 3 en las dos gravedades y los 3 materiales usadoscon mAUMg-high Pi	70
11.38Cambios en el largo celular en el Día 3 en las dos gravedades y los 3 materiales usadoscon mAUMg-high Pi	71
11.39Cambios en el diámetro celular en el Día 3 en las dos gravedades y los 3 materiales usadoscon mAUMg-high Pi	71

Resumen

Los biofilms son de gran importancia en ambientes tanto médicos, como industriales pero, ¿qué sucede en ambientes espaciales? En la Estación Espacial Internacional (EEI), los biofilms son un gran riesgo para los astronautas, siendo capaces de causar graves enfermedades y además, deteriorar los materiales que la conforman. Las células planctónicas, por su lado, son un riesgo igualmente importante debido a que son células precursoras de biofilms, además de obtener características de resistencia, virulencia y patogenicidad, dependiendo de estresores como falta de oxígeno, de nutrientes o incluso, cambios en la gravedad. Se han propuesto algunas soluciones para el problema de los biofilms, desde el uso de materiales que recubren las superficies, hasta cambios en características o topografía de los sólidos. Teniendo estas soluciones en cuenta, un equipo de BioServe Space Technologies realizó el proyecto de Space Biofilms, para el análisis de la masa, grosor, morfología y cambios genéticos de los biofilms, en cada día de cultivo y agregando cupones de diferentes materiales al medio. Las muestras fueron cultivadas en gravedad terrestre (g-terrestre) y microgravedad (micro-g) en la EEI, con el fin de entender si la dinámica de crecimiento cambia según la gravedad. Se utilizaron materiales de interés industrial, como lo son el acero inoxidable (SS316), el acero inoxidable pasivado (p-SS316) y también un material creado por un equipo del MIT impregnado con Lubricante (MIT-LIS). Para estos cultivos, se utilizó el medio de cultivo de Luria Bertani suplementado con nitrato de potasio como último receptor de electrones. Por otro lado, se hicieron cultivos con materiales de interés médico como lo son una membrana de celulosa (Cell memb), Silicona de nivel catéter (Silicone) y Silicona de nivel catéter con patrones de interferencia de láser directos (Silicone-DLIP). Estos materiales de interés médico se pusieron a prueba utilizando el medio de cultivo mAUMg-high Pi, que es un medio modificado de orina artificial suplementado con glucosa y alto en fosfatos.

Para el proyecto de Space Biofilms, se analizó el biofilm resultante en cada material presente en los cultivos. Luego de extraer el material de interés de cada cultivo, se obtuvo un medio líquido con células únicamente en su forma planctónica, las cuales fueron enviadas a la Universidad del Valle de Guatemala (UVG), con el fin de obtener información sobre las dinámicas del crecimiento de las células de vida libre, en estas condiciones. Debido a los reportes sobre cambios dimensionales en células planctónicas como respuesta a estrés ambiental (uno de estos, vuelo espacial), se analizó los cambios en el largo y diámetro celular, de las células planctónicas obtenidas del sobrenadante anteriormente mencionado. Estas medidas fueron obtenidas por medio del uso de microscopía de contraste de fases, una cámara digital Moticam 10+ y el programa de análisis FIJI. Además, se hicieron comparaciones estadísticas para identificar qué tratamientos causaron diferencias en las dimensiones celulares, por medio de pruebas de Kruskal-Wallis y de Dunn. Los análisis de estos cambios, pueden ser indicadores de exposición a diferentes tipos de estrés, así como también pueden

ser indicadores del momento de vida de la bacteria. Esta investigación podría ayudar a entender las dinámicas de crecimiento de *P. aeruginosa* en condiciones espaciales, además de aportar al entendimiento de la relación entre el largo y diámetro celular, y su entorno.

Finalmente, se logró encontrar que sí existe una diferencia significativa entre cultivos de células planctónicas con diferentes materiales, ya sea en gravedad terrestre como en microgravedad. Además, el largo y diámetro celular cambia respecto a los días del cultivo y también respecto a la gravedad. Se encontró una tendencia a tener un mayor largo y diámetro celular en cultivos en gravedad terrestre y una posible dinámica celular distinta, que pudo ser causada por el medio de cultivo utilizado.

Abstract

Biofilms are of great importance in both medical and industrial environments, but what happens in space environments? In the International Space Station (ISS), biofilms are a great risk for astronauts, being capable of causing serious illnesses and also deteriorate the materials that make it up. Planktonic cells, on the other hand, are an equally important risk because they are precursor cells of biofilms, in addition to having characteristics of resistance, virulence and pathogenicity, depending on stressors such as lack of oxygen, nutrients or even changes in the gravity. Some solutions have been proposed for the problem of biofilms, from the use of materials that cover the surfaces, to changes in the characteristics or topography of the solids. Taking these solutions into account, a team from BioServe Space Technologies carried out the Space Biofilms project, for the analysis of the mass, thickness, morphology and genetic changes of the biofilms, on each day of culture and adding coupons made up of different materials to the medium. The samples were grown in Earth gravity (Earth-g) and microgravity (micro-g) on the ISS, in order to understand whether growth dynamics change with gravity. Materials of industrial interest were used, such as stainless steel (SS316), passivated stainless steel (p-SS316) and also a material created by an MIT team impregnated with Lubricant (MIT-LIS). For these cultures, they used a Luria Bertani culture medium supplemented with potassium nitrate was used as the last electron acceptor. On the other hand, cultures were made with materials of medical interest such as a cellulose membrane (Cell memb), catheter-level silicone (Silicone) and catheter-level silicone with direct laser interference patterns (Silicone-DLIP). These materials of medical interest were tested using the culture medium mAUMg-high Pi, which is a modified artificial urine medium supplemented with glucose and high in phosphates.

For the Space Biofilms project, the resulting biofilm was analyzed on each material present in the cultures. After extracting the material of interest from each culture, a liquid medium was obtained with cells only in their planktonic form, which were sent to the Universidad del Valle de Guatemala (UVG), in order to obtain information on the dynamics of growth of these free-living cells under these conditions. Due to reports on dimensional changes in planktonic cells in response to environmental stress (one of these, space flight), changes in cell length and diameter of planktonic cells obtained from the aforementioned supernatant were analyzed. These measurements were obtained through the use of phase contrast microscopy, a Moticam 10+ digital camera and the FIJI analysis program. In addition, statistical comparisons were made to identify which treatments caused significant differences in cell dimensions, using the Kruskal-Wallis and Dunn tests. The analysis of these changes can be indicators of exposure to different types of stress, as well as the life phase of the bacteria. This research could help understand the growth dynamics of *P. aeruginosa* under spaceflight conditions, in addition to contributing to the understanding of the relationship between cell length and diameter, and its environment.

Finally, it was found that there is a significant difference between planktonic cell cultures with different materials, both in terrestrial gravity and in microgravity. In addition, there was a cell length and diameter change with respect to the days of culture and also with respect to gravity. A tendency to have a greater cell length and diameter was found in cultures in Earth gravity and a possible difference on cell dynamics, which could be caused by the culture medium used.

Las células bacterianas pueden encontrarse de diferentes formas en la naturaleza, sin embargo y a grandes rasgos, se pueden separar en dos formas: las células bacterianas de libre flotación y suspendidas en un medio, conocidas como células planctónicas; y las células de bacterias sésiles, creciendo en colonias simples, y las células creciendo en comunidades complejas conocidas como biofilms. Las células en forma de biofilms, existen de forma predominante en la naturaleza. Estas forman una matriz extracelular de sustancias poliméricas (EPS, por sus siglas en inglés), la cual provee a las comunidades celulares de competencia microbiana, comunicación e incluso, colaboración. Esta matriz celular ayuda a que las células involucradas en la formación y sustento del biofilm, tengan mayor eficiencia metabólica, cooperen en el aspecto fisiológico y, además, tengan mejor adaptabilidad a estreses ambientales, a comparación de sus contrapartes planctónicas (Chew y Yang, 2016). Estos biofilms se forman luego de que las células se adhieren a superficies bióticas o abióticas y es por eso que forman una fuente de interés tanto industrial como médico. (samuel, 2020)

El biofilm se encuentra en condiciones médicas como la periodontitis, osteomielitis, prostatitis, otitis media y neumonía (Sanclement, Webster, Thomas, y Ramadan, 2005). Otros estudios han encontrado bacterias en forma de biofilm en 85 % de los pacientes con sinusitis crónica que acuden a cirugía (Sanclement y cols., 2005). Esto hace que la importancia de los biofilms a nivel médico sea grande, lo cual no solamente aplica para condiciones terrestres, sino también para condiciones espaciales. En el 2019, una revisión realizada por Diaz, Li, Irwin y Calle del Centro espacial de Kennedy de NASA, los autores recaudaron información sobre lo investigado sobre los biofilms, durante los últimos años. En dicha revisión mencionan que, por el momento, la formación de biofilms afecta más al hardware de las naves y de la estación, que a los astronautas (Diaz, Li, Calle, Callahan, y Irwin, 2019). Sin embargo, también comentan que esto puede cambiar con la llegada de vuelos espaciales con tiempos más largos, al unirse con el detrimento de la salud de los astronautas. Se ha encontrado que problemas dentro del ensamblaje para procesamiento de agua en la EEI, son causados por biofilms (Weir y cols., 2012). Debido a esto, muchos estudios de caracterización de las especies presentes en estos biofilms se han realizado y se han buscado también soluciones posibles para intentar disminuir las amenazas que estos presentan en los materiales presentes en la EEI.

En biofilms, las densidades celulares son normalmente más altas que las densidades celulares de cultivos planctónicos (Prigent-Combaret, Vidal, Dorel, y Lejeune, 1999), lo que provoca crecimientos distintos en ambos tipos de células. Las células en biofilms pueden encontrarse con limitantes de oxígeno y nutrientes, así como con otros problemas relacionados a una mayor concentración de productos de desecho, lo cual va a cambiar la expresión genética que estas células tienen. Por otro

lado, las células sésiles no se enfrentan a estos problemas, lo que causa que la expresión genética de estas sean distintas a las de las células dentro de biofilms (Sauer, Camper, Ehrlich, Costerton, y Davies, 2002; Schuster, Hawkins, Harwood, y Greenberg, 2004; Xu, Stewart, Xia, Huang, y McFeters, 1998; Parsek y Greenberg, 2005). Algunos de estos cambios genotípicos pueden verse reflejados en cambios fenotípicos y de expresión proteica. Sauer et al. (Sauer y cols., 2002), usaron a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* como organismo modelo para describir los cambios de las células durante su crecimiento, demostrando que las células pasan por cinco fases distintas durante su proceso de formación de biofilms. Cada una de estas fases cuenta con un patrón distinto de expresión proteica y cambios fenotípicos observables, siendo la motilidad la principal diferencia entre células planctónicas y células en las siguientes fases de formación de biofilms (Sauer y cols., 2002). Además de esto, cambios en la longitud y diámetro celular pueden ser indicadores de condiciones de cultivo adversas, como por ejemplo, la privación de nutrientes entre otras cosas (Steinberger, Allen, Hansma, y Holden, 2002).

Las células planctónicas, por su lado, son células que mantienen un ciclo de vida bastante conocido. Tienen un crecimiento definido, normalmente caracterizado por una fase lag, donde las células se acoplan a las condiciones en las cuales están siendo cultivadas. Luego de esto, las células planctónicas entran en una fase log, donde crecen de manera exponencial y son capaces de aumentar su cantidad enormemente. Luego de esto, las células se mantienen en una fase estacionaria, donde tienen una tasa de replicación y muerte estable, por lo que el número de células viables se mantiene. Al finalizar su ciclo de vida, los cultivos de células suelen entrar en un proceso de muerte celular, donde la densidad final celular disminuye (Wang, Fan, Chen, y Terentjev, 2015). Estas células de vida libre son precursoras de biofilms, ya que por medio de procesos moleculares de cambio de expresión proteica, se obtienen diferentes fenotipos celulares que comienzan con la formación de células sésiles ya sean parte de biofilms o parte de colonias (Mikkelsen, Duck, Lilley, y Welch, 2007; Nigaud y cols., 2010). Debido a esto, estudiarlas es de suma importancia para lograr entender las razones por las cuales se puede llegar a promover la formación de biofilms y con este conocimiento, evitar estas razones y prevenir una formación de biofilms.

No obstante, los biofilms adquieren mayor interés aún, debido al efecto corrosivo que tienen en algunas superficies de uso industrial. En 1998, un estudio exploratorio mostró que poblaciones naturalmente mixtas de microorganismos podían colonizar superficies de poliimidadas de aislamiento (un material de revestimiento), FRPC, cable e incluso titanio. Debido a esto, aconsejaban el uso de biocidas para poder contrarrestar la presencia de algunos de estos microorganismos (Gu, Roman, Esselman, y Mitchell, 1998). Esta necesidad por estudiar los biofilms es aún mayor en el área de las ciencias y la industria espacial. En el espacio, una de las notables condiciones que se tienen que enfrentar, es la microgravedad. Por otro lado, un estudio del 2018 estudió -sin éxito- la posible aplicación de bio-surfactantes, peróxido de hidrógeno y materiales previamente tratados con sílica y una capa de plata, para evitar el crecimiento de biofilms en diferentes superficies de la EEI (Perrin y cols., 2018). Recientemente (2020), se publicó una revisión mencionando las posibles estrategias para control de biofilms en misiones de vuelo espacial de larga duración (Zea y cols., 2020). En esta revisión, algunas estrategias mencionadas para evitar la formación de biofilms, son el uso de biocidas, el uso de revestimientos y el uso de radiación ionizante. Una de estas soluciones es propuesta para su investigación: El uso de un revestimiento, a través de una superficie impregnada con lubricante (LIS, por sus iniciales en inglés). Este revestimiento sería utilizado en un material específico del MIT y tiene importancia ya que al incorporar el método de LIS, se está tomando en cuenta tanto el realizar cambios en la estructura fina de la superficie, así como también reduce la adhesión inicial de los microorganismos y causa interferencia en la motilidad celular (Goodband, Armstrong, Kusumaatmaja, y Voitchovsky, 2020). Este método ha demostrado resultados promisorios en la prevención de la formación de biofilms y, por lo tanto, hace de suma importancia también entender cómo este revestimiento puede llegar a afectar a las células planctónicas. Además del uso de LIS, en Space Biofilms se utilizan otros métodos los cuales pueden causar un cambio en la dinámica de crecimiento de las células de *P. aeruginosa*. Uno de estos métodos es la pasivación de acero inoxidable y además el cambio de topografía de una silicona (Silicone) a causa de Patrones de interferencia de

láser directos. Estos procesos serán explicados de manera más profunda en la sección de marco teórico.

En el proyecto de Space Biofilms, del cual proviene la presente tesis, se planea estudiar los cambios en expresión, grosor y morfología de los biofilms formados por *P. aeruginosa*, al ser cultivados con diferentes materiales de interés industrial o interés médico, ya sea en condiciones de gravedad terrestre (g-terrestre) o en condiciones de microgravedad (micro-g). Este proyecto utiliza cristalería de BioServe Space Technologies, comenzando por los Fluid Processig Apparatus (PFA), en los cuales se contenía el cultivo, y también los Group Activation Packs (GAPs), que contenían 8 FPAs cada uno. En cuanto a los materiales, se utilizaron unos de interés industrial, que fueron tres tipos de cupones en lmedio de cultivo de Luria Bertani, suplementado con nitrato de potasio como último acceptor de electrones: 1) Acero inoxidable, 2) Acero inoxidable pasivado y 3) MIT-LIS. En el caso de los materiales de interés médico, el cultivo se hace en un medio de cultivo de mAUMg-high Pi, acompañado de los siguientes tres materiales: 1) Silicona, 2) Silicona DLIP y 3) Membrana de celulosa. Los cultivos, además, se realizaron en condiciones anaeróbicas. En el presente trabajo, no se hace el análisis objetivo del proyecto Space Biofilms, sino uno complementario, buscando comprender las dinámicas de crecimiento de las células planctónicas de *P. aeruginosa*, encontradas en el medio líquido y sobrenadante de este proyecto.

Este trabajo de graduación buscó determinar las diferencias dimensionales de *P. aeruginosa* en su forma planctónica, cultivadas en estos diferentes medios de cultivo, con estos diferentes cupones y además, en estas diferentes constantes gravitacionales. Se espera que el estudio ayude a comprender de mejor manera las posibles causas de estos cambios, además de ayudar a determinar la diferencia en las células de vida libre presentes en estos distintos materiales.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria normalmente estudiada por su actividad patogénica, su persistencia predominante en ambientes clínicos y el potencial peligro que representan sus resistentes biofilms. A pesar de que las células se encuentran mayoritariamente en forma de biofilm en la naturaleza, el entendimiento de las características genéticas, fisiológicas y morfológicas no han sido tan exploradas a comparación de sus contrapartes de vida libre (Karunakaran, Mukherjee, Ramalingam, y Biggs, 2011). Las células planctónicas han tenido también atención por parte de la comunidad científica ya que estas células son precursoras de biofilms y son algunos cambios en la activación de algunos genes, los que provocan el cambio de las células planctónicas a células fijadas a una superficie y precursoras de biofilms. Debido a esto, estudios como sobre genes de interés en células planctónicas se han desarrollado tanto en microgravedad real como en microgravedad simulada. Un estudio en microgravedad simulada demostró que el ambiente de este tipo induce cambios en la transcriptómica y la fisiología de las células relacionadas con la virulencia de *P. aeruginosa* (Crabbé y cols., 2010). Junto a esto, otros cambios relacionados a la sobreexpresión de otros genes de resistencia al estrés ambiental han sido estudiados (Crabbé y cols., 2010).

Por otro lado, el estudio de las células planctónicas en microgravedad ha generado algunos datos: La densidad de crecimiento celular de células planctónicas se ha estudiado en condiciones de gravedades reducidas simuladas. Ganguly (2018) describió en su trabajo de tesis una mayor densidad óptica de células planctónicas en condiciones de microgravedad simulada, a comparación de la densidad óptica de crecimiento celular en condiciones de gravedad normal (BSBE, 2018). Además de esto, se han realizado estudios sobre el largo celular a través del ciclo de vida de las células planctónicas, además de su largo y diámetro en situaciones espaciales (Fajardo-Cavazos y Nicholson, 2021), de poca disponibilidad de oxígeno (Yoon, Lee, Park, y Yoon, 2011) o de poca disponibilidad de nutrientes (Steinberger y cols., 2002), lo que nos ayuda a tener una idea de la posible causa de los cambios dimensionales, de las células observadas en el presente estudio.

Este trabajo de tesis busca caracterizar estos cambios en dimensiones, morfología y densidad celular comparando cultivos de *P. aeruginosa* en condiciones de microgravedad en la EEI y en condiciones de gravedad terrestre. Además de esta variable con dos condiciones, se estudian los efectos que tiene el crecimiento de biofilms en diferentes materiales con distintas características, en las dimensiones y morfología de las células planctónicas presentes en el cultivo. Finalmente, se discuten también los efectos de diferentes medios de cultivo en los cambios anteriormente mencionados, en las células planctónicas.

3.1. Objetivo general

Determinar los cambios en largo y ancho de las células planctónicas cultivadas en microgravedad con materiales de distintas características y distintos medios de cultivo, por medio de microscopía de contraste de fase, comparándolas con células cultivadas bajo las mismas condiciones, en gravedad terrestre.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa en el diámetro y largo de células planctónicas de *P. aeruginosa* cultivadas en microgravedad en diferentes sustratos, por medio de imágenes de microscopía de contraste de fase y el programa de análisis de imagen FIJI.
- Determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa en el diámetro y largo de células planctónicas de *P. aeruginosa* cultivadas en gravedad terrestre en diferentes sustratos, por medio de imágenes de microscopía de contraste de fase y el programa de análisis de imagen FIJI.
- Determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa en el diámetro y largo de células planctónicas de *P. aeruginosa* cultivadas en microgravedad en diferentes sustratos, comparado con células en las mismas condiciones cultivadas en gravedad terrestre, por medio de imágenes de microscopía de contraste de fase y el programa de análisis de imagen FIJI.
- Determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa en el diámetro y largo de células planctónicas de *P. aeruginosa* cultivadas en diferentes días de cultivo, diferentes materiales y gravedades, por medio de imágenes de microscopía de contraste de fase y el programa de análisis de imagen FIJI.

Las muestras de *P. aeruginosa* cultivadas en la EEI y sus respectivos controles cultivados bajo las mismas condiciones en Tierra, se encuentran actualmente en la Universidad del Valle de Guatemala. Las muestras fueron preparadas en duplicado por lo que se cuenta con suficientes muestras procesables. De la misma manera, en la UVG se cuenta con los equipos de microscopía de contraste de fase y de campo claro necesarios para la metodología utilizada para el proyecto de tesis.

Para la presente investigación se cuenta además con datos complementarios obtenidos por el grupo de Space Biofilms de la Universidad de Colorado Boulder, los cuales agregan valor a la investigación de cambios de dimensión y morfología, además de dar un primer acercamiento a los parámetros de interés.

Con toda la información obtenida, la presente esta primera investigación de microbiología espacial en Guatemala, abre camino al uso de las muestras cultivadas en la EEI y también da paso a la promoción de las ciencias espaciales en el país. En cuanto a la información como tal, brinda una mejor comprensión de las células planctónicas y su comportamiento dependiente de la disponibilidad de distintos nutrientes, además de la interacción que las diferentes topologías de las superficies tienen con el comportamiento y desarrollo de las células.

5.1. Biofilms

A pesar de que los iniciales estudios bacterianos se realizaban principalmente con bacterias aisladas de la naturaleza, por mucho tiempo se estudiaron las células solas o más bien, de forma planctónica. No obstante, desde hace más de 150 años, los científicos que comenzaron a investigar cómo es que las bacterias crecen en la naturaleza, por medio de su adhesión a superficies, se dieron cuenta que la forma de vida en biofilms es más común en los ecosistemas reales (Costerton, 1999).

Luego de muchos años de estudio, entendemos finalmente de mejor manera a los biofilms. Dentro del biofilm, se han encontrado diferentes variantes morfológicas tanto a causa de diferentes antibióticos (Spalding, Keen, Smith, Krachler, y Jabbari, 2018), así como a causa de distintas resistencias a antibióticos (Spoering y Lewis, 2001). Se sabe que el ciclo de vida de una célula bacteriana formadora de biofilm tiene una serie de pasos que se repiten. Necesariamente, el proceso de vida debe de comenzar con la adhesión de la bacteria a una superficie y proseguir con la formación de la matriz (Costerton, 1999).

P. aeruginosa es un organismo modelo de gran importancia para el estudio de los biofilms generados por bacterias Gram-negativo. No obstante, mucha información hace falta aún por investigar y llegar a entender completamente el comportamiento de estas bacterias y las bases moleculares de la formación de los biofilms (Caiazza, Merritt, Brothers, y O'Toole, 2007). Se sabe que *P. aeruginosa* pasa por bastantes cambios morfológicos al estar en el proceso de formación de biofilms: 1) Adhesión reversible, 2) Adhesión irreversible, 3) Maduración-1, 4) Maduración-2 y 5) Dispersión. Dichos cambios mencionados anteriormente son observables según se ve en la Figura 5.1 del presente documento. Según una investigación sobre los fenotipos múltiples por los que atraviesan las células de *P. aeruginosa* durante la formación del Biofilm, las células planctónicas pasan a ser sésiles (adheridas a la superficie) con un giro al axis polar y una unión del flagelo a la superficie. Con esto, la célula pasa de ser motil a no motil y la concentración de células por centímetro cuadrado, aumenta (Sauer y cols., 2002). Estos cambios morfológicos son observables en la Figura 4.1 (extraída de Steinberger y cols., 2002), donde se observa que la imagen A tiene una cantidad de células planctónicas donde hay un porcentaje de las mismas que tienen su axis adherido a la superficie. Luego de esto, en la imagen B se puede observar que comienza una agrupación celular alrededor de las células mencionadas y de la imagen C a F, es posible observar el comienzo de la formación de la matriz que forma el biofilm.

Por otro lado, se ha demostrado que existen cambios morfológicos en las células de *P. aeruginosa*

dentro del biofilm, cuando crecen en distintas condiciones ambientales. Con desbalances nutricionales en carbono o nitrógeno, baja disponibilidad de carbón, o incluso un camino de mayor difusión de nutrientes, se observó un alargamiento de la célula mientras se mantiene el grosor. Según Steinberger, Allen, Hansma y Holden, esto puede deberse a la búsqueda de las bacterias de aumentar el área de superficie que esté en contacto con el medio, para aumentar la cantidad de nutrientes a los que pueden tener alcance (Steinberger y cols., 2002).

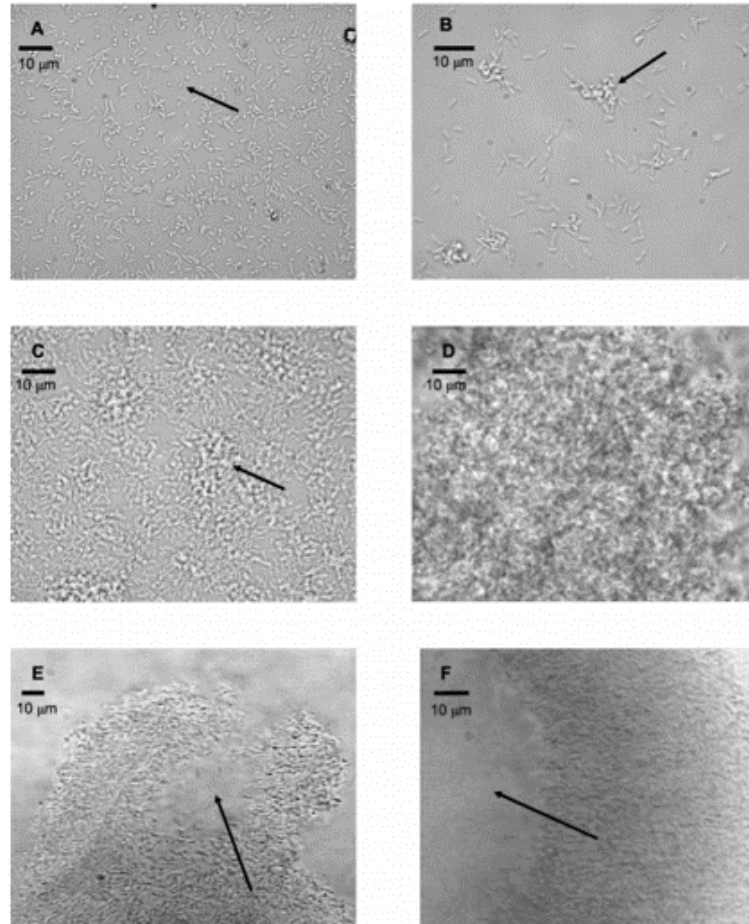


Figura 5.1: Cambios morfológicos de las células de *P. aeruginosa* al formar biofilms

5.2. Células planctónicas

A pesar de que estos cambios morfológicos en células de biofilms están investigados en células dentro de biofilms, en células planctónicas, estos cambios no están tan bien estudiados. En el caso de las células planctónicas de *P. aeruginosa*, se han hecho observaciones sobre el fitness celular y algunos cambios fenotípicos; más específicamente, cambios fenotípicos en células bajo condiciones planctónicas (Grekov, Thöming, Kordes, y Häussler, 2021). Se ha demostrado que estos cambios fenotípicos se dan principalmente en la membrana celular, en conjunto con ajustes finos de equilibrio entre los estilos de vida de las células planctónicas de rápido crecimiento y los estilos de vida de las células sésiles.

Más adelante, se hicieron investigaciones que probaron que estos efectos directos en la membrana se dan debido a que la membrana es la que genera permeabilidad para permitir el paso de c-di-GMP.

El c-di-GMP se genera como respuesta a diferente estrés ambiental (Chua y cols., 2015). Según otros autores, se ha determinado que la cascada regulatoria de Gax/Rsm es un jugador clave en la forma de vida de *P. aeruginosa* en la flexibilidad de la virulencia durante la infección y también la formación de biofilms (Valentini, Gonzalez, Mavridou, y Filloux, 2018). Entonces, además de el c-di-GMP, otras cascadas como Gax/Rsm, juegan también un papel importante en el ciclo de vida de *P. aeruginosa* y su transición entre bacterias planctónicas y bacterias sésiles.

En el caso de las bacterias planctónicas, se ha creído que las bacterias en crecimiento y bien mezcladas, deben tener fisiológica y fenotípicamente, una forma uniforme y distinta de sus formas idénticas vivientes en biofilm. Sin embargo, un estudio demostró que las células planctónicas de *P. aeruginosa* se diferencian morfológicamente al estar unidas a diferentes superficies, incluso en su momento de crecimiento exponencial. Las células planctónicas se diferencian según si se pueden unir rápidamente o de forma lenta, a distintas superficies. Además, este cambio viene de la mano con una producción diferencial de Psl y también se da un cambio de la expresión de RsmYZ/RsmA. A pesar de que no se menciona en la presente investigación (debido a que no era el principal enfoque de la misma), en literatura se reportan diferencias en largo y ancho de las células dependiendo de si son células planctónicas de lenta o rápida fijación. Siendo que las células con lenta fijación tienden a ser más cortas, mientras que las células de rápida fijación, tienden a ser más largas. Esto es debido a la capacidad mótil que se mantiene en las células de lenta fijación, que no se mantiene en las células de rápida fijación (S. Yang y cols., 2018).

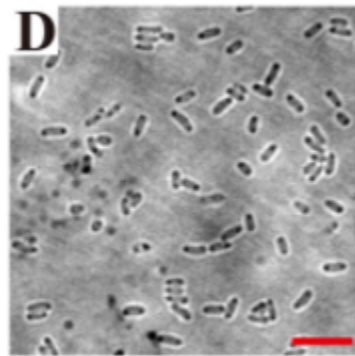


Figura 5.2: Células planctónicas de *P. aeruginosa* de fijación lenta.

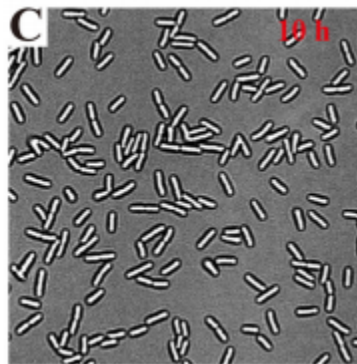


Figura 5.3: Células planctónicas de *P. aeruginosa* de fijación rápida.

Estos cambios anteriormente mencionados son observables en las figuras 4.2 y 4.3 (extraídas de Yang, 2018), donde las células de la Figura 4.2 son más cortas que las de la Figura 4.3. No obstante, investigaciones directas de comprobación estadística de los cambios morfológicos de las células, no se han realizado aún. Es por eso que es importante realizar investigaciones que soporten los cambios

morfológicos de las mismas.

Curiosamente, también existe una diferencia morfológica en las células planctónicas en su fase estacionaria y en las células planctónicas en su fase logarítmica, siendo las células en su fase estacionaria, más pequeñas en largo y diámetro a comparación de las células en su fase logarítmica. Esta diferencia en largo se ha descrito por Yoon, Lee, Park y Sun (2011), quienes mencionan que durante el crecimiento anaeróbico, las células de *P. aeruginosa* se pueden observar alargadas y sin formación de escisión o separación celular, lo que interpretaron como una supresión de la formación de peptidoglicano septal (Yoon y cols., 2011). Durante vuelos espaciales, los organismos suelen tener una adaptación de transcripción parecida a la resultante de un crecimiento anaeróbico. El primer estudio realizado para caracterizar las respuestas globales transcripcionales y proteómicas en *P. aeruginosa*, encontró que Hfq es uno de los reguladores transcripcionales globales más importantes de este organismo, siendo que su cambio en microgravedad representó un total de 167 genes regulados de forma distinta a comparación de sus contrapartes en gravedad terrestre, así como también se obtuvieron cambios en 28 proteínas en estas condiciones. Este estudio menciona que *P. aeruginosa* en microgravedad, adquiere un modo de crecimiento anaeróbico, lo que también genera cambios en la virulencia y patogenicidad de los organismos, cambiando su probabilidad de riesgo (Crabbé y cols., 2010).

5.3. Relación entre células planctónicas y biofilm

Las células de biofilms difieren de las células planctónicas por distintos fenotipos, expresión genética y producción proteica, como se ha mencionado anteriormente. Se ha encontrado en experimentos con *Cupriavidus metallidurans* en microgravedad, que las células planctónicas cultivadas en microgravedad tienen más potencial de ser cultivadas de nuevo, a comparación de las células de biofilm cultivadas igualmente en microgravedad; según lo discutido, esto indica que las células en estas condiciones entran en una fase dormante, lo que provoca esta disminución en cultivabilidad (Byloos y cols., 2017).

Un proceso de importancia para la mantención de biofilm es el de la lisis celular. La lisis celular es un proceso útil en las etapas iniciales de los biofilms donde las células en la fase planctónica pasan de ser alargadas a ser células redondas, como resultado de un daño estructural de la célula. Luego de la lisis, el ADN ambiental (ADNe) puede utilizarse para ser encapsulado en vesículas membranales, además de ser utilizados como fuente de nutrientes para las bacterias en el biofilm, organización celular o como un agente quelador (Turnbull y cols., 2016). Además de eso, el ADNe, las proteínas citosólicas y ARN son encapsulados subsecuentemente en vesículas membranales y forman parte importante de la matriz del biofilm (Chiang y cols., 2013; Allesen-Holm y cols., 2006; Thi, Wibowo, y Rehm, 2020).

5.4. Importancia de *P. aeruginosa* en la Estación Espacial Internacional

Los experimentos de vuelos espaciales y análogos de microgravedad basados en tierra han sugerido que la microgravedad puede afectar el crecimiento y el metabolismo microbianos. Aunque los efectos de la microgravedad y sus análogos sobre los microorganismos se han estudiado durante más de 50 años, con frecuencia se han reportado resultados plausibles contradictorios y diversos en diferentes experimentos, especialmente en lo que respecta al crecimiento microbiano y al metabolismo secundario. Hasta ahora, solo se han investigado las respuestas de unos pocos microbios típicos a la microgravedad. Los estudios sistemáticos de las respuestas genéticas y fenotípicas de estos microorganismos a la microgravedad en el espacio son aún insuficientes debido a obstáculos

tecnológicos y logísticos. El uso de diferentes cepas de prueba y metabolitos secundarios en estos estudios parece haber provocado resultados diversos y contradictorios. Además, los cambios sutiles en los microambientes extracelulares alrededor de las células microbianas juegan un papel clave en las diversas respuestas de crecimiento microbiano y metabolismos secundarios. Por tanto, los efectos “indirectos” representan una vía razonable para explicar la ocurrencia de estos fenómenos en los microorganismos. Esta revisión resume el conocimiento actual sobre los cambios en el crecimiento microbiano y el metabolismo secundario en respuesta a los vuelos espaciales y sus análogos y analiza los resultados diversos y contradictorios. Además, se dan recomendaciones para estudios futuros sobre los efectos de la microgravedad en el espacio sobre el crecimiento microbiano y el metabolismo secundario (Huang, Li, Huang, y Liu, 2018).

La importancia de explorar los efectos de la microgravedad espacial sobre el crecimiento y el metabolismo microbianos incluye dos implicaciones importantes. Primero, el crecimiento de microorganismos (especialmente microbios patógenos) en una cápsula espacial podría ser una amenaza para la salud de los astronautas y ser perjudicial para su sistema inmunológico (Crabbé y cols., 2011; Wilson y cols., 2007; Crabbé y cols., 2013; Rosenzweig y cols., 2010). En segundo lugar, los microorganismos pueden producir muchos metabolitos secundarios especiales que podrían utilizarse como medicamentos tanto para humanos como para animales (Benoit y cols., 2006; Lam y cols., 1998, 2002) así como algunos metabolitos secundarios tóxicos que pueden amenazar la salud de los astronautas. Vale la pena investigar si la producción de metabolitos secundarios por estos microorganismos se altera en el entorno espacial (Rosado, Doyle, Hinds, y Taylor, 2010).

5.5. Medios de cultivo

Los medios de cultivo seleccionados para el proyecto de Space Biofilms pueden tener efecto en los cambios morfológicos de las células planctónicas de *P. aeruginosa*, ya sea debido a la disponibilidad de nutrientes que estos representan, así como también debido a la disponibilidad de aceptores finales de electrones durante la respiración celular.

5.5.1. Luria Bertani suplementado con nitrato de potasio

El medio de cultivo de Luria-Bertani ha sido utilizado en múltiples estudios relacionados a microorganismos encontrados en sistemas de agua (Vukanti, Model, y Leff, 2012; J. Yang y cols., 2018; Martin-Somer y cols., 2019). El medio de cultivo Luria-Bertani (LB) es bajo en nutrientes, ya que está compuesto por únicamente de triptona, extracto de levadura, cloruro de sodio y agua destilada. En este caso, debido a que los cultivos fueron de forma anaerobia, era necesario buscar un aceptor final de electrones para el proceso de respiración celular, es así como se eligió suplementar el medio LB con nitrato de potasio (LBK). Este medio de cultivo ha sido utilizado con anterioridad para la investigación, por lo que ya se conocen muchos datos de *P. aeruginosa* cultivada en este medio de cultivo, que serán discutidos en la sección de resultados.

5.5.2. mAUMg-high Pi

El medio de orina artificial modificada suplementado con glucosa y alto en fosfatos, se utiliza en investigaciones en las cuales se quiera simular las condiciones de crecimiento de células en ambientes médicos, por su similitud con la orina. Es por eso que es utilizado para el cultivo con los materiales de interés médico. Además de eso, ya se ha utilizado para el análisis del crecimiento de *P. aeruginosa* tanto en cuestiones de gravedad terrestre como en cuestiones de microgravedad, y se ha estudiado su efecto en el largo de células planctónicas y precursoras de biofilm (S.-H. Kim, Lee, Lau, y Cho, 2009). Este medio de cultivo además, es mucho más nutritivo a comparación del medio de cultivo

LBK ya que cuenta con ácido cítrico, ácido láctico, glucosa, cloruro de sodio, cloruro de amonio, aminoácidos, urea, ácido úrico, creatinina, cloruro de calcio y nitrato de sodio, en conjunto con muchos más componentes. La presencia de múltiples nitratos facilita la disponibilidad de aceptores finales de crecimiento frente a un crecimiento anaeróbico.

5.6. Materiales en la formación de biofilms

En la mayoría de casos, para comenzar a formar un biofilm, es necesario que una célula planctónica tenga una interacción con una superficie. Luego de la interacción, es por medio de interacciones químicas, que se da la adhesión del microorganismo. En estas interacciones las fuerzas atractivas entre la superficie y la célula tienen que ser mayores que las fuerzas repulsivas y por medio de fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas, se consigue hacer la adhesión celular a la superficie (Dunne Jr, 2002; Carniello, Peterson, van der Mei, y Busscher, 2018; Muhammad y cols., 2020). Las interacciones entre las bacterias y las superficies han sido altamente estudiadas ya que se ha visto una tendencia a una mayor formación de biofilms en algunos materiales que en otros. Una de las interacciones más importantes a estudiar en este campo son las de las superficies hidrofóbicas, las cuales han mostrado ser más propensas a ser colonizadas por bacterias (Oliveira, Azeredo, Teixeira, y Fonseca, 2001; Donlan y Costerton, 2002; Sousa y cols., 2011; Muhammad y cols., 2020). Debido a esto, materiales tales como los aceros inoxidable son utilizados para evitar las interacciones con células bacterianas y por ende, la formación de biofilms.

En el caso de la presente investigación y, como se ha mencionado en varias ocasiones, se utilizaron materiales de interés industrial y materiales de interés médico. El acero inoxidable (SS, por sus siglas en inglés), un material de interés industrial, se utiliza ya que es un material utilizado activamente en la EEI en sistemas tales como el sistema de reciclaje de agua, en el cual se han encontrado biofilms de muchas especies microbiológicas (Venkateswaran y cols., 2001). El SS316 es utilizado debido a que es utilizado en componentes de cohetes, sistemas de soporte de vida, material quirúrgico y además, sistemas de movilidad externa (Zea y cols., 2018). El SS316 pasivado es utilizado debido a que ha sido propuesto como un material con un posible uso para la prevención de formación de biofilms en el diseño de sistemas de agua potable para la EEI (Muirhead, Button-Denby, Smyth, Nelson, y Callahan, 2020). Además, el método de pasivación ha sido explorado tanto con una metodología con plata, así como también por un proceso ácido, como posible biocida a utilizar contra estas comunidades microbiológicas complejas (Callahan y cols., 2007; Li, Calle, Hanford, Stambaugh, y Callahan, 2018). Por otro lado, el material MIT-LIS, es un material diseñado por el MIT para la exploración del uso de una superficie impregnada con lubricante, y su acción contra el crecimiento de biofilms. Esta solución funciona bajo el principio de evitar la adhesión inicial de las células bacterianas de la superficie, además de afectar las características de movilidad de la célula (Zea y cols., 2018).

Por otro lado, en cuanto a los materiales de interés industrial, se hace uso de Silicona (Silicone), debido a su presencia en hospitales y en instrumentos de la industria de la salud, como catéteres, sistemas de asistencia respiratoria, entre otras. Además, este material tiene presencia en electrónicos, dispositivos de investigación y también en la EEI, en los catéteres utilizados por los astronautas (Zea y cols., 2018; Tao, Lixiang, WeiQuan, y Xiangpeng, 2009). Junto al Silicone, se explora el uso de un Silicone con un método de Patrones de interferencia láser directa, donde se cambia la morfología del material y se espera que este cambio, afecte la adhesión celular al mismo, o dando paso a interacciones únicas entre estas células y el material (Zea y cols., 2018). Finalmente, el material de la membrana de celulosa (Cell Memb), fue utilizado para estudiar las estructuras en forma de canopy formadas por el biofilm y anteriormente reportadas por Collins et al. (2013) (W. Kim y cols., 2013; Zea y cols., 2018).

Metodología de desarrollo e investigación

6.1. Matriz de experimentación

Se diseñó un experimento a ser realizado por BioServe Space Technologies, bajo el financiamiento de NASA con el código 80NSSC17K0036. El diseño de la misión fue realizado por el Dr. Luis Zea, para llevarse a cabo en la EEI, con el lanzamiento del Cygnus NG-12 en noviembre de 2019.

En esta misión, se realizaron cultivos en micro-g, de *P. aeruginosa* PA14 en medio Luria-Bertani broth suplementado con potasio (KNO₃) como aceptor final de electrones, y se agregaron diferentes cupones de materiales de interés industrial: SS316, p-SS316 y MIT LIS. Al mismo tiempo, se realizaron cultivos de *P. aeruginosa* PA14 en medio mAUMg-high Pi y se agregaron diferentes cupones de materiales de interés médico: Cellulose Membrane (Cell-Memb), Silicone y Silicone-DLIP. Como control, se realizaron los mismos cultivos en g-terrestre. El crecimiento se dio por un tiempo de 1 a 3 días de forma anaerobia; al culminar el tiempo, las muestras fueron fijadas haciendo uso de Paraformaldehído (PFA) 4%. Todas las muestras se trabajaron en cuadruplicado. El Cuadro 6.1 muestra la matriz de estos datos. Toda esta parte experimental se realizó con la ayuda de la Lic. y candidata a Ph.D, Pamela Flores.

Para la preparación de estos cultivos, se utilizó la metodología que se observa en la Figura 6.1. Se hizo uso de cristalería de BioServe Space Technologies donde se preparó un Fluid Processing Apparatus (FPA) con un inserto, un cupón del material de interés, medio de cultivo (ya fuera LBK o mAUMg-high Pi), otro inserto, una alícuota de las bacterias en estasis, un septum de separación, reactivo de fijación celular (en este caso, paraformaldehído al 12 %) y un último septum que guarda todo lo anteriormente mencionado. Cada FPA fue preparado en cuadruplicado para cada uno de los tratamientos y fue colocado en un Group Activation Pack (GAP), hasta tener 8 FPAs en cada GAP. Estos GAPs ya terminados fueron almacenados a 4°C en todo el procedimiento previo a su activación en la EEI y en la Tierra, luego del lanzamiento del Cygnus NG12. Al finalizar su momento de cultivo, los GAPs fueron nuevamente cultivados a 4°C y guardados hasta su momento de regreso a la Tierra. (Flores, 2021)

Finalmente, las muestras regresaron a la Tierra en enero de 2020, en la cápsula de SpaceX-19, donde fueron procesadas por el equipo de BioServe Space Technologies. Durante este procesamiento,

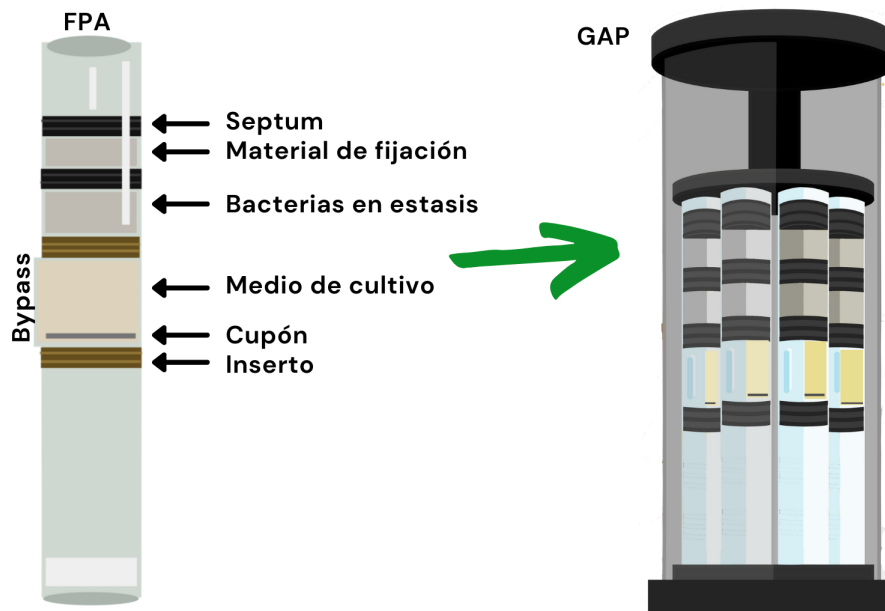


Figura 6.1: Proceso de preparación de muestras previo al vuelo.

se abrieron los GAPs y se sacaron los FPAs. Luego de eso, se separaron los dos septums de la parte superior y se extrajo el cupón con el biofilm utilizando unas pinzas (Figura 6.2). Este biofilm pasó un proceso de limpieza con PBS y otros procesos, mientras que el sobrenadante del cultivo líquido fue preparado en forma de alicuotas para ser enviadas a Guatemala en enero del 2021 para su presente uso durante la investigación. (Flores, 2021)

6.2. Preparación PBS 0.01X

Se contaba con una solución inicial de PBS 10X marca Gibco (70011044). Para obtener el PBS 0.01X, se tomó una alicuota de 10 μ L de esta solución inicial y se mezcló con 9.99 mL de agua desionizada para la obtención de 10mL de Buffer PBS 0.01X.

6.3. Preparación dilución

Se agregaron 0.5 μ L de muestra a un tubo de 0.5mL. Luego se tomaron 49.5 μ L de Buffer PBS 0.01 X y se agregaron al tubo con la muestra. Se mezcló por pipeteo y así se obtuvo una dilución de 1:100. Esta dilución fue luego utilizada para los análisis de microscopía.

6.3.1. Preparación Agarosa al 2 %

Para la preparación de las muestras, fue necesario preparar una cama de agarosa al 2% para colocar las alicuotas de las muestras. Esta cama se utilizó para tener un mayor número de células en el mismo plano y así, hacer más fácil la microscopía. Para la preparación de esta solución, se midieron 0.075 g de agarosa Sigma Aldrich (CAS 9012-36-6) y se disolvieron en 5 mL de PBS 0.01X anteriormente preparados. Se calentó y se mantuvo en agitación hasta tener una solución líquida

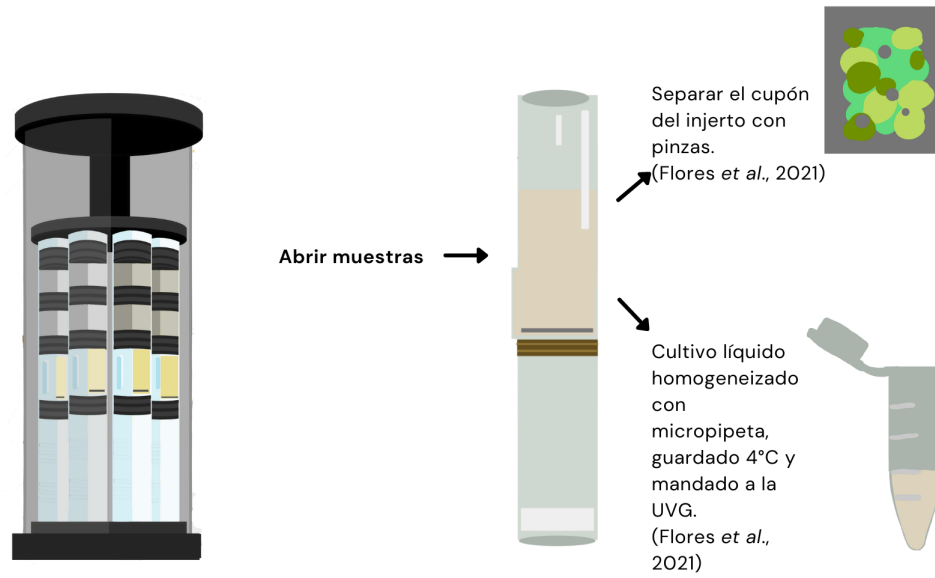


Figura 6.2: Proceso de preparación de muestras previo al vuelo.

homogénea y translúcida. La agarosa se tenía que utilizar en caliente para la preparación de las muestras.

6.3.2. Preparación de muestra

Para la preparación de las muestras, se utilizaron portaobjetos Marienfeld (CAT NO.1000000), donde se colocaron 400 μ L de agarosa en la primera mitad del portaobjetos y se colocó un cubreobjetos rápidamente. Se repitió el proceso en la segunda mitad del portaobjetos y se dejó enfriar. Luego de enfriar y tener una cama de agarosa sólida, se extrajo el cubreobjetos y se agregó 3 μ L de la muestra en el centro del cuadro formado por el cubreobjetos en la agarosa. Se volvió a colocar el cubreobjetos para proteger la muestra y se observó en el microscopio. No se utilizó ningún tipo de tinción, solamente se trabajó con las muestras crudas. Cada muestra se preparó según la matriz de datos del Cuadro 6.1.

Cuadro 6.1: Matriz de experimentación en micro-g y g-terrestre

GAP	FPA ID	Día	Medio	Material	Réplica	Gravedad
1	1.1	1	LBK	SS316	1	Micro-g
1	1.2	1	LBK	SS316	2	Micro-g
1	1.3	1	LBK	SS316	3	Micro-g
1	1.4	1	LBK	SS316	4	Micro-g
1	1.5	1	LBK	p-SS316	1	Micro-g
1	1.6	1	LBK	p-SS316	2	Micro-g
1	1.7	1	LBK	p-SS316	3	Micro-g
1	1.8	1	LBK	p-SS316	4	Micro-g
2	2.1	1	LBK	MIT LIS	1	Micro-g
2	2.2	1	LBK	MIT LIS	2	Micro-g
2	2.3	1	LBK	MIT LIS	3	Micro-g
2	2.4	1	LBK	MIT LIS	4	Micro-g

Cuadro 6.1: Matriz de experimentación en micro-g y g-terrestre

GAP	FPA ID	Día	Medio	Material	Réplica	Gravedad
2	2.5	1	mAUMg-high Pi	Cellulose	1	Micro-g
2	2.6	1	mAUMg-high Pi	Cellulose	2	Micro-g
2	2.7	1	mAUMg-high Pi	Cellulose	3	Micro-g
2	2.8	1	mAUMg-high Pi	Cellulose	4	Micro-g
3	3.1	1	mAUMg-high Pi	Silicone	1	Micro-g
3	3.2	1	mAUMg-high Pi	Silicone	2	Micro-g
3	3.3	1	mAUMg-high Pi	Silicone	3	Micro-g
3	3.4	1	mAUMg-high Pi	Silicone	4	Micro-g
3	3.5	1	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	1	Micro-g
3	3.6	1	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	2	Micro-g
3	3.7	1	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	3	Micro-g
3	3.8	1	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	4	Micro-g
7	7.1	2	LBK	SS316	1	Micro-g
7	7.2	2	LBK	SS316	2	Micro-g
7	7.3	2	LBK	SS316	3	Micro-g
7	7.4	2	LBK	SS316	4	Micro-g
7	7.5	2	LBK	p-SS316	1	Micro-g
7	7.6	2	LBK	p-SS316	2	Micro-g
7	7.7	2	LBK	p-SS316	3	Micro-g
7	7.8	2	LBK	p-SS316	4	Micro-g
8	8.1	2	LBK	MIT LIS	1	Micro-g
8	8.2	2	LBK	MIT LIS	2	Micro-g
8	8.3	2	LBK	MIT LIS	3	Micro-g
8	8.4	2	LBK	MIT LIS	4	Micro-g
8	8.5	2	mAUMg-high Pi	Cellulose	1	Micro-g
8	8.6	2	mAUMg-high Pi	Cellulose	2	Micro-g
8	8.7	2	mAUMg-high Pi	Cellulose	3	Micro-g
8	8.8	2	mAUMg-high Pi	Cellulose	4	Micro-g
9	9.1	2	mAUMg-high Pi	Silicone	1	Micro-g
9	9.2	2	mAUMg-high Pi	Silicone	2	Micro-g
9	9.3	2	mAUMg-high Pi	Silicone	3	Micro-g
9	9.4	2	mAUMg-high Pi	Silicone	4	Micro-g
9	9.5	2	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	1	Micro-g
9	9.6	2	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	2	Micro-g
9	9.7	2	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	3	Micro-g
9	9.8	2	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	4	Micro-g
13	13.1	3	LBK	SS316	1	Micro-g
13	13.2	3	LBK	SS316	2	Micro-g
13	13.3	3	LBK	SS316	3	Micro-g
13	13.4	3	LBK	SS316	4	Micro-g
13	13.5	3	LBK	p-SS316	1	Micro-g
13	13.6	3	LBK	p-SS316	2	Micro-g
13	13.7	3	LBK	p-SS316	3	Micro-g
13	13.8	3	LBK	p-SS316	4	Micro-g
14	14.1	3	LBK	MIT LIS	1	Micro-g
14	14.2	3	LBK	MIT LIS	2	Micro-g
14	14.3	3	LBK	MIT LIS	3	Micro-g
14	14.4	3	LBK	MIT LIS	4	Micro-g
14	14.5	3	mAUMg-high Pi	Cellulose	1	Micro-g

Cuadro 6.1: Matriz de experimentación en micro-g y g-terrestre

GAP	FPA ID	Día	Medio	Material	Réplica	Gravedad
14	14.6	3	mAUMg-high Pi	Cellulose	2	Micro-g
14	14.7	3	mAUMg-high Pi	Cellulose	3	Micro-g
14	14.8	3	mAUMg-high Pi	Cellulose	4	Micro-g
15	15.1	3	mAUMg-high Pi	Silicone	1	Micro-g
15	15.2	3	mAUMg-high Pi	Silicone	2	Micro-g
15	15.3	3	mAUMg-high Pi	Silicone	3	Micro-g
15	15.4	3	mAUMg-high Pi	Silicone	4	Micro-g
15	15.5	3	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	1	Micro-g
15	15.6	3	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	2	Micro-g
15	15.7	3	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	3	Micro-g
15	15.8	3	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	4	Micro-g
G1	G1.1	1	LBK	SS316	1	g-terrestre
G1	G1.2	1	LBK	SS316	2	g-terrestre
G1	G1.3	1	LBK	SS316	3	g-terrestre
G1	G1.4	1	LBK	SS316	4	g-terrestre
G1	G1.5	1	LBK	p-SS316	1	g-terrestre
G1	G1.6	1	LBK	p-SS316	2	g-terrestre
G1	G1.7	1	LBK	p-SS316	3	g-terrestre
G1	G1.8	1	LBK	p-SS316	4	g-terrestre
G2	G2.1	1	LBK	MIT LIS	1	g-terrestre
G2	G2.2	1	LBK	MIT LIS	2	g-terrestre
G2	G2.3	1	LBK	MIT LIS	3	g-terrestre
G2	G2.4	1	LBK	MIT LIS	4	g-terrestre
G2	G2.5	1	mAUMg-high Pi	Cellulose	1	g-terrestre
G2	G2.6	1	mAUMg-high Pi	Cellulose	2	g-terrestre
G2	G2.7	1	mAUMg-high Pi	Cellulose	3	g-terrestre
G2	G2.8	1	mAUMg-high Pi	Cellulose	4	g-terrestre
G3	G3.1	1	mAUMg-high Pi	Silicone	1	g-terrestre
G3	G3.2	1	mAUMg-high Pi	Silicone	2	g-terrestre
G3	G3.3	1	mAUMg-high Pi	Silicone	3	g-terrestre
G3	G3.4	1	mAUMg-high Pi	Silicone	4	g-terrestre
G3	G3.5	1	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	1	g-terrestre
G3	G3.6	1	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	2	g-terrestre
G3	G3.7	1	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	3	g-terrestre
G3	G3.8	1	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	4	g-terrestre
G7	G7.1	2	LBK	SS316	1	g-terrestre
G7	G7.2	2	LBK	SS316	2	g-terrestre
G7	G7.3	2	LBK	SS316	3	g-terrestre
G7	G7.4	2	LBK	SS316	4	g-terrestre
G7	G7.5	2	LBK	p-SS316	1	g-terrestre
G7	G7.6	2	LBK	p-SS316	2	g-terrestre
G7	G7.7	2	LBK	p-SS316	3	g-terrestre
G7	G7.8	2	LBK	p-SS316	4	g-terrestre
G8	G8.1	2	LBK	MIT LIS	1	g-terrestre
G8	G8.2	2	LBK	MIT LIS	2	g-terrestre
G8	G8.3	2	LBK	MIT LIS	3	g-terrestre
G8	G8.4	2	LBK	MIT LIS	4	g-terrestre
G8	G8.5	2	mAUMg-high Pi	Cellulose	1	g-terrestre
G8	G8.6	2	mAUMg-high Pi	Cellulose	2	g-terrestre

Cuadro 6.1: Matriz de experimentación en micro-g y g-terrestre

GAP	FPA ID	Día	Medio	Material	Réplica	Gravedad
G8	G8.7	2	mAUMg-high Pi	Cellulose	3	g-terrestre
G8	G8.8	2	mAUMg-high Pi	Cellulose	4	g-terrestre
G9	G9.1	2	mAUMg-high Pi	Silicone	1	g-terrestre
G9	G9.2	2	mAUMg-high Pi	Silicone	2	g-terrestre
G9	G9.3	2	mAUMg-high Pi	Silicone	3	g-terrestre
G9	G9.4	2	mAUMg-high Pi	Silicone	4	g-terrestre
G9	G9.5	2	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	1	g-terrestre
G9	G9.6	2	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	2	g-terrestre
G9	G9.7	2	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	3	g-terrestre
G9	G9.8	2	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	4	g-terrestre
G13	G13.1	3	LBK	SS316	1	g-terrestre
G13	G13.2	3	LBK	SS316	2	g-terrestre
G13	G13.3	3	LBK	SS316	3	g-terrestre
G13	G13.4	3	LBK	SS316	4	g-terrestre
G13	G13.5	3	LBK	p-SS316	1	g-terrestre
G13	G13.6	3	LBK	p-SS316	2	g-terrestre
G13	G13.7	3	LBK	p-SS316	3	g-terrestre
G13	G13.8	3	LBK	p-SS316	4	g-terrestre
G14	G14.1	3	LBK	MIT LIS	1	g-terrestre
G14	G14.2	3	LBK	MIT LIS	2	g-terrestre
G14	G14.3	3	LBK	MIT LIS	3	g-terrestre
G14	G14.4	3	LBK	MIT LIS	4	g-terrestre
G14	G14.5	3	mAUMg-high Pi	Cellulose	1	g-terrestre
G14	G14.6	3	mAUMg-high Pi	Cellulose	2	g-terrestre
G14	G14.7	3	mAUMg-high Pi	Cellulose	3	g-terrestre
G14	G14.8	3	mAUMg-high Pi	Cellulose	4	g-terrestre
G15	G15.1	3	mAUMg-high Pi	Silicone	1	g-terrestre
G15	G15.2	3	mAUMg-high Pi	Silicone	2	g-terrestre
G15	G15.3	3	mAUMg-high Pi	Silicone	3	g-terrestre
G15	G15.4	3	mAUMg-high Pi	Silicone	4	g-terrestre
G15	G15.5	3	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	1	g-terrestre
G15	G15.6	3	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	2	g-terrestre
G15	G15.7	3	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	3	g-terrestre
G15	G15.8	3	mAUMg-high Pi	Silicone DLIP	4	g-terrestre

6.4. Microscopía de contraste de fase

Se utilizó un microscopio modelo Micromaster marca Fisher Scientific con objetivos 20x, 40x y 100x marca AMSCOPE PHP con una luz Halógena. El aceite de inmersión es de marca Cargille Tipo A con código de fórmula 1248 estandarizada a 23°C. Se comenzó enfocando la muestra con el objetivo 20x ajustando con el condensador con el número 20. Al lograr un enfoque, se prosiguió con el objetivo 40x acompañado con un cambio en el condensador hacia el número 40. Seguido a eso, se prosiguió colocando el objetivo de 100x colocando una gota de aceite de inmersión tipo A entre el objetivo y el cubreobjetos. En conjunto, se cambió también el condensador al indicador con el número 100. Se movió la distancia entre el condensador y el objetivo hasta lograr una imagen clara y se terminó de enfocar con el ajuste micrométrico del microscopio.

Siguiendo la metodología de Luppens y Steinberger, quienes mencionan un total de muestras

recomendadas para análisis estadístico (Luppens, 2002; Steinberger, 2002), para la medición del diámetro y longitud celular, se midieron 50 células por cada variable. Para lograr esto, puede ser posible obtener las 50 células en un mismo encuadre de la muestra al hacer una exploración rápida del preparado. De no ser posible, se pueden utilizar más de una localización dentro de la muestra fijada. Para evitar medir el mismo lado o tomar fotografías de la misma célula, la observación de células comenzará desde la esquina superior izquierda y se moverá hasta la esquina superior derecha. Al llegar, se baja un cuadro completo (hasta que la célula observable en el área más baja del ocular, ya no se vea en la parte superior del mismo) y se recorre del extremo derecho -sin mover la altura-, hasta el siguiente extremo izquierdo. De esta manera se genera un barrido completo de la muestra hasta obtener las 50 células de muestra.

6.5. Uso de la cámara Moticam 10+

Se colocó el adaptador de la cámara en el ocular izquierdo del microscopio. Se ajustaron los tres tornillos por igual. Se prendió la computadora con el software y se comenzó a correr el mismo. Con el software, se da un clic en la instrucción que dice “imagen” con un símbolo de cámara. Esto comenzará con una transmisión en vivo de lo que está viendo la Moticam10+. De ser necesario, se ajustan los tornillos del adaptador hasta dejar de observar la viñeta negra en cualquiera de los lados de la imagen proyectada en el computador. Se colocó la placa de calibración con la cuadrícula de diámetro conocido de 0.01mm y se buscó la misma con el microscopio, hasta llegar a una magnificación de 100x. Con la herramienta del programa, llamada “Captura” (a la derecha de la pantalla), se tomó una fotografía de este círculo de diámetro conocido. A partir de acá, se hizo el esfuerzo de no tocar o mover la cámara.

Se retiró la placa y se prosiguió a realizar las mediciones correspondientes. Se tomó una fotografía de cada cuadro con células viables para la medición, mas no se midió la misma. Cada grupo de muestra debe tener una carpeta específica identificada con el número asignado por alguien más, por lo que se recomienda el uso de un USB externo para guardar las mismas.

6.6. Medición de células con programa FIJI

6.6.1. Calibración del programa

Se utilizó el software FIJI de ImageJ del 2017. Se calibró el programa haciendo uso de la primera fotografía del círculo de la placa de calibración. Se mide el círculo con la herramienta de línea. En la pestaña de Analizar, se selecciona “Determinar escala”. En la ventana que se abre, se colocó la distancia conocida del diámetro del círculo de la fotografía, el radio se dejó 1 y la unidad de medida se cambió a μm .

6.6.2. Mediciones

Luego de realizar la calibración y determinar la escala, se pueden hacer las mediciones. Con la misma herramienta de trazo recto, las mediciones se realizan marcando cada célula desde el centro del borde externo de la cápsula celular hasta el otro borde, del lado más largo. El ancho se mide de igual manera, desde el centro de un borde del costado de la célula hasta el otro borde, del lado más corto (Steinberger, 2002). Al realizar un trazo, se volvió a elegir la opción de analizar, luego la opción de medir y se obtiene un Excel. Se midieron un total de 25 células al azar, midiendo primero el largo celular y seguido a esto, el diámetro. Luego, se realizó una tabla en excel y se rellenó con

los datos de largo y diámetro obtenidos con el programa FIJI. Todas las fotografías fueron tomadas con el objetivo 100X del microscopio, en contraste de fases y sin ninguna tinción.

6.7. Optimización de metodología

Se realizaron réplicas de las muestras preparadas para la prueba, con la diferencia de no haber sido expuestas a condiciones de micro-g. Se prepararon en el mismo medio de cultivo, además de haber sido fijadas igualmente con Paraformaldehído al 4 %. Se siguió el proceso de preparación de los portaobjetos con muestras para el análisis, según el apartado 2 de la presente sección de metodología de desarrollo e investigación. Se realizaron lecturas según el apartado 3 de la presente sección de metodología de desarrollo e investigación con 12 diferentes muestras de prueba. Se observaron las muestras con safranina y sin safranina. Finalmente, se optó por analizar la muestra con mayor número de células para obtener más fotografías. Luego de obtener las fotografías, se utilizó el programa FIJI según el apartado 5 de la presente sección de metodología de desarrollo e investigación para la calibración y medición de las células de muestra.

6.8. Análisis estadístico

6.8.1. Prueba de normalidad

Algunos análisis estadísticos, requieren de ciertos supuestos para poder hacerse. Estos supuestos pueden incluir la independencia de los datos, distribución normal de datos y varianza normal de datos. Para tener normalidad, la probabilidad de obtener un dato cerca de la media de los datos al tomar una nueva medición, será mayor, e irá disminuyendo conforme se aleje de ella. Pruebas como el ANOVA, son pruebas que se ajustan a una normalidad de distribución de datos ya que asume que los datos pueden ser descritos con dos parámetros, la media y la desviación estándar, es por eso que es parte de las pruebas conocidas como pruebas paramétricas.

6.8.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

Haciendo uso del programa R, se realizan gráficos de caja y bigotes tomando en cuenta los días de crecimiento y el material de cupón, en únicamente una variable de gravedad. Luego de eso, se hicieron gráficos de caja y bigote por cada día, tomando en cuenta los materiales y comparando el largo y diámetro celular dependiendo de la variable de gravedad. Con cada dato también, se hizo un histograma de frecuencias de diámetro y longitud respectivamente.

Al igual que la normalidad en la distribución de datos, la homogeneidad de varianzas es algo que igualmente se toma en cuenta para determinar el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas. Este tipo de análisis puede ayudar a comprobar que estadísticamente, no se esté cometiendo un Error de Tipo I (rechazar la hipótesis nula H_0 cuando es verdadera), o un Error de Tipo II (no rechazar la H_0 cuando esta es falsa).

Prueba de Levene

La prueba de Levene es utilizada para determinar si una cantidad de muestras tiene varianzas iguales. A esta igualdad de varianzas entre las muestras, se le conoce como homogeneidad de varianzas. Al comprobar normalidad de varianzas con la prueba anterior, utilizar la prueba de Levene es

necesario para determinar si una muestra de tamaño N , dividida en una cantidad k de subgrupos, tiene homogeneidad de varianzas y, por lo tanto, se pueden utilizar análisis paramétricos en el grupo de datos (Levene, 1961). Para realizar la prueba de Levene se obtuvo el promedio de las mediciones de réplicas técnicas (las 25 mediciones de largo y diámetro celular) por cada réplica biológica (cuatro réplicas por cada tratamiento de cupón, en una gravedad determinada). Además, se utilizaron tres grupos distintos, divididos por días, en cada uno de los tratamientos gravitacionales. Cada día tiene un total de 6 tratamientos con 6 materiales distintos de cupón. Esto quiere decir que se realizó una prueba de Levene para los días uno, dos y tres, en gravedad normal, y nuevamente en los días uno, dos y tres en micro-g. Cada prueba de Levene tuvo entonces, una muestra de tamaño 24, dividida en una cantidad 6 de grupos (materiales de cupón) (McDonald, 2009). Este análisis se realizó utilizando RStudio Desktop versión 2021.09.1+372.

6.8.3. Comparación de medias

Gracias a las pruebas realizadas con anterioridad, es posible realizar pruebas no-paramétricas. La primera prueba no paramétrica a realizar es la de Kruskal-Wallis. Para esto, se hicieron diferentes grupos para la comparación: 1) Por día, incluyendo las dos variables de gravedad y todas las variables de material. 2) Por Material, incluyendo los tres días y las dos variables de gravedad. 3) Por gravedad, incluyendo los tres días y todas las variables de material.

Prueba de Dunn

La prueba de Dunn es parecida a la prueba de ANOVA, con la diferencia de que las comparaciones por pares, se hacen por medio de comparación de rangos promedio. La hipótesis nula afirma que no hay una diferencia significativa entre las medias de las poblaciones. La hipótesis alternativa afirma que existe una diferencia significativa en las medias de el par que se está analizando.

7.1. Optimización del método

A continuación, se presenta una serie de resultados que fueron obtenidos a través de una experimentación de prueba, con muestras que no fueron expuestas a micro-g, sino que únicamente replicaron la metodología de preparación de muestras. Para estas imágenes, se utilizó únicamente la muestra A, puesto que se encontró que tenía una concentración celular óptima para las pruebas.

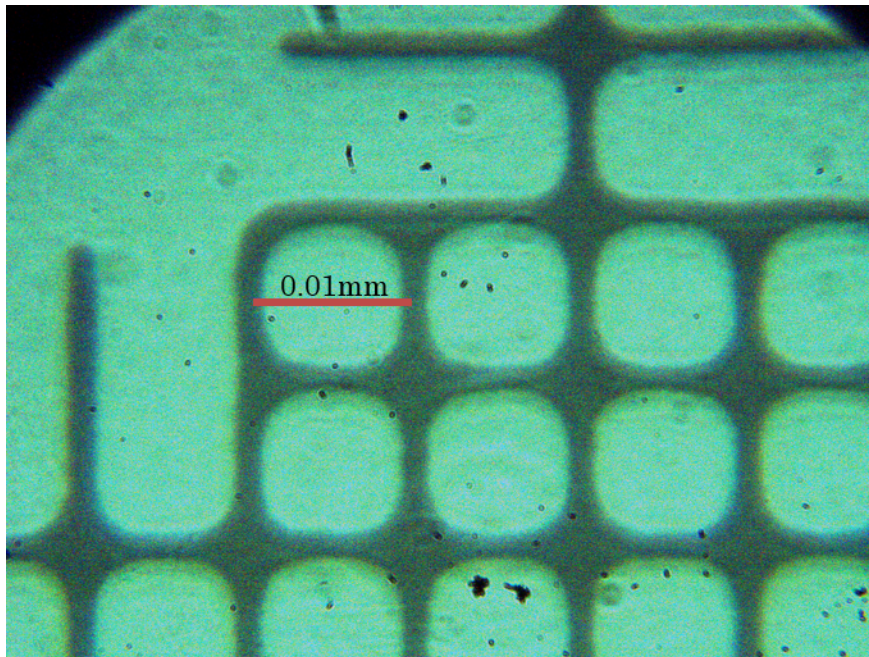


Figura 7.1: Cuadrícula de calibración de la cámara Moticom10+ y su tamaño representativo.

Con esta imagen, se obtuvo el dato entre la relación entre píxeles y micrómetros, como se observa en el ejemplo de la Figura 7.2. Esta escala fue arreglada dependiendo de la ocasión ya que hubieron imágenes que fueron tomadas con una mayor cantidad de píxeles por imagen, lo que hacía que tuviera

que cambiar la relación entre pixel por micrómetro. Esto se hizo utilizando fotografías iguales a la de la Figura 7.1 pero con diferentes arreglos de calidad en el software de la cámara Moticom10+.

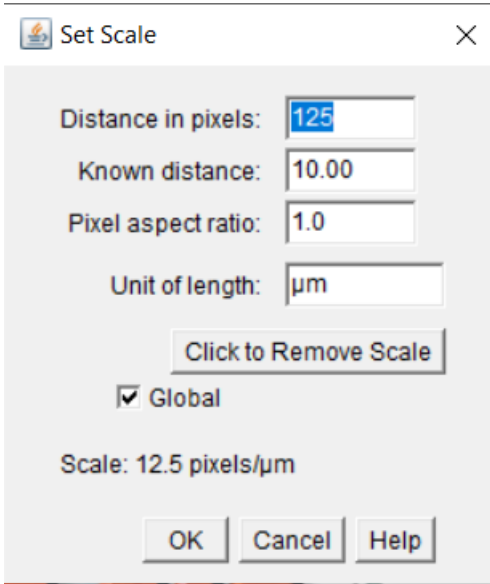


Figura 7.2: Muestra de la obtención de pixeles por micrómetro para la calibración de mediciones con el software FIJI.

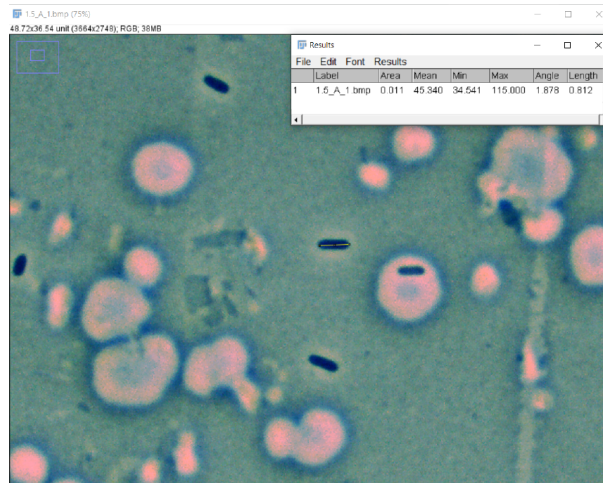


Figura 7.3: Muestra de proceso de medición de largo de células haciendo uso del software FIJI.

Después de eso se comenzaron a hacer las mediciones según como se puede observar en la Figura 7.3. Luego se abrieron las fotografías de las bacterias y se analizaron haciendo zoom para mejorar la visibilidad de cada bacteria. Se selecciona la parte de Analyze nuevamente y “measure”. Se midieron un total de 15 células según se puede observar en el Cuadro 7.1. Debido al tipo de análisis realizado y sin posibilidad de comparar variables, solamente se muestran las longitudes de las células. Con las muestras formales, se podrá utilizar variables de materiales de cupón y también de diferentes de gravedades.

Se había agregado Safranina con la intención de observar las células de *P. aeruginosa* sin necesidad del microscopio de contraste de fases y sin necesidad de realizar tinciones que provocaran una pérdida de muestra. No se obtuvo una diferencia para la observación de células con safranina o

sin ella, por lo que se recomienda utilizar sin safranina y aprovechar la microscopía de contraste de fases. Teniendo estos datos optimizados y estandarizados, se procedió a hacer las mediciones reales correspondientes.

Cuadro 7.1: Muestras de prueba medidas con células de optimización.

Número muestra	Longitud (um)
1	2.27
2	2.371
3	2.619
4	2.677
5	3.037
6	2.16
7	2.38
8	2.949
9	2.95
10	2.473
11	2.527
12	2.19
13	2.305
14	2.791
15	2.039

7.2. Mediciones

Se obtuvieron 25 mediciones de Largo y 25 mediciones de diámetro por cada réplica. Teniendo en cuenta que se tenía un total de 144 réplicas, eso hace un total de 25 mediciones en total. A cada una de las mediciones, se les llama réplicas técnicas". Estas réplicas técnicas fueron agrupadas de diferentes maneras para analizar su normalidad, según lo explicado en la sección 7-7-1 en la Prueba de Shapiro-Wilks, del apartado de Metodología. Se hicieron mediciones extra ya que algunos grupos presentaban no normalidad a causa de algunos datos atípicos. Estos datos atípicos fueron eliminados y reemplazados por nuevas mediciones de la misma muestra, hasta lograr normalidad.

7.3. Comprobación de normalidad de datos

Usando la prueba de Shapiro-Wilk, se comprobó la normalidad de los datos a analizar. Para comodidad de entendimiento, los resultados de las normalidades fueron agrupadas según el GAP al que pertenecían, sin embargo, cada réplica tuvo su propio análisis de Shapiro-Wilk. Las pruebas de normalidad de cada réplica presente por GAP, cultivadas en la EES, pueden ser encontradas en la sección de anexos del presente documento. Todas las réplicas dispuestas en la EEI, muestran normalidad tanto en las mediciones de Largo, como en las de Diámetro. Con esta demostración de normalidad es posible suponer normalidad suficiente para obtener los promedios de cada réplica técnica, para generar las réplicas biológicas. No obstante, fue necesario realizar pruebas de normalidad nuevamente a los grupos luego de obtener la media y establecer las réplicas biológicas. Dichas pruebas de normalidad realizadas a las medias como pruebas biológicas, se muestran igualmente, en la sección de anexos. Aquí, se encontró que todos los tratamientos muestran que los datos obtenidos como muestras biológicas, provienen de una distribución normal. Este primer resultado indica que puede ser posible utilizar pruebas paramétricas para identificar si existe una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. Sin embargo, estos resultados deben ser acompañados con los resultados de homogeneidad de varianzas, que será discutido en la sección siguiente.

Además de las muestras cultivadas en micro-g, se tienen muestras igualmente cultivadas en g-terrestre como control. Para estas muestras, se siguió el mismo protocolo de activación, cultivo y fijación, que se utilizó en las muestras de la EEI, incluso al mismo tiempo. Sin embargo, para poder hacer uso de estos datos para ser comparados con los datos obtenidos en micro-g, es necesario demostrar los mismos supuestos. Con el fin de comprobar el supuesto de normalidad para los datos de los cultivos en g-terrestre, se presentan en la sección de anexos. Los datos de los cultivos realizados en g-terrestre también muestran una distribución normal dentro de sus réplicas técnicas. Esto permite nuevamente obtener los promedios para generar cada réplica biológica y, con esto, hacer nuevamente un análisis de normalidad para comprobar que los datos obtenidos son normales. La normalidad define si los datos pueden ser utilizados en conjunto con los de micro-g, para realizar pruebas paramétricas. Esta nueva prueba de normalidad se presenta completa en el área de anexos nuevamente. Los datos obtenidos como réplicas biológicas para las muestras cultivadas en g-terrestre, muestran igualmente normalidad en su distribución. Esto permite continuar con análisis paramétricos siempre y cuando se cumpla con el postulado de Homogeneidad de varianza a presentar a continuación.

7.4. Comprobación de homogeneidad de varianzas

La prueba de homogeneidad de varianzas es la prueba determinante para saber si es posible o no, aplicar análisis paramétricos a los datos de interés a analizar. Debido a que las pruebas de medias se realizan con las réplicas biológicas, se supuso homogeneidad de varianza para las réplicas técnicas y se procedió a analizar únicamente la homogeneidad de varianza para las réplicas biológicas. Se encontró que algunos de los grupos de datos muestran varianza no homogénea, por lo que es necesario proceder a utilizar métodos no paramétricos para el análisis de las muestras.

7.5. Estadísticos

No cabe duda que los biofilms son un problema grave para el sector industrial (Murthy y Venkatesan, 2008), que puede llegar a extrapolarse en la rama de la investigación y exploración espacial, ya que los biofilms han sido encontrados en todo tipo de ambientes, y eso no excluye a los ambientes espaciales (Janik, Crump, Macler, Wydeven Jr, y Sauer, s.f.). Debido a eso, una investigación con el fin de explorar las posibles estrategias de control de biofilm, se realizó. Los autores Zea *et al.* (2020), en su revisión sobre Posibles estrategias para el control de biofilms durante misiones espaciales, expresan distintos métodos para el control de biofilms. Uno de estos métodos de control, es el uso de revestimientos en algunos materiales (Zea y cols., 2018). En este caso, se explora el uso de una superficie impregnada con lubricante (Lubricant-impregnated surface -LIS-) para explorar su funcionamiento contra biofilms. Además de un interés industrial, los biofilms también representan una amenaza a nivel médico contra la salud del ser humano a nivel hospitalario, y también para los astronautas. Para esta área de interés, se utilizan diferentes materiales de interés médico como lo son un Silicon (Silicone) de grado catéter, otro tipo de Silicon de Grado catéter con patrón de interferencia de láser directo de pulso ultracorto (Silicone-DLIP), y Membrana Celular (Cell Membrane/ Cell Memb), se comparan los cambios de largo y diámetro celular. Con la finalidad de entender de mejor manera cómo estas células se comportan en el entorno de materiales de interés industrial y médico, se comparan los cambios en el largo y diámetro celular de bacterias planctónicas de *P. aeruginosa* en dos tipos de medios de cultivo (LBK y mAUMg-high Pi), y dos regímenes gravitacionales (micro-g y g-terrestre).

Para comenzar, se hicieron análisis de Kruskal-Wallis (Cuadro 7.2) para probar si por lo menos un grupo de datos proviene de la misma población. La hipótesis nula de dicha prueba afirma que las medias de las poblaciones son iguales, por lo que se buscó rechazar la hipótesis nula para comprobar si existe una diferencia significativa entre las poblaciones estudiadas. Como se puede observar en el

cuadro, todos los grupos de datos mostraron que por lo menos una población es distinta a la del grupo. El grupo de poblaciones de las muestras cultivadas en LBK en g-terrestre y micro-g compara los tres materiales de cultivo disponibles durante los tres días: SS316, p-SS316 y MIT-LIS. El grupo de poblaciones de las muestras cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre y micro-g compara los tres materiales disponibles durante los tres días: Cellulose Membrane (CellMemb), Silicone y Silicone-DLIP. Por otro lado, los grupos de poblaciones separados por días, compara las muestras en LBK en cada día de cultivo, tanto en micro-g como en g-terrestre y comparando todos los materiales de cultivo. Con esta combinación de poblaciones se facilita la comparación siguiente con el método de Dunn y los gráficos de caja y bigote.

Cuadro 7.2: Prueba de Kruskal-Wallis, todos los grupos de datos tienen por lo menos un tratamiento cuya media no es igual a la media del resto de tratamientos.

Kruskal-Wallis	Largo	Ancho
Grupo de datos	Valor-p	Valor-p
Muestras cultivadas en LBK en g-terrestre	<2.20E-16	<2.20E-16
Muestras cultivadas en LBK en micro-g	<2.20E-16	<2.20E-16
Muestras cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre	<2.20E-16	<2.20E-16
Muestras cultivadas en mAUMg-high Pi en micro-g	1.17E-14	<2.20E-16
Muestras cultivadas en LBK Día 1	0.0001759	0.001247
Muestras cultivadas en LBK Día 2	<2.20E-16	4.80E-12
Muestras cultivadas en LBK Día 3	0.0002782	0.0004286
Muestras cultivadas en mAUMg-high Pi Día 1	<2.20E-16	<2.20E-16
Muestras cultivadas en mAUMg-high Pi Día 2	8.21E-05	0.0006606
Muestras cultivadas en mAUMg-high Pi Día 3	<2.20E-16	<2.20E-16

7.5.1. Medio de cultivo LBK

Diferencias en el largo celular en g-terrestre, de las células cultivadas en LBK con los materiales de MIT-LIS, SS316 y p-SS316

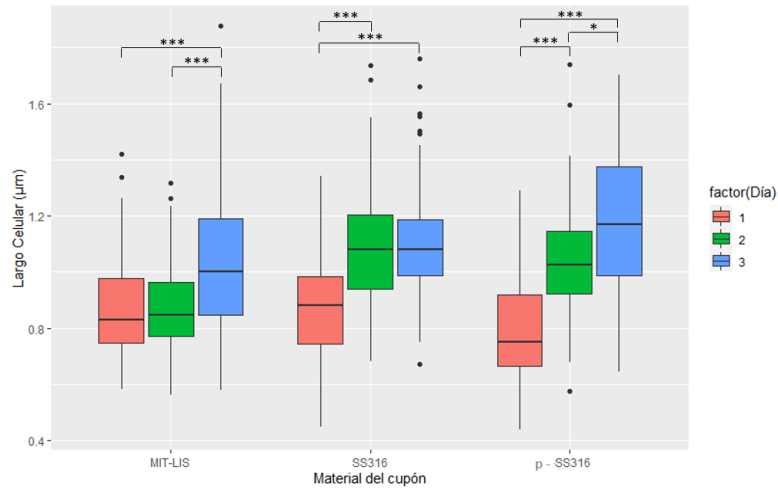


Figura 7.4: Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en LBK en g-terrestre con los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS. Clave de significancia: valor-p<0.5 0.1 ".", 0.01 "**", 0.001 "***", 0.0001 "****".

Al generar los diagramas de caja y bigote para observar los cambios de longitud en las células

cultivadas en LBK, es posible determinar algunas diferencias. Estas diferencias se soportaron con el análisis de Dunn, cuyo resultado completo se encuentra en la sección de Anexos, para todos los datos y no únicamente los de esta sección. Para comenzar, el MIT-LIS mostró una diferencia significativa entre el día 3 y el día 1 (valor-p <0.05***), siendo las bacterias del día 1 16.7% más cortas que las del día 3. Asimismo, hay una diferencia significativa entre las células del día 3 y el día 2 (valor-p <0.05***), siendo las del día 2, 16.0% más cortas. De igual manera, se encontró una diferencia significativa entre el día 1 de SS316 y el día 2 (valor-p <0.05***), siendo las células del día 1 19.9%, más cortas que las del día 2. También se encontró una diferencia significativa entre los días 1 y 3 (valor-p <0.05***), siendo las del día 1 20.8%, más cortas que las del día 3. No obstante, no hubo diferencia significativa entre el largo de las células del día 2 y el día 3 (valor-p >0.05). Finalmente, las células cultivadas en conjunto con p-SS316, mostraron una diferencia en el largo entre el día 1 y el día 2 (valor-p <0.05***), siendo las células del día 2 24.7%, más largas que las del día 1. Además, hay una diferencia significativa entre las células del día 2 y el día 3 (valor-p <0.05*), siendo las células del día 3 11.4%, más largas que las del día 2. Igualmente, hay una diferencia significativa entre las células del día 1 y el día 3, siendo nuevamente, las células del día 3 33.3%, más largas. Con esto, se observa una tendencia en la cual, las células planctónicas en g-terrestre con el medio de cultivo LBK y los materiales SS316, p-SS316 y MIT-LIS, tienden a llegar a estar en su mayor largo en el día 3. Aunque lleguen a ese largo desde el día 2 (ej. SS316), esta longitud se mantiene hacia el día 3.

Diferencias en el largo celular en micro-g, de las células cultivadas en LBK con los materiales de MIT-LIS, SS316 y p-SS316

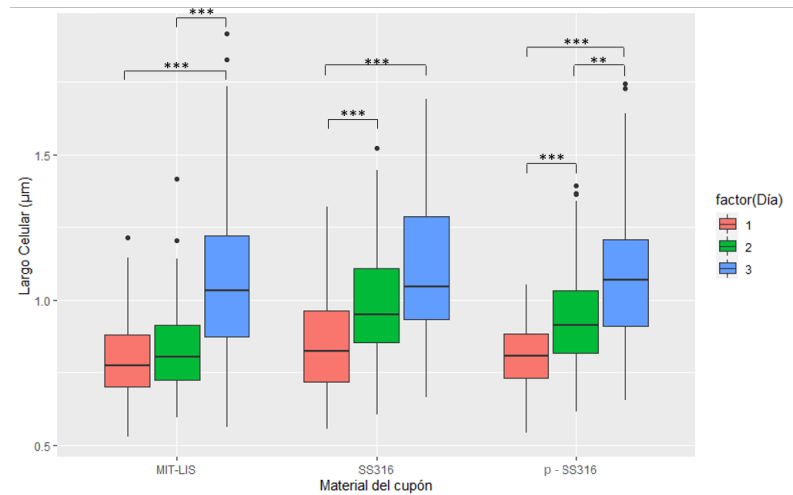


Figura 7.5: Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en LBK en micro-g con los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS. Clave de significancia: valor-p<0.5 0.1 ".", 0.01 "**", 0.001 "***", 0.0001 "****".

En LBK con los mismos materiales, pero en micro-g, se ve un patrón donde el largo celular va aumentando conforme los días pasan, siendo las células del día 1 más cortas que las del día 2, y estas últimas más cortas que las del día 3 para todos los materiales. Con el análisis de Dunn, para el material p-SS316 se confirma que existe una diferencia entre el día 1 y el día 2 (valor-p <0.05***), siendo las células del día 2 14.1% más largas que las del día 1. Igualmente, las células del día 1 son significativamente distintas a las del día 3 (valor-p <0.05***), siendo las del día 3 25% más largas que las del día 1. De igual forma, se encontró una diferencia entre las células del día 2 y el día 3 (valor-p <0.05**), siendo las del día 3 13.3% más largas que las del día 2. En cuanto al material MIT-LIS, se observó la misma tendencia, con la diferencia de que no se encontró una diferencia

significativa entre las células del día 1 y las del día 1 (valor-p >0.05). Se encontró una diferencia significativa entre las células del día 1 y el día 3 (valor-p <0.05***), siendo las del día 3 un 25.7% más largas que las del día 1. Igualmente, hay una diferencia entre las células del día 2 y las del día 3 (valor-p <0.05***), siendo las del día 3 22.3% más largas que las del día 2. Finalmente, para las células del día 2 se ve una diferencia significativa entre el día 1 y el día 2 (valor-p <0.05***), siendo las células del día 2 14.0% más largas que las del día 1, e igualmente las del día 1 y día 3 (valor-p <0.05***), siendo las del día 3 23.3% más largas que las del día 1. Por otro lado, no hubo diferencia significativa entre las células del día 2 y día 3 (valor-p >0.05).

Se puede ver entonces que en el MIT, las células se comportan de la misma manera en micro-g y en g-terrestre, siendo las células del día 1 y 2, del mismo largo, mientras que las células del día 3, son más largas. Para el resto de materiales (SS316 y p-SS316), el largo va aumentando conforme pasan los días.

Diferencias en el largo celular en g-terrestre y micro-g, de las células cultivadas en LBK con los materiales de MIT-LIS, SS316 y p-SS316, en el primer día de cultivo

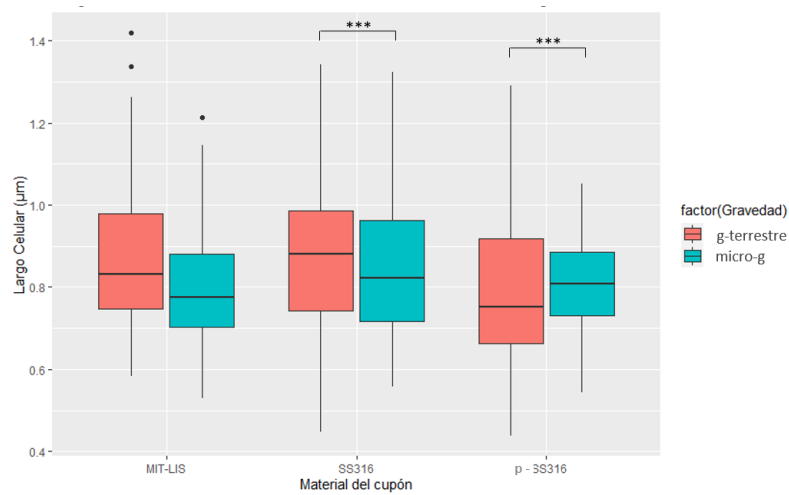


Figura 7.6: Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en LBK en el primer día, con el material SS316, p-SS316 y MIT-LIS. Clave de significancia: valor-p<0.5 0.1 ".", 0.01 "**", 0.001 "***", 0.0001 "****".

En el día 1, no se ve una diferencia significativa en el largo de las bacterias cultivadas en g-terrestre o micro-g (valor-p >0.05). Por lo que podemos decir que en el primer día de cultivo, no hay un efecto de la gravedad en el largo celular, sin embargo, se ve una tendencia en que las células sean más pequeñas en micro-g, comparadas con las células de gravedad terrestre.

Diferencias en el largo celular en g-terrestre y micro-g, de las células cultivadas en LBK con los materiales de MIT-LIS, SS316 y p-SS316, en el segundo día de Cultivo

En el día 2 de los cultivos, se reporta una diferencia significativa (valor-p <0.05 **) entre el cultivo en micro-g y g-terrestre de SS316, siendo las células en g-terrestre 10.4% más largas que las células en micro-g. También hay una diferencia significativa (valor-p <0.05 ***) entre el largo de las células cultivadas en g-terrestre y micro-g con el material de p-SS316, siendo las células cultivadas en micro-g 10.4% más pequeñas que las terrestres.

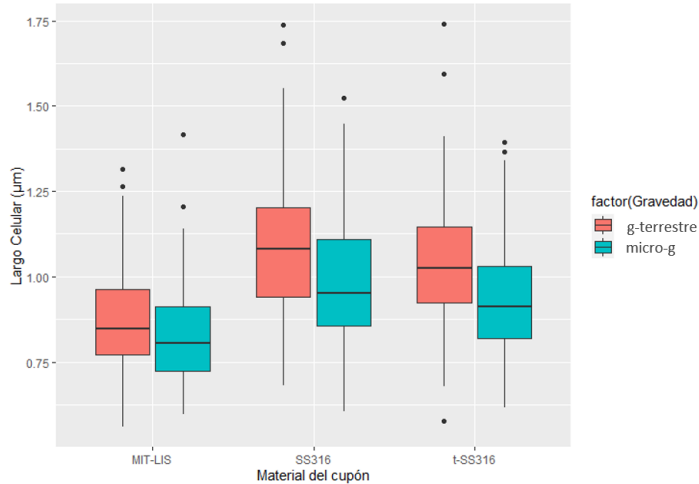


Figura 7.7: Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en LBK en el segundo día, con el material SS316, p-SS316 y MIT-LIS. Clave de significancia: valor- $p < 0.5$ 0.1 ".", 0.01 "**", 0.001 "***", 0.0001 "****".

Diferencias en el largo celular en g-terrestre y micro-g, de las células cultivadas en LBK con los materiales de MIT-LIS, SS316 y p-SS316, en el tercer día de Cultivo

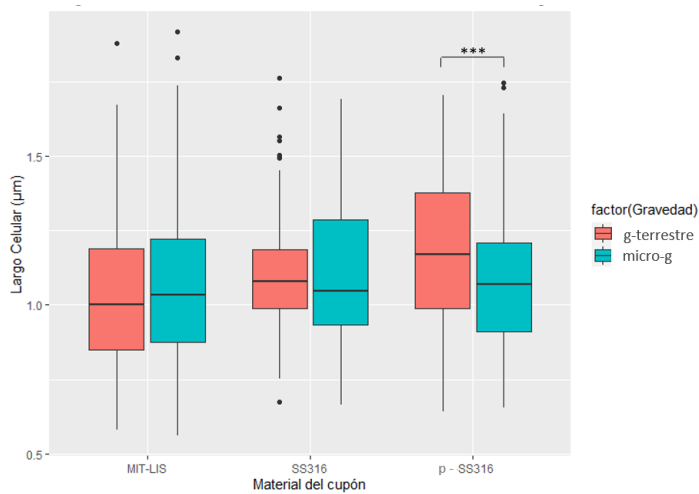


Figura 7.8: Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en LBK en el tercer día, con el material SS316, p-SS316 y MIT-LIS. Clave de significancia: valor- $p < 0.5$ 0.1 ".", 0.01 "**", 0.001 "***", 0.0001 "****".

Finalmente, en el día 3, se encontró una diferencia significativa entre el largo de las células cultivadas con p-SS316 en g-terrestre y micro-g (valor- $p < 0.05$ *), siendo las células de g-terrestre 8.6 % más largas a comparación de de micro-g.

Discusión sobre el largo celular en LBK y sus distintos tratamientos

Según una investigación sobre el largo celular, el crecimiento celular y la división celular (Donachie, Begg, y Vicente, 1976), el largo mínimo de las células se define como el largo de nacimiento de las

células en un momento cero (inicial) del crecimiento celular. Es decir que, en la fase lag de adecuación al medio de las células, estas se pueden encontrar en su largo mínimo hasta que comiencen con su crecimiento. Además, la investigación explica que, 20 minutos antes de la división celular, el largo celular debe ser aproximadamente el doble del largo mínimo celular en todo el crecimiento. Finalmente, el largo celular debe ir descendiendo gradualmente a medida que las células entran en la fase estacionaria (Basta, Angeles-Albores, Spero, Ciemniecki, y Newman, 2020). En cuanto a la dinámica de crecimiento de las células planctónicas de *P. aeruginosa*, las células planctónicas de la cepa PA14 cultivada en medio LB en condiciones anaeróbicas, comienza su fase exponencial alrededor de las 5 horas luego de su cultivo (S.-H. Kim y cols., 2009) y llega a comenzar su fase estacionaria entre las 8 y 10 horas (Basta y cols., 2020; Hall y cols., 2018). Por otro lado, el tiempo de replicación de las células de *P. aeruginosa* está entre los 40 y 60 minutos (Le y cols., 2014) y el tiempo de fijación de las células para comenzar a formar biofilms, comienza luego de iniciar el cultivo, de forma reversible. A partir de las 2h, las células comienzan el proceso de fijación no reversible para la formación de biofilms, que llegan a la primera fase de maduración a los 3 días, y a la segunda fase de maduración a los 6 días. La fase de dispersión comienza a partir de los 9 a 12 días (Sauer y cols., 2002).

Las formas en las cuales las células provenientes de un biofilm pasan de su estado de biofilm a un estado planctónico son 3: 1) desprendimiento, (cuando una parte grande del biofilm se desprende y por ende se pierde masa en la colonia), 2) erosión (cuando una a una, las células son separadas del biofilm por alguna fuerza externa), y 3) dispersión (cuando células parte del biofilm cambian de no motiles a motiles y salen de la colonia) (Sauer y cols., 2002; Purevdorj-Gage, Costerton, y Stoodley, 2005). Las primeras dos formas están relacionadas con fuerzas mecánicas que provocan esta separación, mientras que la 3ra forma parte del ciclo de vida de los biofilms. La dispersión de células es considerada un proceso activo que provoca una liberación rápida de células de la región central del biofilm, lo que deja agujeros centrales en este (Boles, Thoendel, y Singh, 2005; Ma y cols., 2009).

Las células planctónicas provenientes de un proceso de dispersión, muestran una fisiología parecida a la de las células planctónicas no provenientes de biofilm (Sauer y cols., 2002; Boles y cols., 2005), sin embargo, tienen un cambio importante. Al ser cultivadas nuevamente las células planctónicas separadas del biofilm, muestran tener una fase Lag mayor a la de las células originalmente planctónicas, de aproximadamente 3 horas extra (Rollet, Gal, y Guzzo, 2009). Además, comparando con las células planctónicas y las células sésiles (predecesoras biofilm), las células planctónicas separadas de un biofilm, muestran mayor capacidad de producir más biofilm, que las células originalmente planctónicas, pero menor capacidad de formar biofilm a comparación de las células sésiles. Esto quiere decir que los tres tipos de células de vida libre: Las células sésiles, células planctónicas originales y células planctónicas separadas de biofilm, muestran diferencias fisiológicas (Rollet y cols., 2009), probablemente relacionadas con las capacidades de adhesión.

Debido a que el cultivo se realizó por únicamente tres días y, gracias a la información disponible del tiempo de maduración de los biofilms, se puede saber que los biofilms se encontraban ya en un momento de fijación irreversible y recién llegado a la primera etapa de maduración del biofilm (matrices poco estructuradas). Podemos saber también que las células planctónicas tomadas en la muestra pueden haber sido células planctónicas originales o células sésiles que se habían adherido de forma reversible (menos de 2h) en el momento de terminado el experimento.

Por otro lado, una limitación en oxígeno ha demostrado relación con una liberación masiva de células planctónicas de biofilms en *P. aeruginosa* luego de aproximadamente 4 horas del desarrollo del mismo (Sanchez-Vizuet y cols., 2021), y el presente estudio presenta una limitación de oxígeno para los cultivos. Adicionalmente, durante el proceso de maduración de los biofilm, las células se pueden desasociar de la matriz del biofilm y retomar una vida planctónica (De Kievit, 2009). Se cree que este proceso se ve mediado por ramnolípidos, por lo que sería importante investigar la expresión de estos en estos tiempos de cultivo tanto en g-terrestre como en micro-g (De Kievit, 2009). Para que esto suceda, los niveles de c-di-GMP deben bajar (?, ?) (yan2019can) y para que estos niveles bajen, las células deben tener altos niveles de cAMP (Almblad y cols., 2019) o estar en un proceso

de desnitrificación, en un proceso de crecimiento anaeróbico (Hernandez y Rowe, 1987). Este es un factor importante a tomar en cuenta en el proceso de respiración anaeróbica ya que gracias a este proceso de desnitrificación, la célula es capaz de realizar su respiración sin necesidad de tener oxígeno, usando al nitrógeno como aceptor final de electrones. *P. aeruginosa* también tiene un conjunto completo de enzimas de desnitrificación que reducen el nitrato a nitrógeno molecular a través de nitrito, óxido nítrico (NO) y óxido nitroso. Estos óxidos de nitrógeno funcionan como aceptores de electrones alternativos y permiten que *P. aeruginosa* crezca en condiciones anaeróbicas. También se espera que una de las enzimas de desnitrificación, la NO reductasa, funcione para la desintoxicación del NO producido por el sistema de defensa inmunitario del huésped (Arai, 2011). Este tipo de procedimientos respiratorios han comprobado tener efectos de alargamiento en células bacterianas, lo que haría igualmente interesante estudiar estos caminos enzimáticos de desnitrificación para entender de mejor manera si se está o no utilizando este camino de respiración celular (Yoon y cols., 2011). Además, cabe recalcar que este tipo de crecimiento anaeróbico también tiene efectos en el diámetro celular (Baldani, Baldani, Seldin, y Döbereiner, 1986).

Según lo mencionado anteriormente, la falta de oxígeno por sí misma parece beneficiar bastante un estilo de vida planctónico en este caso. Un estudio realizado por Kim et al., apoya esta teoría. En su investigación, se encontró que, agregando una membrana de intercambio de gases, la biomasa formada por células planctónicas en gravedad normal y micro-g, se minimizaba (W. Kim y cols., 2013).

Algo interesante que se observa en los resultados, es que los tres materiales comienzan con un largo mínimo en sus células planctónicas, tanto en g-terrestre como en micro-g. Luego, hacia el día 2, ya existe una diferencia significativa en el largo celular para los aceros inoxidable; y hasta el 3er día existe una diferencia significativa con el MIT-LIS. La hipótesis que propongo es que, al llegar al primer día, las células originalmente planctónicas que se encontraban en su proceso de reproducción, han llegado ya a su fase estacionaria y, es por eso que el largo se mantiene bajo. Esto es así para los tres materiales utilizados con el medio LBK, aunque en el día 1, las células del material SS316 (valor-p <0.05**) y las del material MIT-LIS (valor-p <0.05**), muestran ser significativamente más largas que las células del material p-SS316 en g-terrestre, estas se encuentran en el largo menor en comparación con el resto de días de cultivo. De igual manera, las células cultivadas con SS316 en g-terrestre muestran ser significativamente más largas que las cultivadas con MIT-LIS en micro-g (valor-p <0.05*). Esto es interesante ya que la fase estacionaria de las células cultivadas en el MIT-LIS en micro-g, perdura hasta el día 2, donde no hay diferencia significativa entre el largo de las células en este momento y en el primer día.

Luego de las primeras fases de la formación de biofilm, la falta de oxígeno provoca el desprendimiento, ya sea rápido o progresivo, de nuevas células planctónicas provenientes del biofilm en su fase de maduración 1 y estas comienzan a crecer. Por su lado, el material SS316 en g-terrestre, en el día 2, ya ha comenzado con el crecimiento celular. En cuanto a los cultivos en g-terrestre, a partir del día 2, las células de SS316 son significativamente más largas que las células del día 2 en MIT-LIS (valor-p <0.05***), pero sigue en fase lag. Las células del material p-SS316 también resultan ser significativamente más largas que las células del día 2 del MIT-LIS (valor-p <0.05***), pero estas están comenzando con una nueva dinámica de crecimiento, lo que les provoca el inicio en el crecimiento exponencial y consigo, el alargamiento celular. En el caso de las células en micro-g, este patrón se repite; las células cultivadas en MIT-LIS, son significativamente más cortas que las células cultivadas en SS316 (valor-p <0.05***) y que las células cultivadas en p-SS316 (valor-p <0.05***). Las células de MIT-LIS cultivadas en micro-g también muestran ser significativamente más cortas que las células cultivadas en g-terrestre con SS316 (valor-p <0.05***) y p-SS316 (valor-p <0.05***). Igualmente, las células de MIT-LIS cultivadas en g-terrestre, muestran ser significativamente más pequeñas que las células crecidas en micro-g con SS316, y también, las células cultivadas en micro-g con p-SS316, muestran ser significativamente más pequeñas que las cultivadas en SS316 en g-terrestre.

Posteriormente, al llegar al día 3, las células que del material SS316 se han fijado antes de llegar a su crecimiento exponencial, o simplemente se han quedado en su fase estacionaria. Las células

en g-terrestre del material p-SS316 muestran ser, de todas formas, más largas que las células en crecimiento del material MIT-LIS en micro-g (valor-p <0.05**) y en g-terrestre (valor-p <0.05***). No existe diferencia significativa entre el largo de las células cultivadas en gravedad o micro-g para el tercer día, entre los materiales SS316 y p-SS316. Los datos atípicos de dichos grupos permiten que las medias no sean estadísticamente distintas y además, lanza una pista del posible crecimiento exponencial en el que se encuentran las células de estas poblaciones.

Afortunadamente, para comprender mejor la dinámica de crecimiento, nos podemos guiar también por otras características celulares como lo es el ancho de las células. El diámetro celular se mantiene normalmente durante el alargamiento de la célula. Sin embargo, hay algunas situaciones que pueden causar que el diámetro/ancho de la célula, cambie durante el crecimiento. Específicamente, el ancho de las células de *P. aeruginosa* se mantiene constante, sin importar el largo de la misma, lo que normalmente permite usar el largo celular como un representativo del tamaño celular (Deforet, Van Ditmarsch, y Xavier, 2015). Durante la visualización de las células y la toma de fotografías, algunas células parecían más redondas de lo normal. Este cambio ya ha sido reportado ya que se ha visto que las células pueden cambiar de su forma de varilla a una forma esférica cuando el gen mreB se silencia y también se ha visto que la sobreproducción de MreB puede aumentar el ancho de la célula (Jiang, Wang, Shen, y Chen, 2015; Jiang, Yao, y Chen, 2017; Wu, Fan, Jiang, Chen, y Chen, 2016).

Diferencias en el diámetro celular en g-terrestre, de las células cultivadas en LBK con los materiales de MIT-LIS, SS316 y p-SS316

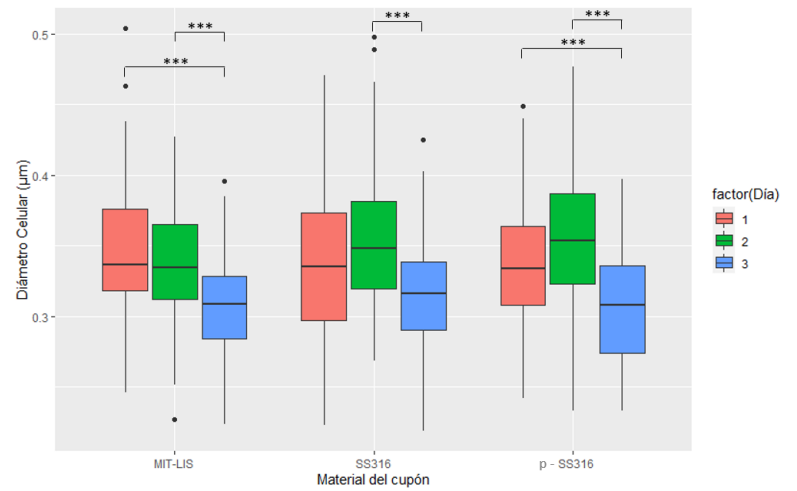


Figura 7.9: Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en LBK en g-terrestre, utilizando los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS

En cuanto al diámetro celular, se cuenta con mucha variabilidad. Para comenzar, en g-terrestre en el cultivo con el material SS316, es posible ver que hay una diferencia entre el diámetro de las células en el cultivo del día 2 y el día 3 (valor-p <5***), siendo el diámetro de las células del día 2 mayor al de las células del día 3 en un 15.9%. Por otro lado, no hay diferencia significativa en el diámetro de las células del día 1 y el día 2 para el mismo material, y tampoco entre los días 1 y 3. En cuanto a las bacterias cultivadas en el material p-SS316 en g-terrestre, se encontró que hay una diferencia significativa entre la media del diámetro de las células del día 1 y 3 (valor-p <5***), siendo las células del día 1 más largas que las del día 3 en un 1.15%. También hay una diferencia entre el día 2 y 3 (valor-p <5***), siendo las del día 2 igualmente más largas que las del día 3 en un 5.9%. Sin embargo, no hay diferencia entre los días 1 y 2. En cuanto al diámetro de las células

cultivadas en MIT-LIS, se encontró que existe una diferencia significativa entre el diámetro de sus células entre el día 3 y el día 2 (valor-p <5***) en un 30.9% y también en el diámetro de las células del día 1 y el día 3 (valor-p <5***), siendo las del día 3 más largas en un 28.9%. Sin embargo, no hay diferencia entre el diámetro de las células en el día 1 y 2. En el caso del día 3 en g-terrestre con el MIT-LIS, la célula muestra un diámetro mucho mayor al del resto de los datos, sin embargo, no se tienen datos sobre una relación entre el uso de LIS y el incremento en el tamaño celular, por lo que se recomienda profundizar en marcadores que puedan explicar esos cambios. Además, se ve una relación entre el largo y el ancho celular: cuando el largo celular es pequeño, el diámetro es grande; y cuando el largo es mayor, el ancho, es menor. La diferencia entre el día 2 y 3 de SS316 por otro lado, puede deberse a que, en el día 3, las células ya estaban formando septos de separación para la formación de nuevas células hijas mientras que en el día 2 tal vez seguían en otro momento de su fase, como la última punta de su crecimiento exponencial. Por otro lado, las diferencias que se encuentran en el día 1 y 2 con el día 3, es nuevamente gracias a que en el día 3, se encuentran las células más largas y, probablemente, con el septo más angosto.

Diferencias en el diámetro celular en micro-g, de las células cultivadas en LBK con los materiales de MIT-LIS, SS316 y p-SS316

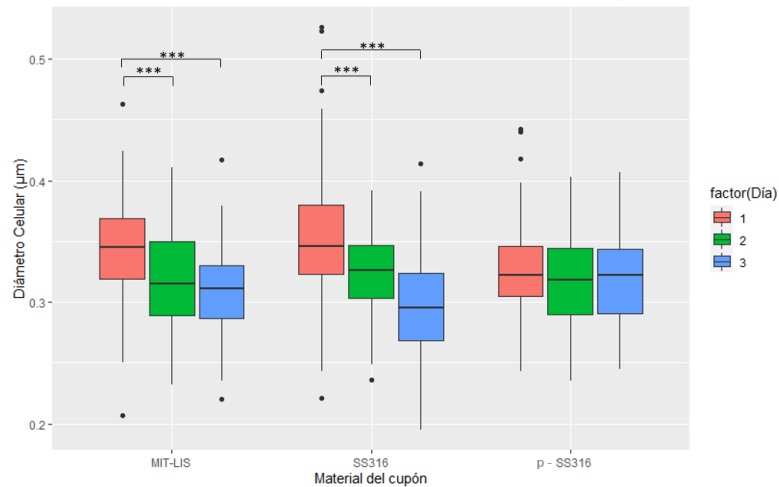


Figura 7.10: Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en LBK en micro-g, utilizando los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS.

En los cultivos de micro-g (Figura 7.10), se vio una tendencia parecida. Se observó una diferencia significativa en el diámetro celular de los cultivos en el día 1, 2 y 3 del material SS316, Siendo el diámetro celular del día 1 significativamente mayor al del día 2 (valor-p <0.05 *) en un 7.8% y al del día 3 (valor-p <0.05 ***) en , y además, siendo el diámetro del día 2 significativamente mayor al diámetro del día 3 (valor-p <0.05 ***) en un 8.7%. Esto nuevamente concuerda con el largo celular de manera inversa. El día en el que la célula cuenta con el menor largo celular, cuenta con el mayor diámetro. Esto se puede deber a que la célula se encuentra en su estado inicial en el día 1 y va disminuyendo su diámetro conforme las células se van alargando para lograr finalmente formar el septo. Otra explicación de por qué el diámetro aumenta cuando el largo aumenta, va más de la mano con la disponibilidad de nutrientes en el medio. Cuando la disponibilidad de nutrientes es baja, la célula debe de comenzar a aumentar su volumen (radio largo/ancho), para poder obtener una mayor cantidad de nutrientes. Por otro lado, cuando la célula encuentra alimento, debe disminuirlo (Ursell y cols., 2017). Esto indicaría que, en el primer día, las células planctónicas compiten con las sésiles por los nutrientes, por lo que deben aumentar su volumen. Mientras pasan los días y el biofilm va madurando, deja más disponibilidad de alimento para las células planctónicas y estas pueden finalmente, disminuir su volumen.

Diferencias en el diámetro de las células cultivadas en LBK con los materiales de MIT-LIS, SS316 y p-SS316, en el primer día

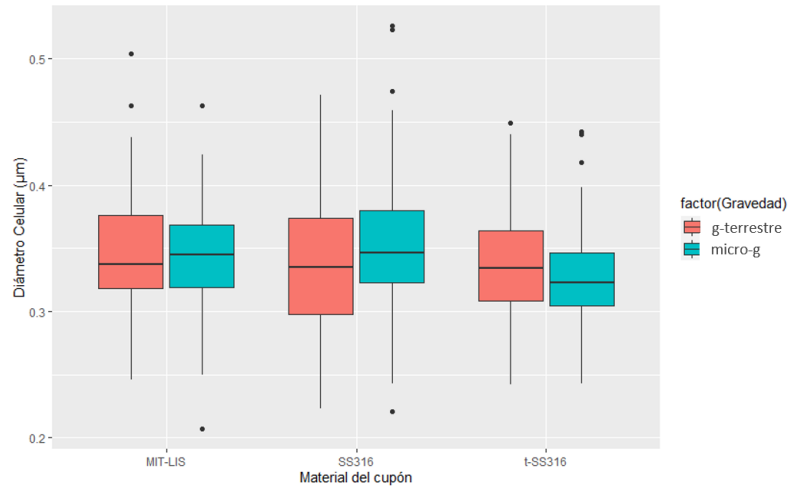


Figura 7.11: Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en LBK en micro-g y g-terrestre, utilizando los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS en el día 1

En el día 1 (Figura 7.11), no se encuentran diferencias estadísticas entre las muestras en g-terrestre y micro-g de ninguno de los materiales. No obstante, se ve una posible tendencia a un mayor diámetro en el MIT-LIS y SS316 en las células cultivadas en micro-g, mientras que en p-SS316, se ve una posible tendencia a un menor diámetro en estas células. En estos casos, el diámetro nuevamente es inverso a la longitud, siendo que las células más largas tienen el diámetro más pequeño, mientras que las células más cortas, tienen el diámetro más ancho.

Esta falta de diferencia estadística puede indicar que en el primer día de cultivo, se tienen condiciones parecidas en cuanto a la opción de nutrientes para las células planctónicas, haciendo que no se favorezca el agrandamiento del diámetro celular.

Diferencias en el diámetro de las células cultivadas en LBK con los materiales de MIT-LIS, SS316 y p-SS316, en el segundo día

Para el día 2, se muestra que el diámetro de las células crecidas en g-terrestre, son estadísticamente significativas al comparar con el diámetro de las células crecidas en micro-g para dos materiales: SS316 (valor-p < 0.05 ***), p-SS316 (valor-p < 0.05 ***), siendo los diámetros terrestres, los mayores por 8.9% para las células de SS316 y por 10.3% para las de p-SS316. Esto sigue el principio de homogeneidad de nutrientes en el medio de cultivo, ya que, en micro-g, la falta de fuerza ejercida por la gravedad, evita que los nutrientes se sedimenten y permite que se distribuyan de manera más homogénea en un medio (Huang y cols., 2018). Esto también sigue el principio de que, a mayor disponibilidad de nutrientes, menor el volumen de la bacteria. También se reporta que el número total de células normalmente en este tipo de estudios es mayor para micro-g, pero con un menor tamaño de célula.

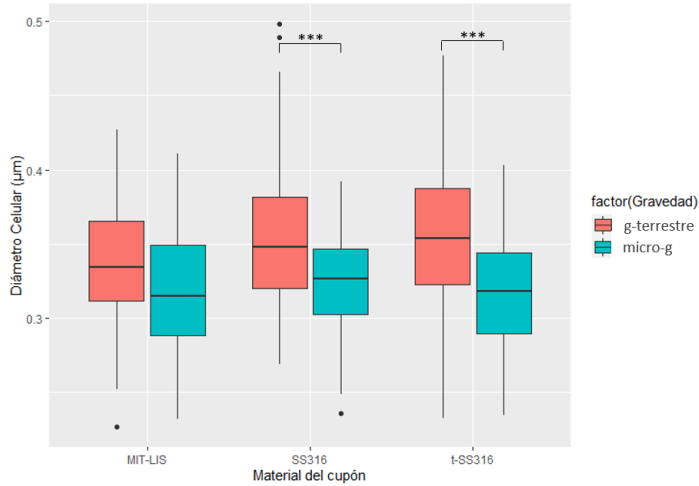


Figura 7.12: Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en LBK en micro-g y g-terrestre, utilizando los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS en el segundo día.

Diferencias en el diámetro de las células cultivadas en LBK con los materiales de MIT-LIS, SS316 y p-SS316, en el tercer día.

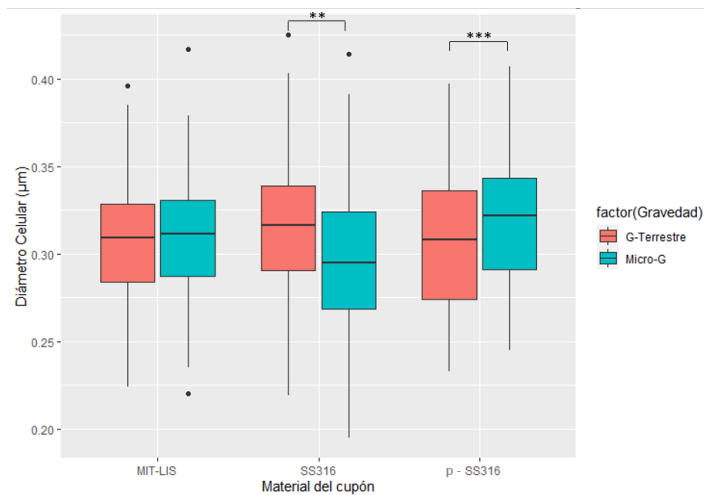


Figura 7.13: Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en LBK en micro-g y g-terrestre, utilizando los cupones de SS316, p-SS316 y MIT-LIS en el tercer día.

Finalmente, para el día 3 se observa que hay una diferencia en el diámetro de las células crecidas en SS316 en g-terrestre y las crecidas en micro-g (valor-p <0.05 **), además de haber diferencia en el cultivo en micro-g de p-SS316 y SS316 (valor-p <0.05 ***). La primera diferencia que se encuentra se da principalmente por los datos atípicos del diámetro en micro-g. La segunda diferencia va acorde a al tamaño de las células en el cultivo.

7.5.2. Medio de cultivo mAUMg-high Pi

A diferencia de las células cultivadas en LB, las células crecidas en medio de orina artificial tienen un crecimiento un tanto distinto. A pesar de que las células de *P. aeruginosa* pueden crecer en medio

anaerobio por medio del uso de nitrato o nitrito (Zumft, 1997), este tipo de crecimiento anaerobio viene de la mano con un alargamiento en las células (Yoon y cols., 2011). Además, el medio de cultivo LBK tiene menos nutrientes: triptona, extracto de levadura, NaCl y agua destilada, a comparación del medio de cultivo mAUMg-high Pi que contiene: ácido cítrico, glucosa, ácido láctico, cloruro de sodio, cloruro de amonio, solución de aminoácidos RPMI 1640, L-glutamina, Urea, ácido úrico y muchos componentes más. Este segundo medio, simula el ambiente en el que residen las células que invaden catéteres hospitalarios y demás materiales de la salud. Se sabe que, en condiciones aerobias, el medio mAUMg-high Pi provoca que las células de *P. aeruginosa*, inicien su fase de crecimiento exponencial antes, sin embargo, el crecimiento total de estas células es menor en mAUMg-high Pi que en LB. Esto es debido a cambios en la cinética del crecimiento. El cambio clave, es que las células cultivadas en mAUMg-high Pi llegaban a su fase estacionaria a las 6 horas en el medio mAUMg-high Pi, mientras que en el medio LBK, lo hacen luego de las 15 horas (Liang y cols., 2020). Sin embargo, el tiempo de crecimiento (o curva de crecimiento), de *P. aeruginosa* en condiciones anaerobias con medio mAUMg-high Pi, no ha sido definido aún. Teniendo en cuenta la posibilidad de un menor tiempo necesario para comenzar las fases log y estacionaria, comparamos en este estudio de igual manera, los cambios en el largo y ancho celular de células cultivadas en este medio, haciendo uso de 3 materiales distintos y 2 variables de gravedad.

Diferencias en el largo celular en g-terrestre, de las células cultivadas en mAUMg-high Pi con los materiales de Silicone, Silicone-DLIP y Cellulose membrane

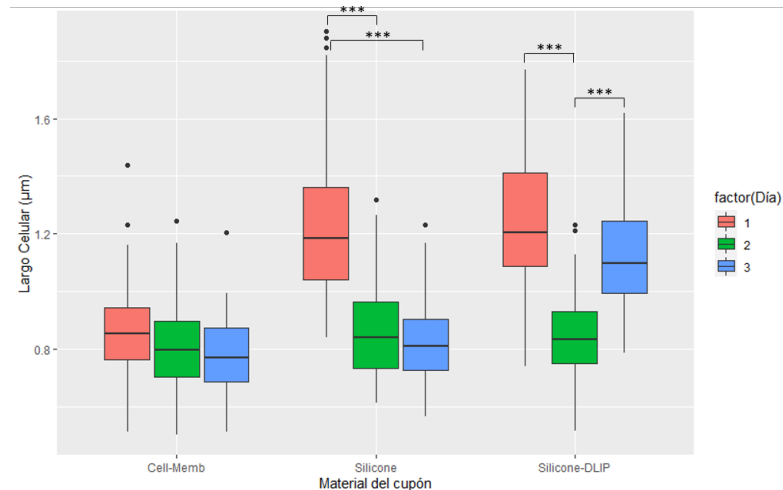


Figura 7.14: Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre y micro-g, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP.

Para comenzar, en g-terrestre no se observa una diferencia significativa en el largo de las células cultivadas con Cellulose Membrane (Cell Memb) a lo largo de los días.

Por su lado, las bacterias cultivadas con Silicone muestran un pico en el largo celular en el día 1, y luego este largo disminuye. Las células del día 1 son significativamente más largas que las del día 3 (valor-p < 0.05 ***), siendo las células del día 1 más largas en un 32.5%. Igualmente, las células del día 1 al ser comparadas con las células del día 2 del cultivo en silicone, indican ser significativamente distintas (valor-p < 0.05 ***), siendo las células del día 1 más largas en un 30.1%. En conjunto, las células cultivadas con el material Silicone-DLIP, muestran una diferencia significativa entre ellas, siendo que las células del día 1 son significativamente más largas que las células del día 2 (valor-p < 0.05 ***) en un 31.1%. A su vez, el largo de las células del día 3 es significativamente más alto que el de las células en el día 2 (valor-p < 0.05 ***) en un 24.7%.

Diferencias en el largo celular en micro-g, de las células cultivadas en mAUMg-high Pi con los materiales de Silicone, Silicone-DLIP y Cellulose membrane

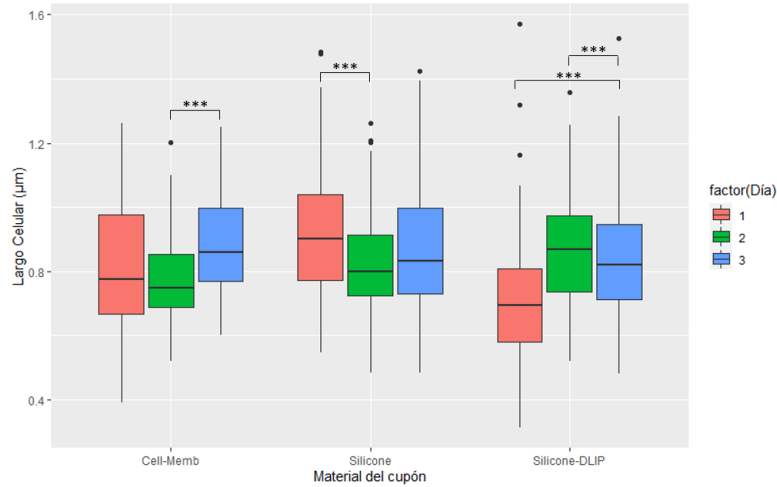


Figura 7.15: Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en micro-g y g-terrestre, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP.

En micro-g, sin embargo, las células cultivadas en medio mAUMg-high Pi, con el material de Cellulose Membrane, mostraron una diferencia significativa en el día 2 y día 3 de cultivo (valor-p <0.05 **), siendo las células del día 2 estadísticamente más cortas que las células del día 3 en un 11.5%. Por otro lado, las células de Silicone en el día 1, mostraron ser estadísticamente distintas a las células del día 2 (valor-p <0.05 ***) en un 10.6% y a las del día 3 (valor-p <0.05 ***) en un 5.9%, siendo las del día 1 más largas que esas dos.

A diferencia de las células en g-terrestre, las células de micro-g no muestran largos extremos en los materiales de Silicone y Silicone-DLIP.

Diferencias en el largo de las células cultivadas en mAUMg-high Pi con los materiales de Silicone, Silicone-DLIP y Cellulose membrane en el primer día

En el día 1, se ve una diferencia significativa entre el largo de las células de Silicone en micro-g y en g-terrestre (valor-p <0.05 ***), siendo las células en g-terrestre un 24.9% más largas que las células en micro-g. Igualmente, en las células de Silicone-DLIP se ve la misma diferencia significativa (valor-p <0.05 ***), siendo nuevamente las células en g-terrestre 41.8% más largas que las de micro-g. En este momento, el largo tan grande de las células de Silicone y Silicone-DLIP, podría deberse a un desprendimiento de células del biofilm a su forma de vida planctónica. Sin embargo, sería necesario realizar tinciones de flagelos para asegurar si esta hipótesis es acertada o no.

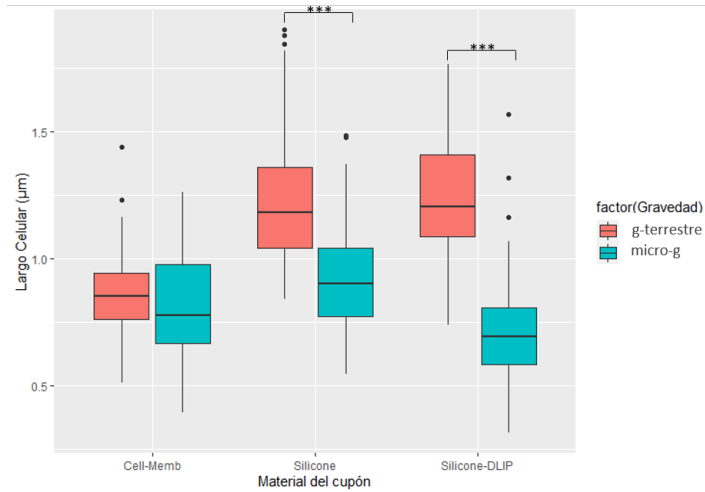


Figura 7.16: Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre y micro-g, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP en el primer día.

Diferencias en el largo de las células cultivadas en mAUMg-high Pi con los materiales de Silicone, Silicone-DLIP y Cellulose membrane en el segundo día

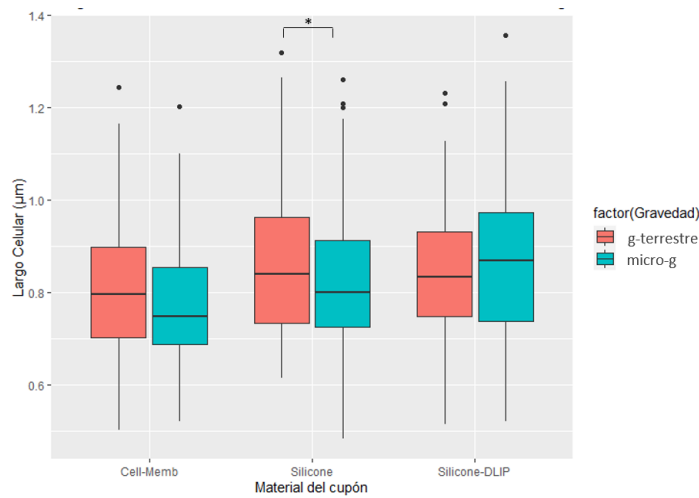


Figura 7.17: Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre y micro-g, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP en el segundo día.

Para el día 2, se observa una diferencia significativa del largo celular en el cultivo con Silicone, siendo las células en g-terrestre, significativamente más largas (valor-p < 0.05*) que las de micro-g, en un 4.01%. Además, se ve una tendencia un poco más normalizada a que nuevamente, las células en g-terrestre sean más largas que las células en micro-g, a excepción de los cultivos realizados con Silicone-DLIP.

Diferencias en el largo de las células cultivadas en mAUMg-high Pi con los materiales de Silicone, Silicone-DLIP y Cellulose membrane en el tercer día

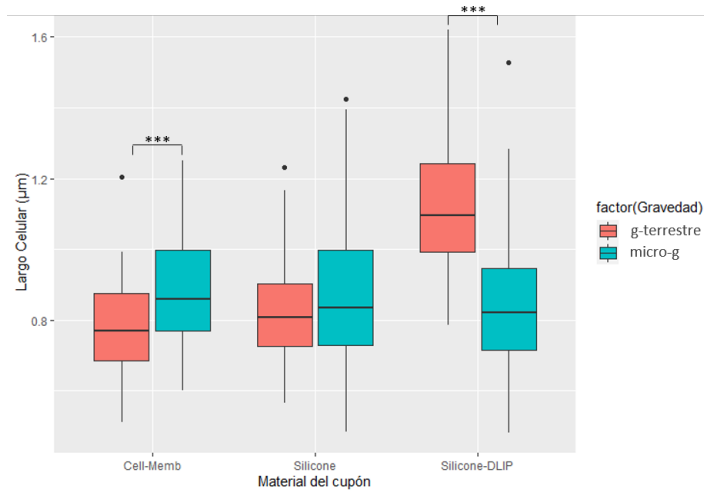


Figura 7.18: Comparación de largo celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre y micro-g, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP en el tercer día.

Finalmente, en el día 3, se ve una diferencia significativa entre las células de Cellulose Membrane en micro-g y g-terrestre, siendo las células de micro-g, significativamente más largas que las células en g-terrestre (valor-p <0.05**), siendo las células de micro-g un 12.6% más largas. Las células de Silicone-DLIP en micro-g, mostraron ser estadísticamente distintas a las de g-terrestre, siendo las células de Silicone-DLIP en g-terrestre significativamente más grandes que las cultivadas en micro-g (valor-p <0.05***), en un 25.2%. Además, cabe denotar que en Silicone en este día, no hay una diferencia ni una tendencia en el largo celular de los dos tratamientos gravitacionales.

Discusión sobre el largo celular en mAUMg-high Pi y sus distintos tratamientos

Lo interesante de las células medidas para Silicone y Silicone-DLIP, en el día 1, es que son más grandes que la media del resto de células. Esto, en conjunto con que las células cultivadas en mAUMg-high Pi alcanzan su fase estacionaria rápidamente, hace pensar en la posibilidad de que las células alargadas del primer día, sean en realidad, células separadas de biofilm por medio de un proceso de dispersión de tipo activo, donde se deja un espacio grande y vacío en la matriz de biofilms de la cual provienen dichas células. Esta hipótesis viene del hecho que el alargamiento celular está relacionado con el crecimiento de *Pseudomonas* en condiciones anaeróbicas, pero con respiración inducida por nitrato. Este alargamiento se propone por (Yoon y cols., 2011), como consecuencia de una división celular defectuosa. Esta elongación defectuosa a su vez, causa biofilms más débiles (Yoon y cols., 2011).

El tipo de cultivo con el cual se está trabajando (con una respiración activada por nitrato), induce una mayor formación de Biofilm (W. Kim y cols., 2013). Lo que quiere decir que el biofilm que se forme, contará con una característica más débil y células más largas. Sería interesante revisar la matriz de los biofilms en el día 1 de Silicone y Silicone DLIP para observar si se tiene desprendimiento de células que pasan de vida sésil a vida libre por culpa de una elongación defectuosa y una unión al biofilm, débil.

También hay que recordar que se vio una tendencia a un mayor largo celular en las células cultivadas en g-terrestre, lo cual es contrario a lo esperado según la literatura. Esto podría indicar que, a pesar de que la micro-g favorece un crecimiento de biopelículas, la g-terrestre, bajo estas

condiciones de medios y materiales, va a favorecer aún más a las células para este tipo de estructura y posiblemente, su dispersión.

Diferencias en el diámetro celular en g-terrestre, de las células cultivadas en mAUMg-high Pi con los materiales de Cell Membrane, Silicone y Silicone-DLIP.

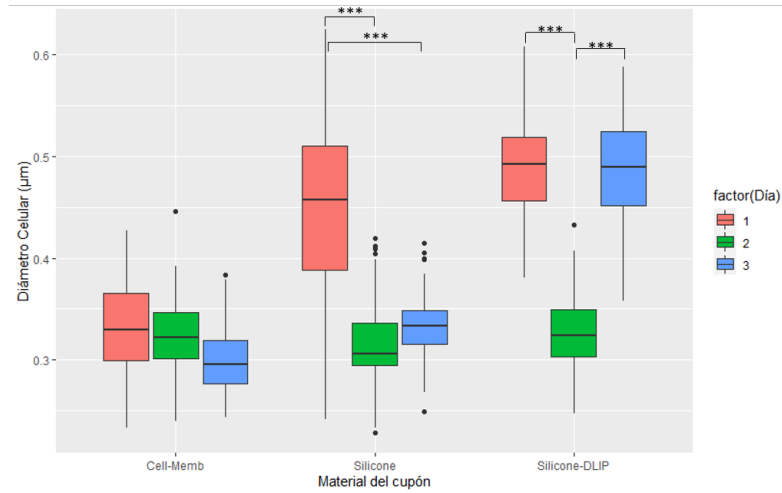


Figura 7.19: Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en g-terrestre, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP.

En cuanto al diámetro celular, en g-terrestre, se observan bastantes diferencias significativas. El diámetro celular de las células cultivadas con Cell Memb en el día 3, muestran ser significativamente distintas a las células del día 1, siendo las células del día 1 más anchas (valor-p <0.05***) que las del día 3 en un 27.5 %. Igualmente existe una diferencia en el diámetro celular de las células de Cell membrane del día 2 (valor-p <0.05*), siendo las células del día 1 30.2% más anchas que las del día 2.

El diámetro de las células de Silicone mostraron ser distintas entre sí a través de los días, siendo las células del día 1 significativamente más anchas que las del día 2 (valor-p <0.05***) en un 30.2%, e igualmente, significativamente distintas a las del día 3 (valor-p <0.05***) en un 25.7%. Las células de Silicone DLIP fueron también distintas entre sí entre el día 2 y 3, siendo las del día 2, significativamente más pequeñas que las del día 3 en un 32.8% y las del día 2, significativamente más pequeñas que las del día 1 en un 33.0%.

Diferencias en el diámetro celular en micro-g, de las células cultivadas en mAUMg-high Pi con los materiales de Cell Membrane, Silicone y Silicone-DLIP.

En micro-g, las células de Silicone en el día 1 mostraron diferencia significativa en el diámetro a comparación de las mismas en el día 2 (valor-p <0.05***) y a las del día 3 (valor-p <0.05***), siendo las células del día 1, significativamente más anchas que las de los días 2 (13.9%) y 3 (18.73%). Finalmente, las células de Silicone DLIP también mostraron diferencia entre ellas, siendo las células de Silicone DLIP del día 3, estadísticamente más angostas que las del día 1 (valor-p <0.05*** 7.13% y que las del día 2 (valor-p <0.05**) 7.64%.

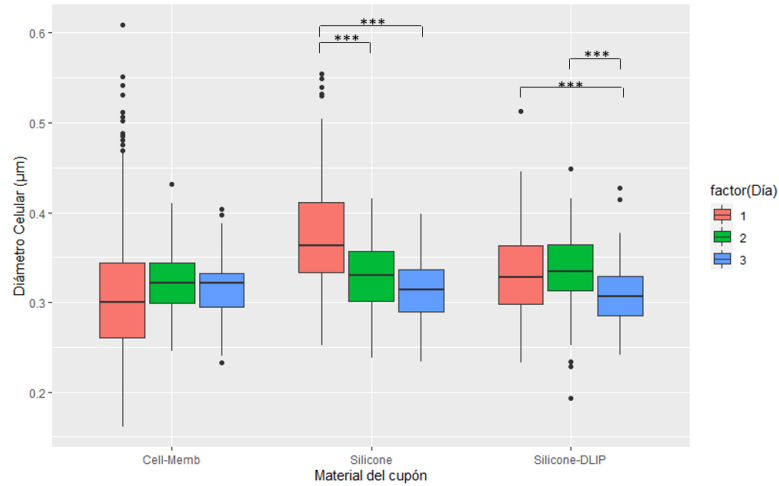


Figura 7.20: Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi en micro-g, utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP.

Diferencias en el diámetro celular de las células cultivadas en mAUMg-high Pi con los materiales de Cell Membrane, Silicone y Silicone-DLIP, en el primer día.

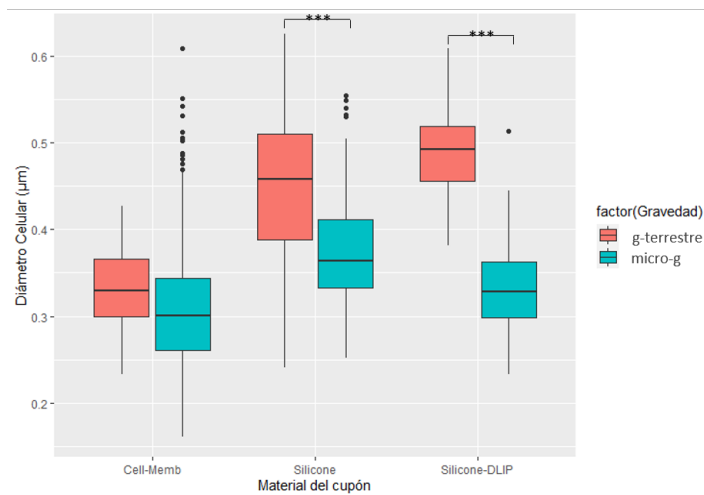


Figura 7.21: Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP, en el primer día.

Además de eso, en el día 1, las células de Silicone en g-terrestre mostraron ser distintas a las células en micro-g (valor-p <0.05***), siendo las células de silicone en g-terrestre un 14.9% más anchas que las de micro-g. Igualmente, las células de Silicone-DLIP en el día 1, en g-terrestre, mostraron ser estadísticamente más anchas que las células de Silicone-DLIP en el día 1, en micro-g (valor-p <0.05***) en un 32.0%.

Diferencias en el diámetro celular de las células cultivadas en mAUMg-high Pi con los materiales de Cell Membrane, Silicone y Silicone-DLIP, en el segundo día.

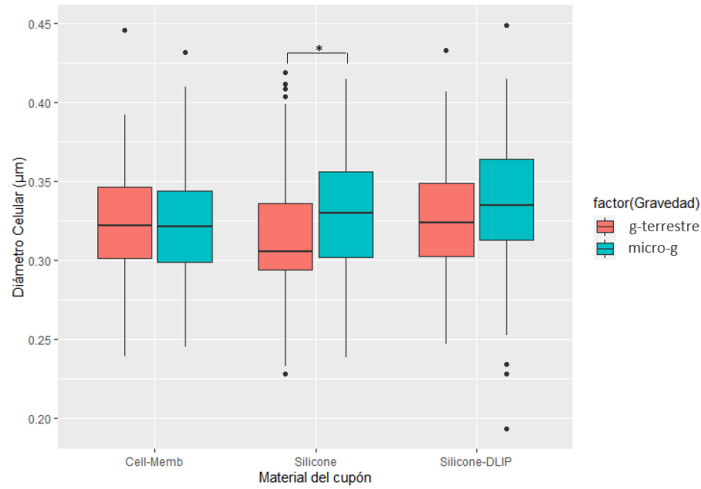


Figura 7.22: Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP, en el segundo día.

En el día 2, las células de Silicone en micro-g mostraron ser estadísticamente distintas a las de g-terrestre, siendo de g-terrestre, más angostas que las de micro-g (valor-p <0.05*) en un 4.81 %. Y se ve una tendencia a un mayor diámetro celular para las de micro-g, que para las de g-terrestre.

Diferencias en el diámetro celular de las células cultivadas en mAUMg-high Pi con los materiales de Cell Membrane, Silicone y Silicone-DLIP, en el tercer día.

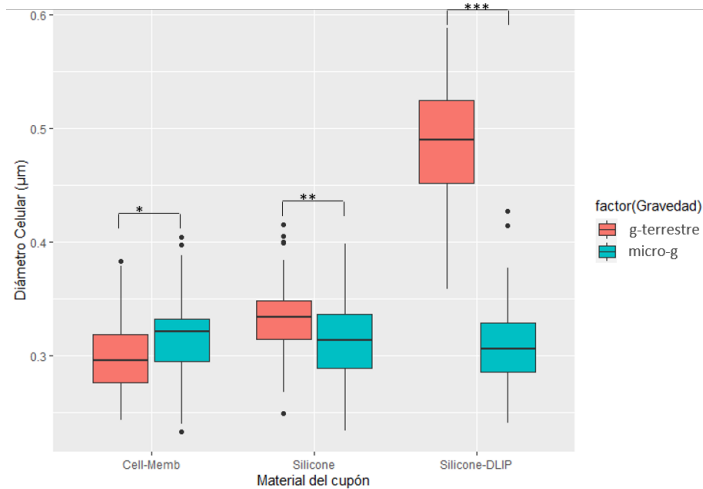


Figura 7.23: Comparación de diámetro celular de bacterias cultivadas en mAUMg-high Pi utilizando los cupones de Cellulose membrane, Silicone y Silicone-DLIP, en el segundo día.

Finalmente, en el día 3, se muestra una diferencia significativa en el diámetro de las células terrestres de cell membrane con las de micro-g (valor-p <0.05*), siendo las de g-terrestre más anchas que las de la micro-g en un 5.57 %. Además, en Silicone, las células en g-terrestre mostraron ser estadísticamente más largas que las de micro-g (valor-p <0.05*) en un 6.31 %. Finalmente, las células

en silicone DLIP en g-terrestre, mostraron ser estadísticamente distintas a las de alas de silicone DLIP en micro-g (valor-p <0.05***), siendo las de g-terrestre, mucho más anchas que las de micro-g en un 36.7%.

Discusión sobre diferencia en el diámetro de las células cultivadas en mAUMg-high Pi.

En este caso, vemos que las células alargadas probablemente con fallos en la replicación, con igualmente fallos en la formación del septo y separación de las células hijas. Para probar esta hipótesis sería necesario hacer tinción de flagelos para comparar si las células largas de Silicone y SiliconeDLIP, cuentan con él. Si cuentan con flagelo, quiere decir que son células planctónicas con fallos en la replicación por su estilo de vida anaeróbico, mientras que si no tiene flagelo, se comprueba que son células provenientes del biofilm. Algo que sí es observable en estos resultados y son comparables con los obtenidos en el medio LBK, es que en este caso, el diámetro celular acompaña al aumento en el largo, en lugar de ir a la inversa. Este acompañamiento dimensional puede estar relacionado con el dato anteriormente mencionado sobre la necesidad de acceder a nutrientes. Sin embargo, no es posible confirmar esta hipótesis hasta no comprobar estos cambios de manera molecular ya sea con cuantificación de proteínas, como con análisis de expresión genética.

A diferencia del caso anterior de células cultivadas en LBK donde el diámetro era inverso al largo, el diámetro celular de estas muestra ser afín al largo. Por lo que las células con un mayor largo son también las células con un mayor ancho, soportando la idea de posibles fallos en la formación del septum de separación al momento de comenzar su proceso de replicación y por ende, una fallida reproducción celular.

En las células fijadoras de nitrógeno, el estar expuestas a situaciones aeróbicas las hace aumentar su volumen, lo que se cree que ocurre para que las células puedan proteger su nitrogenasa (Sabra, Zeng, Lünsdorf, y Deckwer, 2000). Este volumen va disminuyendo conforme se va aumentando la composición anaerobia del medio. Esto puede indicar que las células que van aumentando su tamaño, en largo o diámetro, podría ser debido a una búsqueda de protección de la nitrogenasa disponible. En este caso, las células cultivadas en mAUMg-high Pi, deberían haber expresado una gran burbuja de aire en el primer día para Silicone y Silicone-DLIP, que fuese disminuyendo conforme los días. Sería interesante poder comparar esas características del cultivo para asegurar si el aumento en largo o diámetro, se pudiera deber a esta protección de la nitrogenasa.

Conclusiones

Se determinó la existencia de una diferencia estadísticamente significativa en el diámetro y largo de células planctónicas de *P. aeruginosa* cultivadas en microgravedad en medios de cultivo y los materiales de interés. Para el medio de cultivo LBK, y los materiales MIT-LIS, SS316 y p-SS316, se determinó que las células alcanzan su mayor largo en el día 3 para todos los materiales. Además, este cambio en el largo se vio reflejado igualmente en el diámetro celular, sin embargo, con un efecto inverso donde, para el material MIT-LIS y SS316, las células con el diámetro más largo se encontraron en el primer día. Por otro lado, en el caso del medio de cultivo mAUMg-high Pi, se comprobó que el comportamiento es completamente distinto al de las células en LBK. El día con las células más largas para Cellulose Membrane y Silicone fueron el día 3, mientras que para Silicone-DLIP, fue el segundo día. Por otro lado, para las células cultivadas con Cellular membrane y Silicone-DLIP, el día 2 fue el día con las células de mayor diámetro, mientras que para el Silicone, fue el día 1. Dicho esto, se logró el objetivo de determinar si existe una diferencia en el largo y diámetro celular dependiendo del día del cultivo para microgravedad.

También se determinó la existencia de una diferencia estadísticamente significativa en el diámetro y largo celular en gravedad terrestre, en diferentes medios de cultivo y materiales de interés. En el caso de la gravedad terrestre, se logró identificar en el medio LBK y materiales MIT-LIS, SS316 y p-SS316, que el día con las células de mayor largo es el día 3 y, para SS316, este largo comienza desde el día 2. El diámetro, por otro lado, fue mayor en los días 1 y 2 para todos los materiales. En cuanto al medio de cultivo mAUMg-high Pi y los materiales Cellular membrane, Silicone y Silicone-DLIP, se encontró que el largo de celular en cellular membrane, no varía significativamente. No obstante, para Silicone y Silicone-DLIP, el día con el mayor largo celular resulta ser el día 1. Para Silicone-DLIP, este largo disminuye drásticamente en el día 2 y vuelve a aumentar en el día 3. En cuanto al diámetro, se logró determinar que el diámetro era igualmente el mayor en el día 1 para Silicone y Silicone-DLIP, además de volver a aumentar en el día 3 para Silicone-DLIP. Dicho esto, se logró el objetivo de determinar si existe una diferencia en el largo y diámetro celular dependiendo del día del cultivo para gravedad terrestre.

Finalmente, se cumplió con el objetivo de determinar si existe una diferencia entre el largo y el diámetro celular dependiendo de la gravedad, siendo que para los materiales de SS316, p-SS316, Silicone y Silicone-DLIP, el largo es mayor para las células cultivadas en gravedad terrestre, que para las cultivadas en microgravedad. Solamente se ve una diferencia entre gravedad terrestre de Cellular membrane hasta el tercer día, donde los papeles se invierten y las células cultivadas en microgravedad, se vuelven las que tienen el mayor largo y el mayor diámetro.

Recomendaciones

Se recomienda elegir marcadores específicos para identificar de manera correcta, cuáles son los mecanismos por los cuales se está desarrollando un mayor largo y ancho celular en las muestras presentes. Además, se recomienda hacer un análisis multivariado para identificar específicamente cuál (o cuáles), es el factor que está desarrollando un alargamiento o ensanchamiento celular, de células planctónicas de *P. aeruginosa* en gravedad terrestre y microgravedad.

Referencias

- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., ... Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of dna release in pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. *Molecular microbiology*, 59(4), 1114–1128.
- Almblad, H., Rybtke, M., Hendiani, S., Andersen, J. B., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2019). High levels of camp inhibit pseudomonas aeruginosa biofilm formation through reduction of the c-di-gmp content. *Microbiology*, 165(3), 324–333.
- Arai, H. (2011). Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in microbiology*, 2, 103.
- Baldani, J., Baldani, V., Seldin, L., y Döbereiner, J. (1986). Characterization of herbaspirillum seropedicae gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(1), 86–93.
- Basta, D. W., Angeles-Albores, D., Spero, M. A., Ciemniecki, J. A., y Newman, D. K. (2020). Heat-shock proteases promote survival of pseudomonas aeruginosa during growth arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(8), 4358–4367.
- Benoit, M., Li, W., Stodieck, L., Lam, K., Winther, C., Roane, T., y Klaus, D. (2006). Microbial antibiotic production aboard the international space station. *Applied microbiology and biotechnology*, 70(4), 403–411.
- Boles, B. R., Thoendel, M., y Singh, P. K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of pseudomonas aeruginosa from biofilms. *Molecular microbiology*, 57(5), 1210–1223.
- BSBE, S. G. (2018). Characterization of pseudomonas aeruginosa growth patterns under varying gravitational regimes.
- Byloos, B., Coninx, I., Van Hoey, O., Cockell, C., Nicholson, N., Ilyin, V., ... Leys, N. (2017). The impact of space flight on survival and interaction of cupriavidus metallidurans ch34 with basalt, a volcanic moon analog rock. *Frontiers in microbiology*, 8, 671.
- Caiazza, N. C., Merritt, J. H., Brothers, K. M., y O’Toole, G. A. (2007). Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by pseudomonas aeruginosa pa14. *Journal of bacteriology*, 189(9), 3603–3612.
- Callahan, M. R., Adam, N. M., Roberts, M. S., Garland, J. L., Sager, J. C., y Pickering, K. D. (2007). Assessment of silver based disinfection technology for cev and future us spacecraft. *SAE Transactions*, 481–491.

- Carniello, V., Peterson, B. W., van der Mei, H. C., y Busscher, H. J. (2018). Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Advances in colloid and interface science*, 261, 1–14.
- Chew, S., y Yang, L. (2016). Biofilms.
- Chiang, W.-C., Nilsson, M., Jensen, P. Ø., Høiby, N., Nielsen, T. E., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2013). Extracellular dna shields against aminoglycosides in pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(5), 2352–2361.
- Chua, S. L., Sivakumar, K., Rybtke, M., Yuan, M., Andersen, J. B., Nielsen, T. E., ... others (2015). C-di-gmp regulates pseudomonas aeruginosa stress response to tellurite during both planktonic and biofilm modes of growth. *Scientific reports*, 5(1), 1–13.
- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 11(3-4), 217–221.
- Crabbé, A., Nielsen-Preiss, S. M., Woolley, C. M., Barrila, J., Buchanan, K., McCracken, J., ... others (2013). Spaceflight enhances cell aggregation and random budding in candida albicans. *PLoS One*, 8(12), e80677.
- Crabbé, A., Pycke, B., Van Houdt, R., Monsieurs, P., Nickerson, C., Leys, N., y Cornelis, P. (2010). Response of pseudomonas aeruginosa pao1 to low shear modelled microgravity involves alga regulation. *Environmental microbiology*, 12(6), 1545–1564.
- Crabbé, A., Schurr, M. J., Monsieurs, P., Morici, L., Schurr, J., Wilson, J. W., ... others (2011). Transcriptional and proteomic responses of pseudomonas aeruginosa pao1 to spaceflight conditions involve hfq regulation and reveal a role for oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1221–1230.
- Deforet, M., Van Ditmarsch, D., y Xavier, J. B. (2015). Cell-size homeostasis and the incremental rule in a bacterial pathogen. *Biophysical journal*, 109(3), 521–528.
- De Kievit, T. (2009). Quorum sensing in pseudomonas aeruginosa biofilms. *Environmental microbiology*, 11(2), 279–288.
- Diaz, A., Li, W., Calle, L., Callahan, M., y Irwin, T. (2019). Investigation of biofilm formation and control for spacecraft-an early literature review..
- Donachie, W., Begg, K., y Vicente, M. (1976). Cell length, cell growth and cell division. *Nature*, 264(5584), 328–333.
- Donlan, R. M., y Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167–193.
- Dunne Jr, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 155–166.
- Fajardo-Cavazos, P., y Nicholson, W. L. (2021). Mechanotransduction in prokaryotes: A possible mechanism of spaceflight adaptation. *Life*, 11(1), 33.
- Flores, M. L. C. H. D. W. C. M. M. H. S. V. F. T. R. G. R. Z. L., Schauer. (2021). Preparation for and performance of a pseudomonas aeruginosa biofilm experiment on board the international space station. *IAC-21,A2,7,2,x65214, 72nd International Astronautical Congress (IAC) 2021, Dubai, United Arab Emirates*, 72(1).
- Goodband, S. J., Armstrong, S., Kusumaatmaja, H., y Vortchovsky, K. (2020). Effect of ageing on the structure and properties of model liquid-infused surfaces. *Langmuir*, 36(13), 3461–3470.
- Grekov, I., Thöming, J. G., Kordes, A., y Häussler, S. (2021). Evolution of pseudomonas aeruginosa toward higher fitness under standard laboratory conditions. *The ISME journal*, 15(4), 1165–1177.
- Gu, J.-D., Roman, M., Esselman, T., y Mitchell, R. (1998). The role of microbial biofilms in deterioration of space station candidate materials. *International biodeterioration & biodegradation*, 41(1), 25–33.
- Hall, C. W., Hinz, A. J., Gagnon, L. B.-P., Zhang, L., Nadeau, J.-P., Copeland, S., ... Mah, T.-F. (2018). Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance gene ndvb expression requires the rpos stationary-phase sigma factor. *Applied and environmental microbiology*, 84(7), e02762–17.
- Hernandez, D., y Rowe, J. J. (1987). Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying pseudomonas aeruginosa. *Applied and environmental microbiology*, 53(4), 745–750.

- Huang, B., Li, D.-G., Huang, Y., y Liu, C.-T. (2018). Effects of spaceflight and simulated microgravity on microbial growth and secondary metabolism. *Military Medical Research*, 5(1), 1–14.
- Janik, D., Crump, W., Macler, B., Wydeven Jr, T., y Sauer, R. (s.f.). Problems in water recycling for space station freedom and long duration life support.
- Jiang, X.-R., Wang, H., Shen, R., y Chen, G.-Q. (2015). Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation. *Metabolic engineering*, 29, 227–237.
- Jiang, X.-R., Yao, Z.-H., y Chen, G.-Q. (2017). Controlling cell volume for efficient phb production by halomonas. *Metabolic engineering*, 44, 30–37.
- Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B., y Biggs, C. A. (2011). “biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(6), 1869–1881.
- Kim, S.-H., Lee, B.-Y., Lau, G. W., y Cho, Y.-H. (2009). IscR modulates catalase (kata) activity, peroxide resistance, and full virulence of pseudomonas aeruginosa pa14. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19(12), 1520–1526.
- Kim, W., Tengra, F. K., Young, Z., Shong, J., Marchand, N., Chan, H. K., ... others (2013). Spaceflight promotes biofilm formation by pseudomonas aeruginosa. *PloS one*, 8(4), e62437.
- Lam, K., Gustavson, D., Pirnik, D., Pack, E., Bulanlagui, C., Mamber, S., ... Klaus, D. (2002). The effect of space flight on the production of actinomycin d by streptomyces plicatus. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 299–302.
- Lam, K., Mamber, S., Pack, E., Forenza, S., Fernandes, P., y Klaus, D. (1998). The effects of space flight on the production of monorden by humicola fuscoatra wc5157 in solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 49(5), 579–583.
- Le, S., Yao, X., Lu, S., Tan, Y., Rao, X., Li, M., ... others (2014). Chromosomal dna deletion confers phage resistance to pseudomonas aeruginosa. *Scientific reports*, 4(1), 1–8.
- Levene, H. (1961). Robust tests for equality of variances. *Contributions to probability and statistics. Essays in honor of Harold Hotelling*, 279–292.
- Li, W., Calle, L., Hanford, A., Stambaugh, I., y Callahan, M. (2018). Investigation of silver biocide as a disinfection technology for spacecraft—an early literature review..
- Liang, P., Fang, X., Hu, Y., Yuan, M., Raba, D. A., Ding, J., ... others (2020). The aerobic respiratory chain of pseudomonas aeruginosa cultured in artificial urine media: Role of nqr and terminal oxidases. *PloS one*, 15(4), e0231965.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., y Wozniak, D. J. (2009). Assembly and development of the pseudomonas aeruginosa biofilm matrix. *PLoS pathogens*, 5(3), e1000354.
- Martin-Somer, M., Pablos, C., de Diego, A., van Grieken, R., Encinas, A., Monsalvo, V. M., y Marugan, J. (2019). Novel macroporous 3d photocatalytic foams for simultaneous wastewater disinfection and removal of contaminants of emerging concern. *Chemical Engineering Journal*, 366, 449–459.
- McDonald, J. H. (2009). *Handbook of biological statistics* (Vol. 2). sparky house publishing Baltimore, MD.
- Mikkelsen, H., Duck, Z., Lilley, K., y Welch, M. (2007). Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of pseudomonas aeruginosa. *Journal of bacteriology*, 189(6), 2411–2416.
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., ... Huang, T. (2020). Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in microbiology*, 11, 928.
- Muirhead, D. L., Button-Denby, A., Smyth, C. M., Nelson, J., y Callahan, M. R. (2020). Chemistry of ionic silver and implications for design of potable water systems..
- Murthy, P. S., y Venkatesan, R. (2008). Industrial biofilms and their control.
- Nigaud, Y., Cosette, P., Collet, A., Song, P. C. T., Vaudry, D., Vaudry, H., ... Jouenne, T. (2010). Biofilm-induced modifications in the proteome of pseudomonas aeruginosa planktonic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(4), 957–966.
- Oliveira, R., Azeredo, J., Teixeira, P., y Fonseca, A. (2001). The role of hydrophobicity in bacterial adhesion.
- Parsek, M. R., y Greenberg, E. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 27–33.

- Perrin, E., Bacci, G., Garrelly, L., Canganella, F., Bianconi, G., Fani, R., ... others (2018). Furnishing spaceship environment: evaluation of bacterial biofilms on different materials used inside international space station. *Research in microbiology*, 169(6), 289–295.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., y Lejeune, P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 181(19), 5993–6002.
- Purevdorj-Gage, B., Costerton, W., y Stoodley, P. (2005). Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid pseudomonas aeruginosa biofilms. *Microbiology*, 151(5), 1569–1576.
- Rollet, C., Gal, L., y Guzzo, J. (2009). Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in pseudomonas aeruginosa. *FEMS microbiology letters*, 290(2), 135–142.
- Rosado, H., Doyle, M., Hinds, J., y Taylor, P. W. (2010). Low-shear modelled microgravity alters expression of virulence determinants of staphylococcus aureus. *Acta Astronautica*, 66(3-4), 408–413.
- Rosenzweig, J. A., Abogunde, O., Thomas, K., Lawal, A., Nguyen, Y.-U., Sodipe, A., y Jejelowo, O. (2010). Spaceflight and modeled microgravity effects on microbial growth and virulence. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(4), 885–891.
- Sabra, W., Zeng, A.-P., Lünsdorf, H., y Deckwer, W.-D. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of azotobacter vinelandii alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and environmental microbiology*, 66(9), 4037–4044.
- Sanchez-Vizuete, P., Dergham, Y., Bridier, A., Deschamps, J., Dervyn, E., Hamze, K., ... Briandet, R. (2021). The coordinated population redistribution between bacillus subtilis submerged biofilm and liquid-air pellicle. *Biofilm*, 100065.
- Sanclement, J. A., Webster, P., Thomas, J., y Ramadan, H. H. (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 115(4), 578–582.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., y Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm*. Am Soc Microbiol.
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S., y Greenberg, E. (2004). The pseudomonas aeruginosa rpos regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular microbiology*, 51(4), 973–985.
- Sousa, C., Rodrigues, D., Oliveira, R., Song, W., Mano, J. F., y Azeredo, J. (2011). Superhydrophobic poly (l-lactic acid) surface as potential bacterial colonization substrate. *AMB express*, 1(1), 1–9.
- Spalding, C., Keen, E., Smith, D. J., Krachler, A.-M., y Jabbari, S. (2018). Mathematical modelling of the antibiotic-induced morphological transition of pseudomonas aeruginosa. *PLoS computational biology*, 14(2), e1006012.
- Spoering, A. L., y Lewis, K. (2001). Biofilms and planktonic cells of pseudomonas aeruginosa have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of bacteriology*, 183(23), 6746–6751.
- Steinberger, R., Allen, A., Hansma, H., y Holden, P. m. (2002). Elongation correlates with nutrient deprivation in pseudomonas aeruginosa unsaturated biofilms. *Microbial ecology*, 43(4), 416–423.
- Tao, L., Lixiang, J., Weiquan, F., y Xiangpeng, L. (2009). The effects of space atomic oxygen erosion on epoxy and silicone adhesives in leo spacecraft [j]. *Spacecraft Environment Engineering*, 3.
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., y Rehm, B. H. (2020). Pseudomonas aeruginosa biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8671.
- Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A. L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N. K., ... others (2016). Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature communications*, 7(1), 1–13.
- Ursell, T., Lee, T. K., Shiomi, D., Shi, H., Tropini, C., Monds, R. D., ... others (2017). Rapid, precise quantification of bacterial cellular dimensions across a genomic-scale knockout library. *BMC biology*, 15(1), 1–15.
- Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A., y Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of pseudomonas aeruginosa. *Current opinion in microbiology*, 41, 15–20.

- Venkateswaran, K., Satomi, M., Chung, S., Kern, R., Koukol, R., Basic, C., y White, D. (2001). Molecular microbial diversity of a spacecraft assembly facility. *Systematic and applied microbiology*, *24*(2), 311–320.
- Vukanti, R., Model, M. A., y Leff, L. G. (2012). Effect of modeled reduced gravity conditions on bacterial morphology and physiology. *BMC microbiology*, *12*(1), 1–11.
- Wang, L., Fan, D., Chen, W., y Terentjev, E. M. (2015). Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific reports*, *5*(1), 1–11.
- Weir, N., Wilson, M., Yoets, A., Molina, T., Bruce, R., y Carter, L. (2012). Microbiological characterization of the international space station water processor assembly external filter assembly s/n 01. En *42nd international conference on environmental systems* (p. 3595).
- Wilson, J., Ott, C., Zu Bentrup, K. H., Ramamurthy, R., Quick, L., Porwollik, S., ... others (2007). Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator hfq. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(41), 16299–16304.
- Wu, H., Fan, Z., Jiang, X., Chen, J., y Chen, G.-Q. (2016). Enhanced production of polyhydroxybutyrate by multiple dividing e. coli. *Microbial cell factories*, *15*(1), 1–13.
- Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C.-T., y McFeters, G. A. (1998). Spatial physiological heterogeneity in pseudomonas aeruginosa biofilm is determined by oxygen availability. *Applied and environmental microbiology*, *64*(10), 4035–4039.
- Yang, J., Thornhill, S. G., Barrila, J., Nickerson, C. A., Ott, C. M., y McLean, R. J. (2018). Microbiology of the built environment in spacecraft used for human flight. *Methods in Microbiology*, *45*, 3–26.
- Yang, S., Cheng, X., Jin, Z., Xia, A., Ni, L., Zhang, R., y Jin, F. (2018). Differential production of psl in planktonic cells leads to two distinctive attachment phenotypes in pseudomonas aeruginosa. *Applied and environmental microbiology*, *84*(14), e00700–18.
- Yoon, M. Y., Lee, K.-M., Park, Y., y Yoon, S. S. (2011). Contribution of cell elongation to the biofilm formation of pseudomonas aeruginosa during anaerobic respiration. *PloS one*, *6*(1), e16105.
- 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. A., ... others (2018). Design of a spaceflight biofilm experiment. *Acta astronautica*, *148*, 294–300.
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews*, *61*(4), 533–616.

11.1. Pruebas de normalidad

11.1.1. Por grupos

Cuadro 11.1: Todos los datos del GAP 1 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g LBK SS316 1.1 Largo	0.1968	Normal
micro-g LBK SS316 1.1 Diámetro	0.2117	Normal
micro-g LBK SS316 1.2 Largo	0.8124	Normal
micro-g LBK SS316 1.2 Diámetro	0.08063	Normal
micro-g LBK SS316 1.3 Largo	0.3301	Normal
micro-g LBK SS316 1.3 Diámetro	0.1699	Normal
micro-g LBK SS316 1.4 Largo	0.3006	Normal
micro-g LBK SS316 1.4 Diámetro	0.2058	Normal
micro-g LBK SS316 1.5 Largo	0.7248	Normal
micro-g LBK p-SS316 1.5 Diámetro	0.3245	Normal
micro-g LBK p-SS316 1.6 Largo	0.1205	Normal
micro-g LBK p-SS316 1.6 Diámetro	0.407	Normal
micro-g LBK p-SS316 1.7 Largo	0.4176	Normal
micro-g LBK p-SS316 1.7 Diámetro	0.4642	Normal
micro-g LBK p-SS316 1.8 Largo	0.2082	Normal
micro-g LBK p-SS316 1.8 Diámetro	0.0824	Normal

Cuadro 11.2: Todos los datos del GAP 2 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g LBK MITLIS 2.1 Largo	0.7758	Normal
µg LBK MITLIS 2.1 Diámetro	0.7149	Normal
micro-g LBK MITLIS 2.2 Largo	0.6727	Normal
micro-g LBK MITLIS 2.2 Diámetro	0.8926	Normal

Cuadro 11.2: Todos los datos del GAP 2 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g LBK MITLIS 2.3 Largo	0.1359	Normal
micro-g LBK MITLIS 2.3 Diámetro	0.8945	Normal
micro-g LBK MITLIS 2.4 Largo	0.3906	Normal
micro-g LBK MITLIS 2.4 Diámetro	0.3323	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 2.5 Largo	0.07902	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 2.5 Diámetro	0.1725	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 2.6 Largo	0.2107	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 2.6 Diámetro	0.6569	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 2.7 Largo	0.1639	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 2.7 Diámetro	0.1935	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 2.8 Largo	0.1605	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 2.8 Diámetro	0.1814	Normal

Cuadro 11.3: Todos los datos del GAP 3 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 3.1 Largo	0.6161	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 3.1 Diámetro	0.587	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 3.2 Largo	0.8543	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 3.2 Diámetro	0.9375	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 3.3 Largo	0.7203	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 3.3 Diámetro	0.3715	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 3.4 Largo	0.1796	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 3.4 Diámetro	0.2486	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.5 Largo	0.4534	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.5 Diámetro	0.09973	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.6 Largo	0.1622	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.6 Diámetro	0.1774	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.7 Largo	0.2396	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.7 Diámetro	0.07	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.8 Largo	0.1702	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.8 Diámetro	0.09	Normal

Cuadro 11.4: Todos los datos del GAP 7 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g LBK SS316 7.1 Largo	0.5744	Normal
micro-g LBK SS316 7.1 Diámetro	0.7169	Normal
micro-g LBK SS316 7.2 Largo	0.05563	Normal
micro-g LBK SS316 7.2 Diámetro	0.7439	Normal
micro-g LBK SS316 7.3 Largo	0.9039	Normal
micro-g LBK SS316 7.3 Diámetro	0.253	Normal
micro-g LBK SS316 7.4 Largo	0.8983	Normal
micro-g LBK SS316 7.4 Diámetro	0.7762	Normal
micro-g LBK p-SS316 7.5 Largo	0.1252	Normal
micro-g LBK p-SS316 7.5 Diámetro	0.692	Normal
micro-g LBK p-SS316 7.6 Largo	0.9722	Normal
micro-g LBK p-SS316 7.6 Diámetro	0.9243	Normal

Cuadro 11.4: Todos los datos del GAP 7 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g LBK p-SS316 7.7 Largo	0.08965	Normal
micro-g LBK p-SS316 7.7 Diámetro	0.2427	Normal
micro-g LBK p-SS316 7.8 Largo	0.117	Normal
micro-g LBK p-SS316 7.8 Diámetro	0.4582	Normal

Cuadro 11.5: Todos los datos del GAP 8 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g LBK MIT-LIS 8.1 Largo	0.117	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 8.1 Diámetro	0.4582	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 8.2 Largo	0.07984	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 8.2 Diámetro	0.1385	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 8.3 Largo	0.5524	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 8.3 Diámetro	0.4985	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 8.4 Largo	0.9996	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 8.4 Diámetro	0.6742	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 8.5 Largo	0.1352	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 8.5 Diámetro	0.6363	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 8.6 Largo	0.08463	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 8.6 Diámetro	0.06709	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 8.7 Largo	0.07121	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 8.7 Diámetro	0.4169	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 8.8 Largo	0.5326	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Celluloseb 8.8 Diámetro	0.728	Normal

Cuadro 11.6: Todos los datos del GAP 9 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 9.1 Largo	0.4068	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 9.1 Diámetro	0.8947	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 9.2 Largo	0.5233	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 9.2 Diámetro	0.5119	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 9.3 Largo	0.3085	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 9.3 Diámetro	0.565	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 9.4 Largo	0.6959	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 9.4 Diámetro	0.5464	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.5 Largo	0.6053	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.5 Diámetro	0.596	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.6 Largo	0.1397	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.6 Diámetro	0.3426	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.7 Largo	0.5129	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.7 Diámetro	0.955	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.8 Largo	0.9836	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.8 Diámetro	0.265	Normal

Cuadro 11.7: Todos los datos del GAP 13 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
µg LBK SS316 13.1 Largo	0.09616	Normal
micro-g LBK SS316 13.1 Diámetro	0.5151	Normal
µg LBK SS316 13.2 Largo	0.05971	Normal
micro-g LBK SS316 13.2 Diámetro	0.4172	Normal
micro-g LBK SS316 13.3 Largo	0.2292	Normal
micro-g LBK SS316 13.3 Diámetro	0.9064	Normal
micro-g LBK SS316 13.4 Largo	0.09488	Normal
micro-g LBK SS316 13.4 Diámetro	0.9414	Normal
micro-g LBK p-SS316 13.5 Largo	0.7797	Normal
micro-g LBK p-SS316 13.5 Diámetro	0.8426	Normal
micro-g LBK p-SS316 13.6 Largo	0.07079	Normal
micro-g LBK p-SS316 13.6 Diámetro	0.56	Normal
micro-g LBK p-SS316 13.7 Largo	0.2252	Normal
micro-g LBK p-SS316 13.7 Diámetro	0.05306	Normal
micro-g LBK p-SS316 13.8 Largo	0.4331	Normal
micro-g LBK p-SS316 13.8 Diámetro	0.968	Normal

Cuadro 11.8: Todos los datos del GAP 14 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g LBK MIT-LIS 14.1 Largo	0.5754	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 14.1 Diámetro	0.6955	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 14.2 Largo	0.1444	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 14.2 Diámetro	0.7545	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 14.3 Largo	0.6256	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 14.3 Diámetro	0.1551	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 14.4 Largo	0.9561	Normal
micro-g LBK MIT-LIS 14.4 Diámetro	0.3547	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.5 Largo	0.2563	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.5 Diámetro	0.1228	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.6 Largo	0.4881	Normal
µg mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.6 Diámetro	0.283	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.7 Largo	0.07958	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.7 Diámetro	0.3028	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.8 Largo	0.6933	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.8 Diámetro	0.2003	Normal

Cuadro 11.9: Todos los datos del GAP 15 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 15.1 Largo	0.136	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 15.1 Diámetro	0.7955	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 15.2 Largo	0.08206	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 15.2 Diámetro	0.3149	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 15.3 Largo	0.8547	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 15.3 Diámetro	0.6544	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 15.4 Largo	0.2316	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone 15.4 Diámetro	0.5737	Normal

Cuadro 11.9: Todos los datos del GAP 15 en micro-g, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.5 Largo	0.1955	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.5 Diámetro	0.3353	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.6 Largo	0.2789	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.6 Diámetro	0.8459	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.7 Largo	0.06093	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.7 Diámetro	0.3109	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.8 Largo	0.8609	Normal
micro-g mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.8 Diámetro	0.7085	Normal

11.1.2. Por réplica biológica: micro-g

Cuadro 11.10: Todos los datos de cada tratamiento en micro-g, obtenidos de las réplicas biológicas, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
u g 1 D1 LBK SS316 Largo	0.8796	Normal
u g 1 D1 LBK SS316 Diámetro	0.9236	Normal
u g 1 D1 LBK p-SS316 Largo	0.3376	Normal
u g 1 D1 LBK p-SS316 Diámetro	0.9895	Normal
u g 2 D1 LBK MIT-LIS Largo	0.3518	Normal
u g 2 D1 LBK MIT-LIS Diámetro	0.2893	Normal
u g 2 D1 mAUMg-high Pi Cell-Memb Largo	0.2519	Normal
u g 2 D1 mAUMg-high Pi Cell-Memb Diámetro	0.0798	Normal
u g 3 D1 mAUMg-high Pi Silicone Largo	0.4641	Normal
u g 3 D1 mAUMg-high Pi Silicone Diámetro	0.1985	Normal
u g 3 D1 mAUMg-high Pi Silicone-DLIP Largo	0.8632	Normal
u g 3 D1 mAUMg-high Pi Silicone-DLIP Diámetro	0.1348	Normal
u g 7 D2 LBK SS316 Largo	0.06137	Normal
u g 7 D2 LBK SS316 Diámetro	0.2805	Normal
u g 7 D2 LBK p-SS316 Largo	0.4838	Normal
u g 7 D2 LBK p-SS316 Diámetro	0.6947	Normal
u g 8 D2 LBK MIT-LIS Largo	0.696	Normal
u g 8 D2 LBK MIT-LIS Diámetro	0.7537	Normal
u g 8 D2 mAUMg-high Pi Cell-Memb Largo	0.1861	Normal
u g 8 D2 mAUMg-high Pi Cell-Memb Diámetro	0.5927	Normal
u g 9 D2 mAUMg-high Pi Silicone Largo	0.8291	Normal
u g 9 D2 mAUMg-high Pi Silicone Diámetro	0.6398	Normal
u g 9 D2 mAUMg-high Pi Silicone-DLIP Largo	0.4076	Normal
u g 9 D2 mAUMg-high Pi Silicone-DLIP Diámetro	0.2815	Normal
u g 13 D3 LBK SS316 Largo	0.5127	Normal
u g 13 D3 LBK SS316 Diámetro	0.296	Normal
u g 13 D3 LBK p-SS316 Largo	0.9786	Normal
u g 13 D3 LBK p-SS316 Diámetro	0.9151	Normal
u g 14 D3 LBK MIT-LIS Largo	0.3554	Normal
u g 14 D3 LBK MIT-LIS Diámetro	0.1702	Normal
u g 14 D3 mAUMg-high Pi Cell-Membrane Largo	0.9348	Normal
u g 14 D3 mAUMg-high Pi Cell-Membrane Diámetro	0.554	Normal
u g 15 D3 mAUMg-high Pi Silicone Largo	0.5942	Normal

Cuadro 11.10: Todos los datos de cada tratamiento en micro-g, obtenidos de las réplicas biológicas, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
u g 15 D3 mAUMg-high Pi Silicone Diámetro	0.2479	Normal
u g 15 D3 mAUMg-high Pi Silicone-DLIP Largo	0.4295	Normal
u g 15 D3 mAUMg-high Pi Silicone-DLIP Diámetro	0.6279	Normal

11.1.3. Por réplica biológica: g-terrestre

Cuadro 11.11: Todos los datos del GAP 1 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre LBK SS316 1.1 Largo	0.3462	Normal
g-terrestre LBK SS316 1.1 Diámetro	0.2929	Normal
g-terrestre LBK SS316 1.2 Largo	0.7978	Normal
g-terrestre LBK SS316 1.2 Diámetro	0.6581	Normal
g-terrestre LBK SS316 1.3 Largo	0.1257	Normal
g-terrestre LBK SS316 1.3 Diámetro	0.05912	Normal
g-terrestre LBK SS316 1.4 Largo	0.6074	Normal
g-terrestre LBK SS316 1.4 Diámetro	0.1529	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 1.5 Largo	0.7	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 1.5 Diámetro	0.3478	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 1.6 Largo	0.0748	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 1.6 Diámetro	0.1228	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 1.7 Largo	0.2531	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 1.7 Diámetro	0.816	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 1.8 Largo	0.187	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 1.8 Diámetro	0.3412	Normal

Cuadro 11.12: Todos los datos del GAP 2 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre LBK MIT-LIS 2.1 Largo	0.3601	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 2.1 Diámetro	0.6123	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 2.2 Largo	0.8514	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 2.2 Diámetro	0.4975	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 2.3 Largo	0.2207	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 2.3 Diámetro	0.7427	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 2.4 Largo	0.2635	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 2.4 Diámetro	0.3951	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 2.5 Largo	0.08105	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 2.5 Diámetro	0.1741	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 2.6 Largo	0.2057	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 2.6 Diámetro	0.1935	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 2.7 Largo	0.1216	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 2.7 Diámetro	0.4235	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 2.8 Largo	0.9117	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 2.8 Diámetro	0.9117	Normal

Cuadro 11.13: Todos los datos del GAP 3 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 3.1 Largo	0.1046	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 3.1 Diámetro	0.5776	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 3.2 Largo	0.5237	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 3.2 Diámetro	0.9348	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 3.3 Largo	0.05287	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 3.3 Diámetro	0.7058	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 3.4 Largo	0.9152	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 3.4 Diámetro	0.1199	Nor
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.5 Largo	0.4064	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.5 Diámetro	0.3797	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.6 Largo	0.516	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.6 Diámetro	0.9576	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.7 Largo	0.749	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.7 Diámetro	0.6546	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.8 Largo	0.4771	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 3.8 Diámetro	0.9909	Normal

Cuadro 11.14: Todos los datos del GAP 7 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre LBK SS316 7.1 Largo	0.09903	Normal
g-terrestre LBK SS316 7.1 Diámetro	0.09751	Normal
g-terrestre LBK SS316 7.2 Largo	0.4051	Normal
g-terrestre LBK SS316 7.2 Diámetro	0.05368	Normal
g-terrestre LBK SS316 7.3 Largo	0.1849	Normal
g-terrestre LBK SS316 7.3 Diámetro	0.2875	Normal
g-terrestre LBK SS316 7.4 Largo	0.3522	Normal
g-terrestre LBK SS316 7.4 Diámetro	0.2531	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 7.5 Largo	0.1208	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 7.5 Diámetro	0.8501	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 7.6 Largo	0.1005	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 7.6 Diámetro	0.2735	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 7.7 Largo	0.8685	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 7.7 Diámetro	0.9716	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 7.8 Largo	0.1058	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 7.8 Diámetro	0.1545	Normal

Cuadro 11.15: Todos los datos del GAP 8 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre LBK MIT-LIS 8.1 Largo	0.1254	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 8.1 Diámetro	0.8225	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 8.2 Largo	0.3292	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 8.2 Diámetro	0.9949	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 8.3 Largo	0.7762	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 8.3 Diámetro	0.6535	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 8.4 Largo	0.3767	Normal

Cuadro 11.15: Todos los datos del GAP 8 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre LBK MIT-LIS 8.4 Diámetro	0.4168	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 8.5 Largo	0.4167	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 8.5 Diámetro	0.3432	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 8.6 Largo	0.08756	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 8.6 Diámetro	0.3473	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 8.7 Largo	0.6121	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 8.7 Diámetro	0.919	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 8.8 Largo	0.6689	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 8.8 Diámetro	0.3534	Normal

Cuadro 11.16: Todos los datos del GAP 9 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 9.1 Largo	0.1628	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 9.1 Diámetro	0.7559	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 9.2 Largo	0.4153	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 9.2 Diámetro	0.1982	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 9.3 Largo	0.05693	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 9.3 Diámetro	0.1918	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 9.4 Largo	0.1237	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 9.4 Diámetro	0.3536	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.5 Largo	0.3658	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.5 Diámetro	0.8042	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.6 Largo	0.656	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.6 Diámetro	0.9623	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.7 Largo	0.07488	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.7 Diámetro	0.3693	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.8 Largo	0.5776	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 9.8 Diámetro	0.2101	Normal

Cuadro 11.17: Todos los datos del GAP 13 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre LBK SS316 13.1 Largo	0.3745	Normal
g-terrestre LBK SS316 13.1 Diámetro	0.8321	Normal
g-terrestre LBK SS316 13.2 Largo	0.4148	Normal
g-terrestre LBK SS316 13.2 Diámetro	0.2483	Normal
g-terrestre LBK SS316 13.3 Largo	0.7391	Normal
g-terrestre LBK SS316 13.3 Diámetro	0.9101	Normal
g-terrestre LBK SS316 13.4 Largo	0.2021	Normal
g-terrestre LBK SS316 13.4 Diámetro	0.3947	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 13.5 Largo	0.08054	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 13.5 Diámetro	0.165	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 13.6 Largo	0.5349	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 13.6 Diámetro	0.09939	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 13.7 Largo	0.08123	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 13.7 Diámetro	0.1724	Normal
g-terrestre LBK p-SS316 13.8 Largo	0.8502	Normal

Cuadro 11.17: Todos los datos del GAP 13 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre LBK p-SS316 13.8 Diámetro	0.9116	Normal

Cuadro 11.18: Todos los datos del GAP 14 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre LBK MIT-LIS 14.1 Largo	0.188	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 14.1 Diámetro	0.2834	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 14.2 Largo	0.1413	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 14.2 Diámetro	0.3194	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 14.3 Largo	0.2282	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 14.3 Diámetro	0.4597	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 14.4 Largo	0.2633	Normal
g-terrestre LBK MIT-LIS 14.4 Diámetro	0.252	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.5 Largo	0.1031	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.5 Diámetro	0.3673	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.6 Largo	0.9005	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.6 Diámetro	0.1048	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.7 Largo	0.1799	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.7 Diámetro	0.1272	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.8 Largo	0.1302	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Cell-Memb 14.8 Diámetro	0.32	Normal

Cuadro 11.19: Todos los datos del GAP 15 en g-terrestre, mostraron distribución normal.

Set de datos	Valor-p	Normalidad
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 15.1 Largo	0.094	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 15.1 Diámetro	0.4574	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 15.2 Largo	0.8116	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 15.2 Diámetro	0.1627	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 15.3 Largo	0.9005	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 15.3 Diámetro	0.2678	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 15.4 Largo	0.1319	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone 15.4 Diámetro	0.5802	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.5 Largo	0.5068	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.5 Diámetro	0.8422	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.6 Largo	0.8598	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.6 Diámetro	0.7938	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.7 Largo	0.2347	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.7 Diámetro	0.3845	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.8 Largo	0.1168	Normal
g-terrestre mAUMg-high Pi Silicone-DLIP 15.8 Diámetro	0.08	Normal

11.2. Pruebas de Dunn

Cuadro 11.20: Análisis de Dunn del largo celular en el grupo de cultivos en LBK en g-terrestre

LARGO			
Comparación	Valor-p	Signif.	
LBK D1 p-SS316-LBK D1 SS316	0.19317		
LBK D3 SS316-LBK D1 SS316	1.10E-11	***	
LBK D3 p-SS316-LBK D1 SS316	<2e-16	***	
LBK D3 MITLIS-LBK D1 SS316	1.20E-04	***	
LBK D1 MITLIS-LBK D1 SS316	1		
LBK D2 SS316-LBK D1 SS316	5.50E-10	***	
LBK D2 p-SS316-LBK D1 SS316	4.40E-07	***	
LBK D2 MITLIS-LBK D1 SS316	1.00E+00		
LBK D3 SS316-LBK D1 p-SS316	<2e-16	***	
LBK D3 p-SS316-LBK D1 p-SS316	<2e-16	***	
LBK D3 MITLIS-LBK D1 p-SS316	3.70E-12	***	
LBK D1 MITLIS-LBK D1 p-SS316	0.71831		
LBK D2 SS316-LBK D1 p-SS316	<2e-16	***	
LBK D2 p-SS316-LBK D1 p-SS316	8.00E-16	***	
LBK D2 MITLIS-LBK D1 p-SS316	0.31929		
LBK D3 p-SS316-LBK D3 SS316	1.00E+00		
LBK D3 MITLIS-LBK D3 SS316	0.29878		
LBK D1 MITLIS-LBK D3 SS316	3.30E-13	***	
LBK D2 SS316-LBK D3 SS316	1		
LBK D2 p-SS316-LBK D3 SS316	1.00E+00		
LBK D2 MITLIS-LBK D3 SS316	3.10E-12	***	
LBK D3 MITLIS-LBK D3 p-SS316	0.00076	***	
LBK D1 MITLIS-LBK D3 p-SS316	<2e-16	***	
LBK D2 SS316-LBK D3 p-SS316	1		
LBK D2 p-SS316-LBK D3 p-SS316	0.04809	*	
LBK D2 MITLIS-LBK D3 p-SS316	<2e-16	***	
LBK D1 MITLIS-LBK D3 MITLIS	1.20E-05	***	
LBK D2 SS316-LBK D3 MITLIS	1		
LBK D2 p-SS316-LBK D3 MITLIS	1.00E+00		
LBK D2 MITLIS-LBK D3 MITLIS	5.10E-05	***	
LBK D2 SS316-LBK D1 MITLIS	2.10E-11	***	
LBK D2 p-SS316-LBK D1 MITLIS	2.70E-08	***	
LBK D2 MITLIS-LBK D1 MITLIS	1.00E+00		
LBK D2 p-SS316-LBK D2 SS316	1.00E+00		
LBK D2 MITLIS-LBK D2 SS316	1.70E-10	***	
LBK D2 MITLIS-LBK D2 p-SS316	1.60E-07	***	

Cuadro 11.21: Análisis de Dunn del diámetro celular en el grupo de cultivos en LBK en g-terrestre

Diámetro			
Comparación	Valor-p	Signif.	
D1 p-SS316 vs. D1 SS316	1		
D3 SS316 vs. D1 SS316	0.07124	.	
D3 p-SS316 vs. D1 SS316	0.00072	***	
D3 MITLIS vs. D1 SS316	0.00047	***	
D1 MITLIS vs. D1 SS316	1		
D2 SS316 vs. D1 SS316	0.3029		
D2 p-SS316 vs. D1 SS316	0.27857		
D2 MITLIS vs. D1 SS316	1		

Cuadro 11.21: Análisis de Dunn del diámetro celular en el grupo de cultivos en LBK en g-terrestre

Diámetro		
D3 SS316 vs. D1 p-SS316	0.03948	*
D3 p-SS316 vs. D1 p-SS316	0.00033	***
D3 MITLIS vs. D1 p-SS316	0.00021	***
D1 MITLIS vs. D1 p-SS316	1	
D2 SS316 vs. D1 p-SS316	0.49477	
D2 p-SS316 vs. D1 p-SS316	0.45706	
D2 MITLIS vs. D1 p-SS316	1	
D3 p-SS316 vs. D3 SS316	1	
D3 MITLIS vs. D3 SS316	1	
D1 MITLIS vs. D3 SS316	0.00014	***
D2 SS316 vs. D3 SS316	3.70E-07	***
D2 p-SS316 vs. D3 SS316	3.10E-07	***
D2 MITLIS vs. D3 SS316	0.01496	*
D3 MITLIS vs. D3 p-SS316	1	
D1 MITLIS vs. D3 p-SS316	2.60E-07	***
D2 SS316 vs. D3 p-SS316	1.90E-10	***
D2 p-SS316 vs. D3 p-SS316	1.60E-10	***
D2 MITLIS vs. D3 p-SS316	9.40E-05	***
D1 MITLIS vs. D3 MITLIS	1.40E-07	***
D2 SS316 vs. D3 MITLIS	9.50E-11	***
D2 p-SS316 vs. D3 MITLIS	7.70E-11	***
D2 MITLIS vs. D3 MITLIS	5.80E-05	***
D2 SS316 vs. D1 MITLIS	1	
D2 p-SS316 vs. D1 MITLIS	1	
D2 MITLIS vs. D1 MITLIS	1	
D2 p-SS316 vs. D2 SS316	1	
D2 MITLIS vs. D2 SS316	1	
D2 MITLIS vs. D2 p-SS316	0.93486	

Cuadro 11.22: Análisis de Dunn del largo celular en el grupo de cultivos en LBK en micro-g

Largo		
Comparación	Valor-p	Signif.
D1 p-SS316-D1 SS316	1	
D1 MITLIS-D1 SS316	1	
D2 SS316-D1 SS316	2.30E-05	***
D2 p-SS316-D1 SS316	0.01179	*
D2 MITLIS-D1 SS316	1	
D3 SS316-D1 SS316	1.80E-13	***
D3 p-SS316-D1 SS316	2.90E-12	***
D3 MITLIS-D1 SS316	5.60E-10	***
D1 MITLIS-D1 p-SS316	1	
D2 SS316-D1 p-SS316	1.60E-08	***
D2 p-SS316-D1 p-SS316	4.40E-05	***
D2 MITLIS-D1 p-SS316	1	
D3 SS316-D1 p-SS316	<2e-16	***
D3 p-SS316-D1 p-SS316	<2e-16	***
D3 MITLIS-D1 p-SS316	4.40E-14	***
D2 SS316-D1 MITLIS	2.10E-10	***
D2 p-SS316-D1 MITLIS	1.40E-06	***
D2 MITLIS-D1 MITLIS	1	

Cuadro 11.22: Análisis de Dunn del largo celular en el grupo de cultivos en LBK en micro-g

	Largo	
D3 SS316-D1 MITLIS	<2e-16	***
D3 p-SS316-D1 MITLIS	<2e-16	***
D3 MITLIS-D1 MITLIS	<2e-16	***
D2 p-SS316-D2 SS316	1	
D2 MITLIS-D2 SS316	5.50E-07	***
D3 SS316-D2 SS316	0.15831	
D3 p-SS316-D2 SS316	0.45337	
D3 MITLIS-D2 SS316	1	
D2 MITLIS-D2 p-SS316	0.00069	***
D3 SS316-D2 p-SS316	0.00084	***
D3 p-SS316-D2 p-SS316	0.00378	**
D3 MITLIS-D2 p-SS316	0.0586	.
D3 SS316-D2 MITLIS	6.50E-16	***
D3 p-SS316-D2 MITLIS	1.30E-14	***
D3 MITLIS-D2 MITLIS	4.10E-12	***
D3 p-SS316-D3 SS316	1	
D3 MITLIS-D3 SS316	1	
D3 MITLIS-D3 p-SS316	1	

Cuadro 11.23: Análisis de Dunn del largo celular en el grupo de cultivos en LBK en micro-g

	Largo	
Comparación	Valor-p	Signif.
D1 p-SS316-D1 SS316	1	
D1 MITLIS-D1 SS316	1	
D2 SS316-D1 SS316	2.30E-05	***
D2 p-SS316-D1 SS316	0.01179	*
D2 MITLIS-D1 SS316	1	
D3 SS316-D1 SS316	1.80E-13	***
D3 p-SS316-D1 SS316	2.90E-12	***
D3 MITLIS-D1 SS316	5.60E-10	***
D1 MITLIS-D1 p-SS316	1	
D2 SS316-D1 p-SS316	1.60E-08	***
D2 p-SS316-D1 p-SS316	4.40E-05	***
D2 MITLIS-D1 p-SS316	1	
D3 SS316-D1 p-SS316	<2e-16	***
D3 p-SS316-D1 p-SS316	<2e-16	***
D3 MITLIS-D1 p-SS316	4.40E-14	***
D2 SS316-D1 MITLIS	2.10E-10	***
D2 p-SS316-D1 MITLIS	1.40E-06	***
D2 MITLIS-D1 MITLIS	1	
D3 SS316-D1 MITLIS	<2e-16	***
D3 p-SS316-D1 MITLIS	<2e-16	***
D3 MITLIS-D1 MITLIS	<2e-16	***
D2 p-SS316-D2 SS316	1	
D2 MITLIS-D2 SS316	5.50E-07	***
D3 SS316-D2 SS316	0.15831	
D3 p-SS316-D2 SS316	0.45337	
D3 MITLIS-D2 SS316	1	
D2 MITLIS-D2 p-SS316	0.00069	***
D3 SS316-D2 p-SS316	0.00084	***

Cuadro 11.23: Análisis de Dunn del largo celular en el grupo de cultivos en LBK en micro-g

		Largo	
D3 p-SS316-D2	p-SS316	0.00378	**
D3 MITLIS-D2	p-SS316	0.0586	.
D3 SS316-D2	MITLIS	6.50E-16	***
D3 p-SS316-D2	MITLIS	1.30E-14	***
D3 MITLIS-D2	MITLIS	4.10E-12	***
D3 p-SS316-D3	SS316	1	
D3 MITLIS-D3	SS316	1	
D3 MITLIS-D3	p-SS316	1	

Cuadro 11.24: Cambios en el largo celular en el Día 1 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK

		Día 1	
		Largo	
Comparación	Valor vs.p	Nv.	Signif.
g-terrestre SS316 vs. micro-g MITLIS	0.0154	*	
g-terrestre p-SS316 vs. g-terrestre SS316	0.0014	**	
g-terrestre MITLIS vs. g-terrestre p-SS316	0.0069	**	
micro-g p-SS316 vs. micro-g SS316	1		
micro-g MITLIS vs. micro-g SS316	0.6763		
g-terrestre SS316 vs. micro-g SS316	1		
g-terrestre p-SS316 vs. micro-g SS316	0.1313		
g-terrestre MITLIS vs. micro-g SS316	1		
micro-g MITLIS vs. micro-g p-SS316	1		
g-terrestre SS316 vs. micro-g p-SS316	0.4108		
g-terrestre p-SS316 vs. micro-g p-SS316	1	.	
g-terrestre MITLIS vs. micro-g p-SS316	1		
g-terrestre p-SS316 vs. micro-g MITLIS	1		
g-terrestre MITLIS vs. micro-g MITLIS	0.0589		
g-terrestre MITLIS vs. g-terrestre SS316	1		

Cuadro 11.25: Cambios en el diámetro celular en el Día 1 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK

		Día 1	
		Diámetro	
Comparación	Valor vs.p	Nv.	Signif.
micro-g p-SS316 vs. micro-g SS316	0.0017	**	
micro-g MITLIS vs. micro-g p-SS316	0.0182	*	
g-terrestre MITLIS vs. micro-g p-SS316	0.0248	*	
micro-g MITLIS vs. micro-g SS316	1		
g-terrestre SS316 vs. micro-g SS316	0.4848		
g-terrestre p-SS316 vs. micro-g SS316	0.4719		
g-terrestre MITLIS vs. micro-g SS316	1		
g-terrestre SS316 vs. micro-g p-SS316	1		
g-terrestre p-SS316 vs. micro-g p-SS316	1		
g-terrestre SS316 vs. micro-g MITLIS	1		
g-terrestre p-SS316 vs. micro-g MITLIS	1		
g-terrestre MITLIS vs. micro-g MITLIS	1		
g-terrestre p-SS316 vs. g-terrestre SS316	1		

Cuadro 11.25: Cambios en el diámetro celular en el Día 1 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK

Día 1		
g-terrestre MITLIS vs.g-terrestre SS316	1	
g-terrestre MITLIS vs.g-terrestre p-SS316	1	

Cuadro 11.26: Cambios en el largo celular en el Día 2 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK

Día 2		
Largo		
Comparación	Valor vs.p	Nv. Signif.
micro-g p-SS316 vs.micro-g SS316	1	
micro-g MITLIS vs.micro-g SS316	3.30E-08	***
g-terrestre SS316 vs.micro-g SS316	0.00531	**
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g SS316	0.14819	
g-terrestre MITLIS vs.micro-g SS316	0.00086	***
micro-g MITLIS vs.micro-g p-SS316	0.00014	***
g-terrestre SS316 vs.micro-g p-SS316	4.60E-06	***
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g p-SS316	0.00055	***
g-terrestre MITLIS vs.micro-g p-SS316	0.19929	
g-terrestre SS316 vs.micro-g MITLIS	<2.00E vs.16	***
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g MITLIS	<2.00E vs.16	***
g-terrestre MITLIS vs.micro-g MITLIS	0.75278	
g-terrestre p-SS316 vs.g-terrestre SS316	1	
g-terrestre MITLIS vs.g-terrestre SS316	4.60E-13	***
g-terrestre MITLIS vs.g-terrestre p-SS316	6.00E-10	***

Cuadro 11.27: Cambios en el diámetro celular en el Día 2 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK

Día 2		
Diámetro		
Comparación	Valor vs.p	Nv. Signif.
micro-g p-SS316 vs.micro-g SS316	1	
micro-g MITLIS vs.micro-g SS316	1	
g-terrestre SS316 vs.micro-g SS316	0.00016	***
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g SS316	0.00013	***
g-terrestre MITLIS vs.micro-g SS316	0.521	
micro-g MITLIS vs.micro-g p-SS316	1	
g-terrestre SS316 vs.micro-g p-SS316	4.00E-07	***
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g p-SS316	3.20E-07	***
g-terrestre MITLIS vs.micro-g p-SS316	0.01646	*
g-terrestre SS316 vs.micro-g MITLIS	1.10E-05	***
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g MITLIS	8.90E-06	***
g-terrestre MITLIS vs.micro-g MITLIS	0.11888	
g-terrestre p-SS316 vs.g-terrestre SS316	1	
g-terrestre MITLIS vs.g-terrestre SS316	0.32475	
g-terrestre MITLIS vs.g-terrestre p-SS316	0.2914	

Cuadro 11.28: Cambios en el largo celular en el Día 3 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK

Día 3			
		Largo	
Comparación	Valor vs.p	Nv.	Signif.
micro-g p-SS316 vs.micro-g SS316	1		
micro-g MITLIS vs.micro-g SS316	1		
g-terrestre SS316 vs.micro-g SS316	1		
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g SS316	0.07215	.	
g-terrestre MITLIS vs.micro-g SS316	1		
micro-g MITLIS vs.micro-g p-SS316	1		
g-terrestre SS316 vs.micro-g p-SS316	1		
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g p-SS316	0.03203	*	
g-terrestre MITLIS vs.micro-g p-SS316	1		
g-terrestre SS316 vs.micro-g MITLIS	1		
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g MITLIS	0.00447	**	
g-terrestre MITLIS vs.micro-g MITLIS	1		
g-terrestre p-SS316 vs.g-terrestre SS316	0.42425		
g-terrestre MITLIS vs.g-terrestre SS316	0.33031		
g-terrestre MITLIS vs.g-terrestre p-SS316	0.00011	***	

Cuadro 11.29: Cambios en el diámetro celular en el Día 3 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con LBK

Día 3			
		Diámetro	
Comparación	Valor vs.p	Nv.	Signif.
micro-g p-SS316 vs.micro-g SS316	0.00018	***	
micro-g MITLIS vs.micro-g SS316	0.20022		
g-terrestre SS316 vs.micro-g SS316	0.00508	**	
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g SS316	0.54234		
g-terrestre MITLIS vs.micro-g SS316	0.45077		
micro-g MITLIS vs.micro-g p-SS316	0.84523		
g-terrestre SS316 vs.micro-g p-SS316	1		
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g p-SS316	0.33249		
g-terrestre MITLIS vs.micro-g p-SS316	0.40319		
g-terrestre SS316 vs.micro-g MITLIS	1		
g-terrestre p-SS316 vs.micro-g MITLIS	1		
g-terrestre MITLIS vs.micro-g MITLIS	1		
g-terrestre p-SS316 vs.g-terrestre SS316	1		
g-terrestre MITLIS vs.g-terrestre SS316	1		
g-terrestre MITLIS vs.g-terrestre p-SS316	1		

Cuadro 11.30: Cambios en el largo celular en medio mAUMg-high Pi en g-terrestre

Largo			
Comparación	Valor-p	Signif.	
D3 Silicone-D3 Cell-Memb	1		
D3 Silicone-DLIP-D3 Cell-Memb	<2e-16	***	
D1 Cell-Memb-D3 Cell-Memb	0.113		
D1 Silicone-D3 Cell-Memb	<2e-16	***	
D1 Silicone-DLIP-D3 Cell-Memb	<2e-16	***	

Cuadro 11.30: Cambios en el largo celular en medio mAUMg-high Pi en g-terrestre

Largo		
D2 Cell-Memb-D3 Cell-Memb	1	
D2 Silicone-D3 Cell-Memb	0.1315	
D2 Silicone-DLIP-D3 Cell-Memb	0.3137	
D3 Silicone-DLIP-D3 Silicone	<2e-16	***
D1 Cell-Memb-D3 Silicone	1	
D1 Silicone-D3 Silicone	<2e-16	***
D1 Silicone-DLIP-D3 Silicone	<2e-16	***
D2 Cell-Memb-D3 Silicone	1	
D2 Silicone-D3 Silicone	1	
D2 Silicone-DLIP-D3 Silicone	1	
D1 Cell-Memb-D3 Silicone-DLIP	5.80E-15	***
D1 Silicone-D3 Silicone-DLIP	1	
D1 Silicone-DLIP-D3 Silicone-DLIP	1	
D2 Cell-Memb-D3 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D2 Silicone-D3 Silicone-DLIP	3.90E-15	***
D2 Silicone-DLIP-D3 Silicone-DLIP	3.50E-16	***
D1 Silicone-D1 Cell-Memb	<2e-16	***
D1 Silicone-DLIP-D1 Cell-Memb	<2e-16	***
D2 Cell-Memb-D1 Cell-Memb	1	
D2 Silicone-D1 Cell-Memb	1	
D2 Silicone-DLIP-D1 Cell-Memb	1	
D1 Silicone-DLIP-D1 Silicone	1	
D2 Cell-Memb-D1 Silicone	<2e-16	***
D2 Silicone-D1 Silicone	<2e-16	***
D2 Silicone-DLIP-D1 Silicone	<2e-16	***
D2 Cell-Memb-D1 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D2 Silicone-D1 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D2 Silicone-DLIP-D1 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D2 Silicone-D2 Cell-Memb	1	
D2 Silicone-DLIP-D2 Cell-Memb	1	
D2 Silicone-DLIP-D2 Silicone	1	

Cuadro 11.31: Cambios en el diámetro celular en medio mAUMg-high Pi en g-terrestre

Diámetro		
Comparación	Valor-p	Signif.
D3 Silicone-D3 Cell-Memb	4.00E-05	***
D3 Silicone-DLIP-D3 Cell-Memb	<2e-16	***
D1 Cell-Memb-D3 Cell-Memb	0.00059	***
D1 Silicone-D3 Cell-Memb	<2e-16	***
D1 Silicone-DLIP-D3 Cell-Memb	<2e-16	***
D2 Cell-Memb-D3 Cell-Memb	0.0385	*
D2 Silicone-D3 Cell-Memb	1	
D2 Silicone-DLIP-D3 Cell-Memb	0.00499	**
D3 Silicone-DLIP-D3 Silicone	<2e-16	***
D1 Cell-Memb-D3 Silicone	1	
D1 Silicone-D3 Silicone	1.30E-12	***
D1 Silicone-DLIP-D3 Silicone	<2e-16	***
D2 Cell-Memb-D3 Silicone	1	
D2 Silicone-D3 Silicone	0.09625	.
D2 Silicone-DLIP-D3 Silicone	1	

Cuadro 11.31: Cambios en el diámetro celular en medio mAUMg-high Pi en g-terrestre

Diámetro		
D1 Cell-Memb-D3 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D1 Silicone-D3 Silicone-DLIP	0.23925	
D1 Silicone-DLIP-D3 Silicone-DLIP	1	
D2 Cell-Memb-D3 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D2 Silicone-D3 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D2 Silicone-DLIP-D3 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D1 Silicone-D1 Cell-Memb	1.50E-14	***
D1 Silicone-DLIP-D1 Cell-Memb	<2e-16	***
D2 Cell-Memb-D1 Cell-Memb	1	
D2 Silicone-D1 Cell-Memb	0.5287	
D2 Silicone-DLIP-D1 Cell-Memb	1	
D1 Silicone-DLIP-D1 Silicone	0.1892	
D2 Cell-Memb-D1 Silicone	<2e-16	***
D2 Silicone-D1 Silicone	<2e-16	***
D2 Silicone-DLIP-D1 Silicone	<2e-16	***
D2 Cell-Memb-D1 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D2 Silicone-D1 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D2 Silicone-DLIP-D1 Silicone-DLIP	<2e-16	***
D2 Silicone-D2 Cell-Memb	1	
D2 Silicone-DLIP-D2 Cell-Memb	1	
D2 Silicone-DLIP-D2 Silicone	1	

Cuadro 11.32: Cambios en el largo celular en medio mAUMg-high Pi en micro-g

Largo		
Comparación	Valor-p	Signif.
D1 Silicone vs. D1 CellMemb	0.00	**
D1 SiliconeDLIP vs. D1 CellMemb	0.03	*
D2 CellMemb vs. D1 CellMemb	1.00	
D2 Silicone vs. D1 CellMemb	1.00	
D2 SiliconeDLIP vs. D1 CellMemb	0.24	
D3 CellMemb vs. D1 CellMemb	0.17	
D3 Silicone vs. D1 CellMemb	1.00	
D3 SiliconeDLIP vs. D1 CellMemb	1.00	
D1 SiliconeDLIP vs. D1 Silicone	0.00	***
D2 CellMemb vs. D1 Silicone	0.00	***
D2 Silicone vs. D1 Silicone	0.04	*
D2 SiliconeDLIP vs. D1 Silicone	1.00	
D3 CellMemb vs. D1 Silicone	1.00	
D3 Silicone vs. D1 Silicone	1.00	
D3 SiliconeDLIP vs. D1 Silicone	0.24	
D2 CellMemb vs. D1 SiliconeDLIP	1.00	
D2 Silicone vs. D1 SiliconeDLIP	0.00	**
D2 SiliconeDLIP vs. D1 SiliconeDLIP	0.00	***
D3 CellMemb vs. D1 SiliconeDLIP	0.00	***
D3 Silicone vs. D1 SiliconeDLIP	0.00	***
D3 SiliconeDLIP vs. D1 SiliconeDLIP	0.00	***
D2 Silicone vs. D2 CellMemb	1.00	
D2 SiliconeDLIP vs. D2 CellMemb	0.00	**
D3 CellMemb vs. D2 CellMemb	0.00	**
D3 Silicone vs. D2 CellMemb	0.03	*

Cuadro 11.32: Cambios en el largo celular en medio mAUMg-high Pi en micro-g

Largo	
D3 SiliconeDLIP vs. D2 CellMemb	0.39
D2 SiliconeDLIP vs. D2 Silicone	1.00
D3 CellMemb vs. D2 Silicone	1.00
D3 Silicone vs. D2 Silicone	1.00
D3 SiliconeDLIP vs. D2 Silicone	1.00
D3 CellMemb vs. D2 SiliconeDLIP	1.00
D3 Silicone vs. D2 SiliconeDLIP	1.00
D3 SiliconeDLIP vs. D2 SiliconeDLIP	1.00
D3 Silicone vs. D3 CellMemb	1.00
D3 SiliconeDLIP vs. D3 CellMemb	1.00
D3 SiliconeDLIP vs. D3 Silicone	1.00

Cuadro 11.33: Cambios en el diámetro celular en medio mAUMg-high Pi en micro-g

Comparación	Diámetro	Valor-p	Signif.
D1 Silicone vs. D1 CellMemb		3E-16	***
D1 SiliconeDLIP vs. D1 CellMemb		2E-02	*
D2 CellMemb vs. D1 CellMemb		9E-01	.
D2 Silicone vs. D1 CellMemb		6E-02	.
D2 SiliconeDLIP vs. D1 CellMemb		6E-04	***
D3 CellMemb vs. D1 CellMemb		1E+00	
D3 Silicone vs. D1 CellMemb		1E+00	
D3 SiliconeDLIP vs. D1 CellMemb		1E+00	
D1 SiliconeDLIP vs. D1 Silicone		7E-06	***
D2 CellMemb vs. D1 Silicone		7E-09	***
D2 Silicone vs. D1 Silicone		2E-06	***
D2 SiliconeDLIP vs. D1 Silicone		7E-04	***
D3 CellMemb vs. D1 Silicone		5E-12	***
D3 Silicone vs. D1 Silicone		3E-14	***
D3 SiliconeDLIP vs. D1 Silicone		<2e-16	***
D2 CellMemb vs. D1 SiliconeDLIP		1E+00	
D2 Silicone vs. D1 SiliconeDLIP		1E+00	
D2 SiliconeDLIP vs. D1 SiliconeDLIP		1E+00	
D3 CellMemb vs. D1 SiliconeDLIP		1E+00	
D3 Silicone vs. D1 SiliconeDLIP		1E-01	
D3 SiliconeDLIP vs. D1 SiliconeDLIP		7E-03	**
D2 Silicone vs. D2 CellMemb		1E+00	
D2 SiliconeDLIP vs. D2 CellMemb		1E+00	
D3 CellMemb vs. D2 CellMemb		1E+00	
D3 Silicone vs. D2 CellMemb		1E+00	
D3 SiliconeDLIP vs. D2 CellMemb		4E-01	
D2 SiliconeDLIP vs. D2 Silicone		1E+00	
D3 CellMemb vs. D2 Silicone		1E+00	
D3 Silicone vs. D2 Silicone		3E-01	
D3 SiliconeDLIP vs. D2 Silicone		2E-02	*
D3 CellMemb vs. D2 SiliconeDLIP		6E-02	.
D3 Silicone vs. D2 SiliconeDLIP		5E-03	**
D3 SiliconeDLIP vs. D2 SiliconeDLIP		1E-04	***
D3 Silicone vs. D3 CellMemb		1E+00	
D3 SiliconeDLIP vs. D3 CellMemb		1E+00	

Cuadro 11.33: Cambios en el diámetro celular en medio mAUMg-high Pi en micro-g

Diámetro	
D3 SiliconeDLIP vs. D3 Silicone	1E+00

Cuadro 11.34: Cambios en el largo celular en el Día 1 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con mAUMg-high Pi

Día 1			
Largo			
<i>Comparación</i>	<i>Valor-p</i>	<i>Sign.</i>	
Silicone uG vs. CellMemb	0.0376	*	
SiliconeDLIP uG vs. CellMemb	0.1411		
CellMemb GT vs. CellMemb	1		
Silicone GT vs. CellMemb	<2.00E-16	***	
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb	<2.00E-16	***	
SiliconeDLIP uG vs. Silicone uG	2.90E-07	***	
CellMemb GT vs. Silicone uG	0.9881		
Silicone GT vs. Silicone uG	1.50E-11	***	
SiliconeDLIP GT vs. Silicone uG	3.00E-12	***	
CellMemb GT vs. SiliconeDLIP uG	0.0023	**	
Silicone GT vs. SiliconeDLIP uG	<2.00E-16	***	
SiliconeDLIP GT vs. SiliconeDLIP uG	<2.00E-16	***	
Silicone GT vs. CellMemb GT	<2.00E-16	***	
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb GT	<2.00E-16	***	
SiliconeDLIP GT vs. Silicone GT	1		

Cuadro 11.35: Cambios en el diámetro celular en el Día 1 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con mAUMg-high Pi

Día 1			
Diámetro			
<i>Comparación</i>	<i>Valor-p</i>	<i>Sign.</i>	
Silicone uG vs. CellMemb	3.20E-07	***	
SiliconeDLIP uG vs. CellMemb	1		
CellMemb GT vs. CellMemb	1		
Silicone GT vs. CellMemb	<2.00E-16	***	
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb	<2.00E-16	***	
SiliconeDLIP uG vs. Silicone uG	0.00037	***	
CellMemb GT vs. Silicone uG	0.00036	***	
Silicone GT vs. Silicone uG	0.00015	***	
SiliconeDLIP GT vs. Silicone uG	1.90E-12	***	
CellMemb GT vs. SiliconeDLIP uG	1		
Silicone GT vs. SiliconeDLIP uG	<2.00E-16	***	
SiliconeDLIP GT vs. SiliconeDLIP uG	<2.00E-16	***	
Silicone GT vs. CellMemb GT	<2.00E-16	***	
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb GT	<2.00E-16	***	
SiliconeDLIP GT vs. Silicone GT	0.04074	*	

Cuadro 11.36: Cambios en el largo celular en el Día 2 en las dos gravedades y los 3 materiales usadoscon mAUMg-high Pi

Día 2			
Largo			
<i>Comparación</i>	<i>Valor-p</i>	<i>Sign.</i>	
Silicone uG vs. CellMemb uG	0.40334		
SiliconeDLIP uG vs. CellMemb uG	0.00013	***	
CellMemb GT vs. CellMemb uG	1		
Silicone GT vs. CellMemb uG	0.00377	**	
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb uG	0.00732	**	
SiliconeDLIP uG vs. Silicone uG	0.38091		
CellMemb GT vs. Silicone uG	1		
Silicone GT vs. Silicone uG	1		
SiliconeDLIP GT vs. Silicone uG	1		
CellMemb GT vs. SiliconeDLIP uG	0.08321	.	
Silicone GT vs. SiliconeDLIP uG	1		
SiliconeDLIP GT vs. SiliconeDLIP uG	1		
Silicone GT vs. CellMemb GT	0.7053		
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb GT	1		
SiliconeDLIP GT vs. Silicone GT	1		

Cuadro 11.37: Cambios en el diámetro celular en el Día 2 en las dos gravedades y los 3 materiales usadoscon mAUMg-high Pi

Día 2			
Diámetro			
<i>Comparación</i>	<i>Valor-p</i>	<i>Sign.</i>	
Silicone uG vs. CellMemb uG	1		
SiliconeDLIP uG vs. CellMemb uG	0.29666		
CellMemb GT vs. CellMemb uG	1		
Silicone GT vs. CellMemb uG	0.5547		
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb uG	1		
SiliconeDLIP uG vs. Silicone uG	1		
CellMemb GT vs. Silicone uG	1		
Silicone GT vs. Silicone uG	0.02667	*	
SiliconeDLIP GT vs. Silicone uG	1		
CellMemb GT vs. SiliconeDLIP uG	0.23016		
Silicone GT vs. SiliconeDLIP uG	0.00015	***	
SiliconeDLIP GT vs. SiliconeDLIP uG	1		
Silicone GT vs. CellMemb GT	0.69497		
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb GT	1		
SiliconeDLIP GT vs. Silicone GT	0.09139	.	

Cuadro 11.38: Cambios en el largo celular en el Día 3 en las dos gravedades y los 3 materiales usadoscon mAUMg-high Pi

Día 3			
Largo			
<i>Comparación</i>	<i>Valor-p</i>	<i>Sign.</i>	
Silicone uG vs. CellMemb uG	1		
SiliconeDLIP uG vs. CellMemb uG	1		
CellMemb GT vs. CellMemb uG	0.0012	**	

Cuadro 11.38: Cambios en el largo celular en el Día 3 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con mAUMg-high Pi

Día 3		
Silicone GT vs. CellMemb uG	0.7371	
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb uG	2.50E-13	***
SiliconeDLIP uG vs. Silicone uG	1	
CellMemb GT vs. Silicone uG	0.0228	*
Silicone GT vs. Silicone uG	1	
SiliconeDLIP GT vs. Silicone uG	4.70E-16	***
CellMemb GT vs. SiliconeDLIP uG	0.2533	
Silicone GT vs. SiliconeDLIP uG	1	
SiliconeDLIP GT vs. SiliconeDLIP uG	<2.00E-16	***
Silicone GT vs. CellMemb GT	0.7305	
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb GT	<2.00E-16	***
SiliconeDLIP GT vs. Silicone GT	<2.00E-16	***

Cuadro 11.39: Cambios en el diámetro celular en el Día 3 en las dos gravedades y los 3 materiales usados con mAUMg-high Pi

Día 3		
Diámetro		
<i>Comparación</i>	<i>Valor-p</i>	<i>Sign.</i>
Silicone uG vs. CellMemb uG	1	
SiliconeDLIP uG vs. CellMemb uG	1	
CellMemb GT vs. CellMemb uG	0.01693	*
Silicone GT vs. CellMemb uG	0.05985	.
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb uG	<2.00E-16	***
SiliconeDLIP uG vs. Silicone uG	1	
CellMemb GT vs. Silicone uG	0.15666	
Silicone GT vs. Silicone uG	0.00526	**
SiliconeDLIP GT vs. Silicone uG	<2.00E-16	***
CellMemb GT vs. SiliconeDLIP uG	1	
Silicone GT vs. SiliconeDLIP uG	0.00014	***
SiliconeDLIP GT vs. SiliconeDLIP uG	<2.00E-16	***
Silicone GT vs. CellMemb GT	1.30E-08	***
SiliconeDLIP GT vs. CellMemb GT	<2.00E-16	***
SiliconeDLIP GT vs. Silicone GT	<2.00E-16	***