

**EVOLUCIÓN ADAPTATIVA DE *CANDIDA GLABRATA* PARA LA OBTENCIÓN
DE CEPAS TERMOTOLERANTES**

JULIÁN DANIEL TORRES VANEGAS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**EVOLUCIÓN ADAPTATIVA DE *CANDIDA GLABRATA* PARA LA OBTENCIÓN
DE CEPAS TERMOTOLERANTES**

JULIÁN DANIEL TORRES VANEGAS

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

Ingeniero Químico

Directoras

Ph.D KATY C. KAO

Texas A&M University

Ph.D VIVIANA SÁNCHEZ TORRES

UIS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

A Dios, Señor y dador de vida, por ser el guía incondicional que me ayudó a hacer el camino, y así, darme a entender que la vida vale la pena.

A mis padres, Aminta y Aníbal, porque desde el primer día en que decidí mi carrera profesional, siempre mostraron su inquebrantable apoyo, y una vez más, sus sabios consejos fueron determinantes para la interminable construcción de mi ser.

A mis hermanos, Felipe y Carlos, porque con su ejemplo de vida me enseñaron que ser bueno en lo que se hace, no es tan valioso como ser excelente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos a:

Dra. Katy Kao, por concederme el privilegio de hacer parte de su grupo de investigación, por su dirección y soporte en la realización de esta investigación.

Mian Huang, estudiante de Doctorado de Texas A&M University y miembro del grupo de investigación del cual hice parte, por su inagotable paciencia y sus múltiples enseñanzas en el ámbito de la investigación.

Todos los miembros del grupo de investigación dirigido por la Dra. Kao, por sus pequeños pero apreciables aportes en la ejecución de este trabajo.

El departamento de Ingeniería Química de Texas A&M University y la Universidad Industrial de Santander, por el convenio establecido entre las dos partes, el cual me permitió la realización de esta pasantía de investigación.

Cada uno de los docentes de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander, por su enseñanza académica y humana, fundamentales para la formación de este ser profesional.

Dra. Viviana Sánchez Torres, por su orientación en la escritura de este proyecto y por depositar en mí su confianza y sus apreciaciones personales y académicas.

Mis amigos y compañeros, con quienes tuve la oportunidad de compartir innumerables vivencias a favor de este proceso de crecimiento personal y profesional.

Mi familia; mis padres, hermanos, abuelos, tíos y primos, que aportaron desde su espiritual apoyo hasta su incondicional amor, los cuales fueron, han sido y serán el motor que impulse mi vida hacia el servicio de la humanidad

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	14
1. METODOLOGÍA.....	18
1.1 Cepas y medios de cultivos.....	18
1.2 Descripción metodológica.....	18
1.2.1 Determinación del primer nivel de estrés para el inicio de los experimentos evolutivos.....	19
1.2.2 Estrategia de evolución adaptativa.....	20
1.2.3 Caracterización fenotípica.....	22
1.2.3.1 Pruebas de viabilidad.....	22
1.2.3.2 Análisis de distribución de fluorescencia.....	23
1.2.3.3 Cinética de crecimiento a 30°C.....	23
1.2.3.4 Cinética de crecimiento a 43°C.....	24
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
2.1 Primer nivel de estrés.....	25
2.2 Evolución adaptativa.....	25
2.2.1 Muestras obtenidas.....	25
2.2.2 Dinámica de la concentración celular.....	27
2.2.3 Niveles de estrés empleados.....	28

2.3 Caracterización fenotípica.....	29
2.3.1 Pruebas de viabilidad.....	29
2.3.2 Análisis de fluorescencia de las poblaciones.....	31
2.3.3 Cinética de crecimiento a 30°C.....	33
2.3.4 Cinética de crecimiento a 43°C.....	35
3. CONCLUSIONES.....	38
CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXOS.....	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de flujo de la secuencia de etapas de la investigación.....	19
Figura 2. Esquema del procedimiento de evolución adaptativa.....	21
Figura 3. Crecimiento celular en medio sólido en respuesta al estrés térmico por 30 minutos.....	26
Figura 4. Dinámica de la concentración celular durante los experimentos evolutivos.....	28
Figura 5. Resultados de las pruebas de viabilidad a alta temperatura por una hora de exposición.....	30
Figura 6. Análisis de proporción de fluorescencia de la población TE#1.....	32
Figura 7. Análisis de proporción de fluorescencia de la población TE#2.....	32
Figura 8. Análisis de proporción de fluorescencia de la población TE#3.....	33
Figura 9. Análisis de proporción de fluorescencia de la población TEC.....	34
Figura 10. Velocidad específica de crecimiento de las poblaciones a 30°C.....	35
Figura 11. Velocidad específica de crecimiento de las poblaciones a 43°C.....	37

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Muestras de las cepas obtenidas durante los experimentos evolutivos...	22
Tabla 2. Resultados de las pruebas de viabilidad a altas temperaturas por una hora de exposición.....	30
Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento de las poblaciones a 30°C.....	35

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A: Resultados de las pruebas de termotolerancia durante la evolución adaptativa.....	45
ANEXO B: Curvas de crecimiento exponencial a 30°C.....	51

RESUMEN

TÍTULO: EVOLUCIÓN ADAPTATIVA DE *CANDIDA GLABRATA* PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS TERMOTOLERANTES*

AUTOR: JULIÁN DANIEL TORRES VANEGAS**

PALABRAS CLAVE: Evolución adaptativa, *Candida glabrata*, Termotolerancia.

DESCRIPCIÓN:

Los biocombustibles ofrecen grandes ventajas sobre los combustibles derivados del petróleo y por ello, su demanda ha incrementado considerablemente en los últimos años. Entre ellos, el bioetanol es el más ampliamente usado en el sector transporte. Su obtención se lleva a cabo mediante fermentación a partir de almidón o sacarosa, y por ende, las materias primas más empleadas son jugo de caña de azúcar y almidón de maíz. Sin embargo, es necesario encontrar otras fuentes de materias primas que no compitan con su consumo en el ganado y las necesidades humanas para poder abastecer la creciente demanda de bioetanol. En ese sentido, los materiales lignocelulósicos son una alternativa muy favorable. Con el fin de abaratar y hacer más eficiente la producción de etanol, se propone el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) como ruta de obtención. Sin embargo, el mayor inconveniente radica en la diferencia de temperaturas óptimas a las cuales se dan la sacarificación y la fermentación. Por ello, la creación de cepas de microorganismos termotolerantes que puedan llevar a cabo el proceso fermentativo a altas temperaturas es una solución que permitiría incrementar la eficiencia en la producción de etanol y una gran reducción en los costos de enfriamiento. *Candida glabrata* es una especie de levadura que ha mostrado alta tolerancia a alta temperatura y se ha demostrado su capacidad para producir etanol. En este trabajo, se empleó un tratamiento de evolución adaptativa en laboratorio con el fin de obtener cepas termotolerantes. Se encontró que *Candida glabrata* logró adaptarse y crecer en condiciones de estrés térmico de 43°C.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directoras: Ph.D Katy C. Kao, Ph.D Viviana Sánchez T.

ABSTRACT

TITLE: ADAPTIVE EVOLUTION OF *CANDIDA GLABRATA* FOR THE OBTENTION OF THERMOTOLERANT STRAINS*

AUTHOR: JULIAN DANIEL TORRES VANEGAS**

KEYWORD: Adaptive evolution, *Candida glabrata*, Termotolerancia.

DESCRIPTION:

Biofuels offer great advantages over petroleum-based fuels and therefore, its demand has increased considerably in recent years. Among them, ethanol is the most widely used in the transportation sector. It is obtained by fermentation from starch or sucrose, and therefore, the most used raw materials are sugarcane juice and corn starch. However, it is necessary to find other sources of raw materials that do not compete with its use in livestock and human needs in order to meet the growing demand for bioethanol. In that sense, lignocellulosic materials are very favorable. In order to cheapen and make ethanol production more efficient, the Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) is proposed as an alternative way of obtention. However, the main disadvantage is the different optimal temperature at which saccharification and fermentation occur. Therefore, the creation of thermotolerant microorganism strains that can carry out the fermentation process at high temperatures is a solution that would increase efficiency in ethanol production and make a great reduction in cooling costs. *Candida glabrata* has shown high tolerance to high temperature and its ability to produce ethanol has been demonstrated. In this work, an adaptive evolution laboratory was applied to obtain thermotolerant strains. *Candida glabrata* was found to be able to adapt and grow under conditions of thermal stress at 43 °C.

* Bachelor Thesis

** Physics-Chemistry Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Advisors: Ph.D Katy C. Kao. Ph.D Viviana Sanchez T.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, a nivel mundial el sector de transporte ha sido fuertemente dependiente de los combustibles derivados del petróleo [1 y 2]. Es responsable del 60% del consumo mundial del petróleo, y además, contribuye al 70% de las emisiones globales de monóxido de carbono (CO) y 19% de las emisiones globales de dióxido de carbono (CO₂) [1]. Debido al incremento en el precio del petróleo y la naturaleza finita de los combustibles fósiles evidenciada con la crisis del petróleo en los setenta [2], y la creciente demanda energética para diferentes procesos industriales, el mayor reto del siglo XXI ha sido la búsqueda de nuevas fuentes alternativas de energía [2 y 4]. Sin embargo, dichas fuentes alternativas deben ser técnicamente factibles, económicamente competitivas, amigables ambientalmente y fácilmente disponibles [1].

En ese sentido, los biocombustibles ofrecen gran cantidad de ventajas sobre los combustibles derivados del petróleo: se pueden obtener a partir de biomasa, representan un ciclo de CO₂ en su combustión ya que no contribuye a la acumulación neta del mismo en la atmósfera [1 y 5], tienen un potencial altamente amigable con el medio ambiente ya que pueden contribuir a la mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero y son biodegradables, constituyendo una fuente de energía limpia, y por ende, sostenible [1,2 y 4].

Dentro de los biocombustibles, el bioetanol es sin duda el más ampliamente empleado en el sector de transporte a nivel mundial [1-6]. Ha sido introducido en gran escala en Brasil, EE.UU y algunos países europeos [2]. Puede utilizarse netamente como combustible de transporte o como aditivo a la gasolina, y así, contribuir a la disminución de gases de efecto invernadero, especialmente de CO₂ [1, 2, 3 y 6]. Además, el bioetanol presenta alto octanaje, alto calor de vaporización, alto poder de ignición, entre otras propiedades que lo constituyen

como un buen combustible en el sector de transporte, lo cual ha creado una demanda creciente durante los últimos años [1 y 2].

El proceso que se lleva a cabo para la obtención de bioetanol consiste en un procedimiento fermentativo a partir de almidón o sacarosa. Así, las materias primas más empleadas en dicho proceso son el jugo de caña de azúcar y el almidón de maíz, logrando una producción a precios competitivos [2, 5 y 6]. Sin embargo, se requiere de materias primas que no compitan con las necesidades humanas ni con su consumo en el ganado para poder suplir completamente dicha demanda en incremento [5 y 15]. Teniendo en cuenta que el costo de materias primas puede ser tan alto como un 40% del costo del bioetanol, se ha planteado la posibilidad de utilizar materiales lignocelulósicos, los cuales se encuentran en abundancia como residuos agrícolas e industriales. Algunos ejemplos son el bagazo, la paja de trigo y arroz, rastrojo de maíz, residuos de haba de soya, entre otros [3].

La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La composición de los mismos puede variar con la materia prima a emplear. La celulosa forma una estructura cristalina microfibril envuelta en una matriz de hemicelulosa y de lignina amorfa, haciendo de la lignocelulosa una estructura prácticamente insusceptible a la hidrólisis, llevada a cabo por las enzimas secretadas por bacterias y hongos en la sacarificación. Por ende, es necesario llevar a cabo procedimientos de pretratamiento químicos y fisicoquímicos para hacer que la celulosa y la hemicelulosa sean más accesibles a la hidrólisis, con el fin de obtener azúcares disponibles para la fermentación [15].

Para hidrolizar la celulosa en azúcares solubles, se requiere la actividad de múltiples enzimas, entre ellas, la celulasa. Sin embargo, la glucosa, obtenida como producto de la hidrólisis, genera inhibición en la celulasa. Por ello, la hidrólisis enzimática, idealmente, debe llevarse a cabo junto con la fermentación; este proceso es denominado como sacarificación y fermentación simultánea (SSF por

sus siglas en inglés) [1-3, 5 y 15]. Durante este proceso, la glucosa liberada por la acción enzimática se convierte directamente a etanol por la acción de los microorganismos fermentadores. Además, podría involucrar la utilización de menos equipos, reduciendo así el costo de inversión, y la operación se vería simplificada por la integración de la sacarificación y la fermentación. La principal ventaja del proceso SSF radica en la anulación de la inhibición de la celulasa por la glucosa, lo cual permite incrementar la velocidad de la sacarificación y el rendimiento de etanol [15].

No obstante, el mayor inconveniente del proceso SSF consiste en la temperatura óptima a la cual se llevan a cabo las etapas de sacarificación y fermentación. Mientras la sacarificación con enzimas celulolíticas se da óptimamente a 50°C [15 y 17], la mayoría de los microorganismos fermentadores logran su crecimiento y su acción catalizadora a una temperatura entre 28 y 37°C. En la práctica, sería difícil reducir la temperatura óptima de la celulasa por medio de técnicas ingenieriles de proteínas [15]. En consecuencia, la mejor opción para llevar a cabo el proceso SSF es empleando altas temperaturas tanto para la fermentación como para la sacarificación. Además, la producción de etanol a elevadas temperaturas ha recibido gran atención por parte de diferentes investigaciones, ya que se encuentran ventajas en la reducción de costos asociados a los sistemas de enfriamiento, especialmente en países tropicales, una prevención de la inactivación irreversible de las levaduras [13], la evaporación continua de etanol del caldo fermentativo por presión reducida, una disminución en el riesgo de contaminación, así como un mejoramiento de la eficiencia del proceso SSF [5, 6, 14 y 15].

Se dice que las células en fase de crecimiento de una colección de microorganismos procariotas y eucariotas padecen una rápida pérdida de viabilidad cuando son expuestas a temperaturas no compatibles con su crecimiento normal. Sin embargo, estas células pueden adaptarse a dicho estrés usualmente letal, siempre y cuando sean sometidos primero a una temperatura

óptima de crecimiento [11 y 18]. Cuando las células enfrentan este estrés, ocurren cambios dinámicos en la red biológica compleja que comprende genes, proteínas, metabolitos, etc. Y que involucran la realización de una función celular. La investigación de dichas respuestas moleculares, ayudará a entender los mecanismos moleculares por los cuales se da la adaptación de las células a las condiciones de fermentación deseadas [7-9 y 19].

En esta investigación, el objetivo es la obtención de cepas termotolerantes de la especie *Candida glabrata*, mediante una estrategia de evolución adaptativa en laboratorio. La elección de la especie se fundamenta en que la misma ha mostrado mayor tolerancia a alta temperatura [15] y una efectiva capacidad para producir bioetanol a escala laboratorio [16 y 17].

1. METODOLOGÍA

1.1 Cepas y medios de cultivo

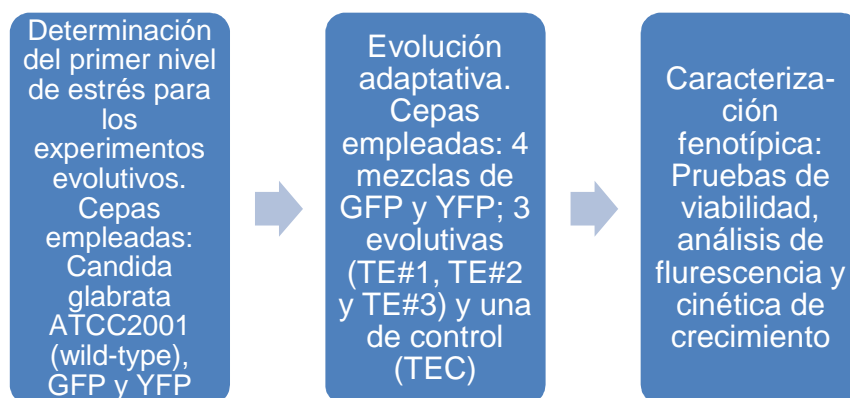
Las cepas empleadas en la investigación fueron tres: *Candida glabrata* ATCC2001, la cepa de tipo salvaje (WT por su sigla en inglés) y dos cepas de la misma especie, marcadas con la proteína fluorescente verde (GFP por su sigla en inglés) y con la proteína fluorescente amarilla (YFP por su sigla en inglés).

Para cultivos líquidos, el medio empleado fue un caldo de medio YNB cuya composición es la siguiente: 20 g/l de glucosa, 1,7 g/l de YNB en polvo sin sulfato de amonio y 5 g/l de sulfato de amonio. Para cultivos sólidos, el medio de cultivo empleado fue el descrito anteriormente, agregando Agar en una concentración de 20 g/l.

1.2 Descripción metodológica

La figura 1 muestra un diagrama de flujo en el cual se muestra la secuencia general de la metodología llevada a cabo en este trabajo.

Figura 1. Diagrama de flujo de la secuencia de etapas de la investigación



1.2.1. Determinación del primer nivel de estrés para el inicio de los experimentos evolutivos

Por medio de pruebas de choque térmico, se buscó encontrar una temperatura en la cual se halle una sobrevivencia intermedia, es decir no nula, de las células, luego de dicho estrés. Así, las células de cada una de las cepas se cultivaron por separado una noche a 30°C y una agitación constante de 170 rpm hasta alcanzar un estado fisiológico en el cual la muestra mostrara una densidad óptica (OD por su sigla en inglés) entre 1,2 y 1,5. Luego, se tomaron muestras de 0,5 ml y se ajustó el OD a 0,5 (dos réplicas) para ser tratadas a un estrés térmico por 30 minutos a 46, 47, 48 y 49°C en un baño de agua. Después del tratamiento, las muestras fueron diluidas 10, 100 y 1000 veces y goteadas en cajas de Petri de cultivo sólido. Finalmente, las cajas de Petri fueron incubadas a 30°C por dos días. También se diluyeron y cultivaron en sólido muestras de células no sometidas a estrés térmico (dos réplicas) como cultivos de control para realizar la respectiva comparación. Así se determinó la temperatura a la cual se presentó una diferencia pequeña entre el número colonias que crecieron luego del estrés térmico y el

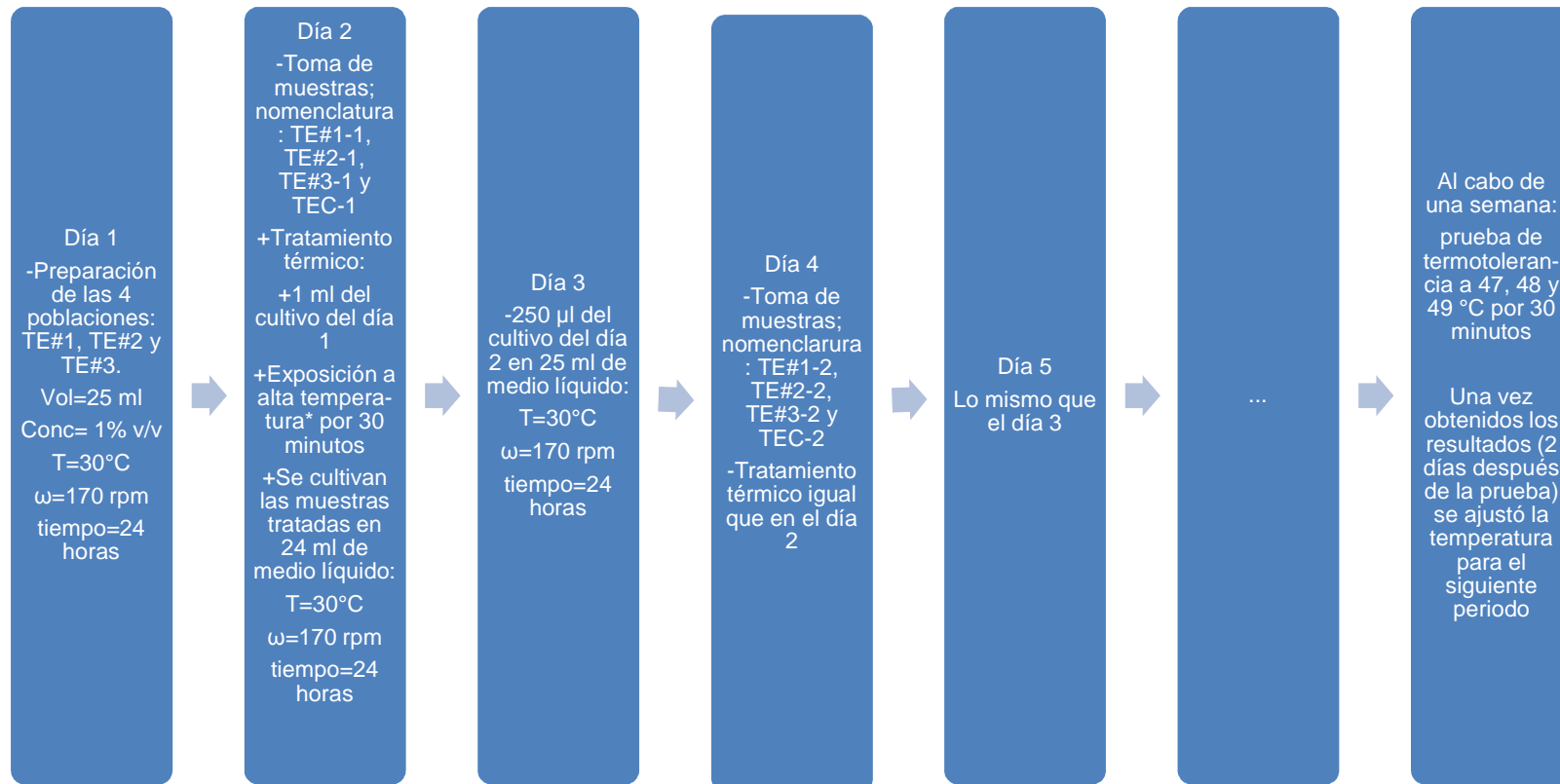
control sin estrés. Es decir, se escogió una temperatura que no causara una muerte completa de las células, sin tampoco escoger una temperatura baja que no cause ningún efecto en el crecimiento celular.

1.2.2 Estrategia de evolución adaptativa

Muestras de las cepas marcadas con GFP y YFP fueron mezcladas equitativamente. Luego, se inocularon 250 µl de dichas mezclas en 25 ml de medio de cultivo líquido, obteniendo cuatro poblaciones diferentes: TE#1, TE#2, TE#3 (poblaciones para someter a evolución), y TEC como la población de control. La figura 2 muestra un diagrama explicativo del procedimiento de evolución.

En los días en que se realizó el tratamiento térmico de adaptación, se tomaron muestras de las cuatro poblaciones justo antes de llevar a cabo el mismo. Estas muestras fueron diluidas en una solución de glicerol al 50% v/v, y almacenadas a -80°C y fueron empleadas para los estudios fenotípicos posteriores. Las muestras fueron nombradas con el nombre de la población, seguido por el número de la muestra. Por ejemplo, TE#1-1 corresponde a la primera muestra obtenida justo antes del primer día en que se realizó el tratamiento térmico de adaptación (Figura 1). La finalización de la evolución se determinó mediante las pruebas de termotolerancia semanales, empleando el mismo criterio de las pruebas empleadas para la determinación del primer nivel de estrés. En general, la evolución tomó aproximadamente 2 meses.

Figura 2. Esquema del procedimiento de evolución adaptativa.



* Según el nivel escogido en la determinación del primer nivel de estrés

1.2.3. Caracterización fenotípica

La Tabla 1 muestra las muestras obtenidas de la evolución, empleadas para la medición de viabilidad y de la cinética de crecimiento a 30°C.

Tabla 1. Muestras de la evolución, empleadas en las pruebas de viabilidad y en la cinética de crecimiento a 30°C

TE#1	TE#2	TE#3	TEC*	Descripción
TE#1-5	TE#2-5	TE#3-5	TEC-5	Última población obtenida antes de incrementar la temperatura de adaptación evolutiva de 47°C a 48°C.
TE#1-10	TE#2-10	TE#3-12	TEC-12	Última población obtenida antes de incrementar la temperatura de adaptación evolutiva de 48°C a 49°C.
TE#1-17	TE#2-17	TE#3-13	TEC-19	Última población obtenida antes de incrementar la temperatura de adaptación evolutiva de 49°C a 50°C.
TE#1-27	TE#2-27	TE#3-24	TEC-29	Última población obtenida de la evolución.

* TEC corresponde a la población de control. Su tratamiento adaptativo se llevó a 30°C.

1.2.3.1. Pruebas de viabilidad

Las células fueron cultivadas por una noche en 5 ml de medio de cultivo líquido a 30°C, 170 rpm hasta alcanzar un OD entre 2,0 y 3,0. Después se tomaron muestras de las poblaciones de 0,5 ml y se ajustaron a un OD de 0,5 para ser sometidas a un baño de agua a alta temperatura y a 30°C (temperatura de control) por una hora. Luego del baño de agua, las muestras fueron diluidas 1000 y 10000 veces, y se cultivaron en medio sólido a 30°C por 2 días. Luego se estimó el número de Unidades Formadoras de Colonias (CFU por su sigla en inglés) en las cajas de Petri. Para el cálculo del porcentaje de viabilidad, se asumió que el CFU

encontrado en los cultivos con las muestras tratadas a la temperatura de control, correspondía a 100% de viabilidad. Los experimentos fueron realizados en triplicado.

1.2.3.2. Análisis de distribución de fluorescencia

Las células fueron cultivadas por una noche en 5 ml de medio de cultivo líquido a 30°C, 170 rpm hasta obtener una concentración celular inicial correspondiente a un OD entre 0,5 y 1,0. Posteriormente, se tomaron muestras de 400 µl en tubos de 5 ml de capacidad. Finalmente, se insertaron los tubos en un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS por sus siglas en inglés), el cual fue conectado a un computador que ejecutó el programa BD CellQuest Pro.

1.2.3.3. Cinética de crecimiento a 30°C

Además de las muestras citadas en la tabla 1, se emplearon la primera muestra obtenida de la población de control (TEC-1) y la cepa de tipo salvaje (WT). Las células fueron cultivadas en 5 ml de medio de cultivo líquido por 48 horas a 30°C, 170 rpm. Luego, se inocularon en una microplaca de 96 pozos, con un volumen de medio de cultivo líquido de 200 µl en cada pocillo y un OD ajustado de 0,01. Las mediciones fueron realizadas por un espectrofotómetro de microplacas, TECAN Infinite M200, el cual fue programado para realizar las mediciones del crecimiento celular la temperatura a 30°C y a una agitación constante de 200 rpm, durante un día. Los experimentos fueron realizados empleando seis réplicas técnicas y la velocidad específica de crecimiento fue estimada ajustando los puntos correspondientes mediante regresión lineal en Excel 2010.

1.2.3.4 Cinética de crecimiento a 43°C

Las células fueron cultivadas por una noche en 5 ml de medio de cultivo líquido a 30°C, 170 rpm. Luego, se inocularon en frascos Erlenmeyer con un volumen de medio de cultivo de 25 ml y un OD inicial de 0,01, y se insertaron en un baño de agua a 43°C y 170 rpm. Después de 5 horas, las mediciones de la densidad óptica se hicieron cada hora. Los experimentos fueron realizados en triplicado por muestra de población, y mediante ajustes de regresión lineal en Excel, se estimó la velocidad específica de crecimiento. Para este caso, no se pudo emplear el equipo empleado para la medición de la cinética de crecimiento a 30°C debido a que la temperatura excedía el límite de operación del mismo.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 Primer nivel de estrés

En la figura 3 se muestran la comparación entre las imágenes de los cultivos sólidos resultantes de las células sometidas a estrés térmico por 30 minutos a 46, 47, 48 y 49 °C (figuras de la izquierda) y las imágenes de los cultivos de las células no sometidas a estrés térmico (figuras de la derecha). Se obtuvo que las células estresadas a 46°C mostraron una respuesta en el crecimiento celular similar a aquellas células no estresadas (Fig. 2A y 2B). Por otra parte las células estresadas a 48°C y 49°C (Fig 2E y 2G) se vieron fuertemente afectadas en comparación con sus respectivas células no estresadas (Fig 2F y 2H). Se obtuvo una respuesta aceptable por parte de las células estresadas a 47°C (Fig 2C) comparadas con sus células no estresadas (Fig 2D). Por ello, se decidió comenzar los experimentos evolutivos empleando un estrés inicial correspondiente a 47°C.

2.2 Evolución adaptativa

2.2.1. Muestras obtenidas

De las poblaciones creadas y sometidas a evolución adaptativa se obtuvieron 27 muestras de las poblaciones TE#1 y TE#2, mientras que de las poblaciones TE#3 y TEC se obtuvieron 29 muestras.

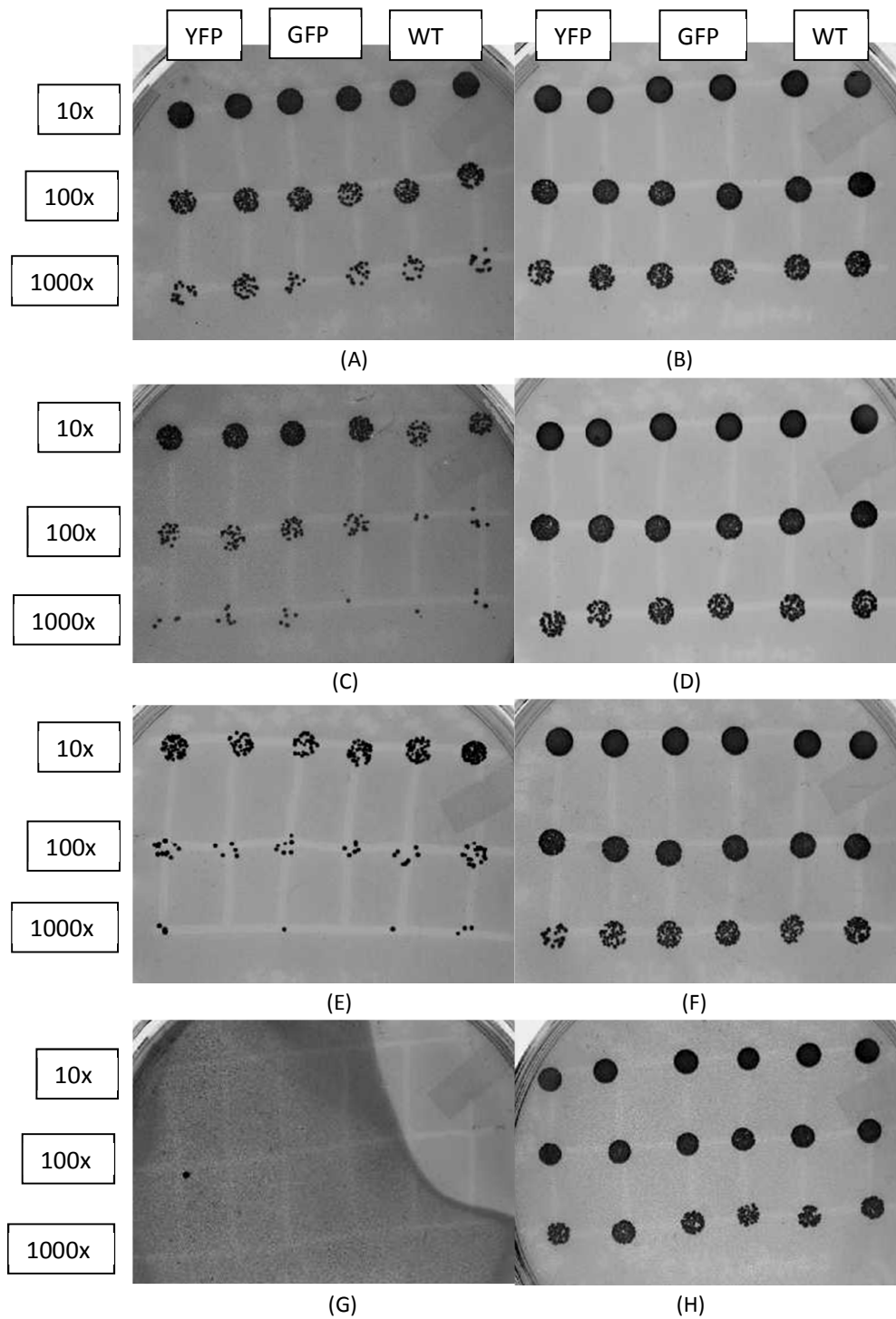
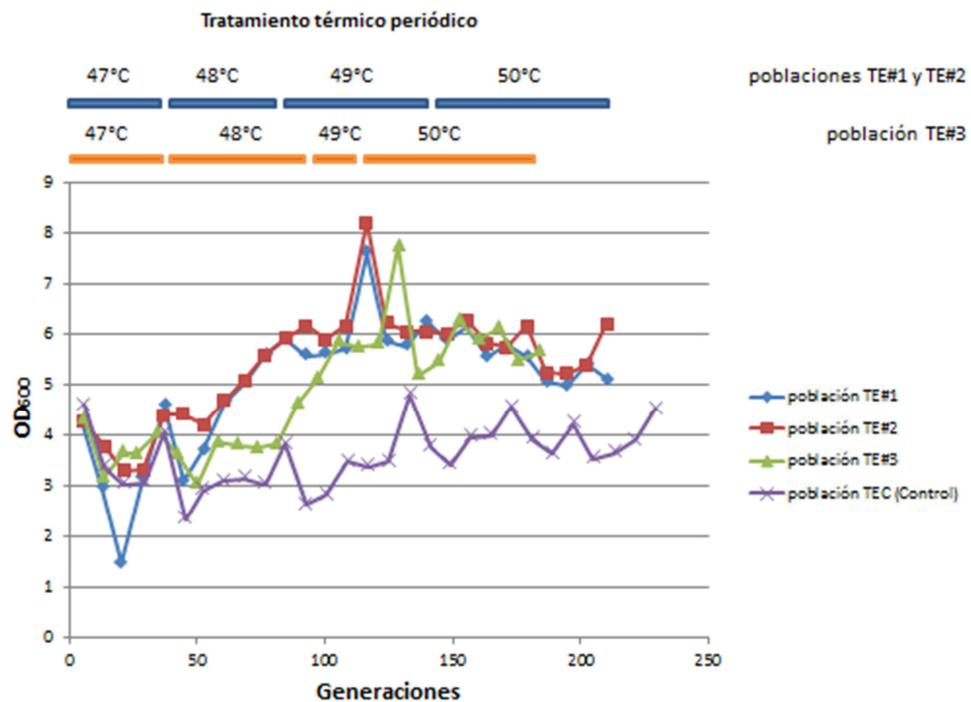


Figura 3 Crecimiento celular en medio sólido en respuesta al estrés térmico por 30 minutos. Condiciones empleadas: 46°C (A); 47°C (C); 48°C (E) y 49°C (G). (B), (D), (F) y (H) corresponden a los cultivos de las muestras de control (no estresadas)

2.2.2. Dinámica de la concentración celular

La figura 4 muestra la dinámica del OD a medida que se fueron presentando más generaciones de las diferentes cepas creadas. Teniendo en cuenta que el OD otorga una medida de la concentración celular, se puede observar que las poblaciones TE#1 y TE#2 mostraron un comportamiento ascendente en la concentración celular luego de aproximadamente 50 generaciones. Al cabo de 100 generaciones se puede observar una diferencia considerable en la concentración celular de las poblaciones evolutivas y la población de control, lo cual permite inferir que, en dicho punto, las células sometidas a estrés térmico de manera periódica lograron adaptarse y reproducirse ante dichas condiciones, mientras que aquellas que no fueron sometidas al estrés fijado no mostraron un incremento en la concentración celular de sus respectivos cultivos. Para las últimas generaciones, la concentración celular de los cultivos celulares de las poblaciones sometidas a estrés disminuyó de manera ligera, lo cual permite deducir una pérdida ligera en la capacidad de adaptación al estrés al cual fueron sometidas las células.

Figura 4. Dinámica de la concentración celular durante los experimentos evolutivos



2.2.3. Niveles de estrés empleados

Como ya se mencionó, el primer nivel de estrés térmico fue el correspondiente a una temperatura de 47°C. A partir de ahí, mediante las pruebas de termotolerancia expuestas anteriormente, se obtuvieron niveles de estrés correspondientes a 48, 49 y 50 °C como la última temperatura empleada en los experimentos evolutivos. En el anexo A se muestran las imágenes de los resultados de dichas pruebas. Se puede observar que luego de que las cepas evolutivas fueron sometidas a 48°C (ver figuras A1-A y A2-A) y a 49°C (ver figuras A1-C y A2-C) por 30 minutos se obtuvo una respuesta mejorada en el crecimiento celular, en comparación con las cepas parentales (figuras 2C y 2E). También se pudo observar que la población de control, la cual no fue sometida a estrés térmico, mostró una respuesta negativa en su crecimiento luego de 48 horas del tratamiento adaptativo. Sin embargo, para

las últimas pruebas de termotolerancia, se observó un ligero mejoramiento en el crecimiento celular luego de ser sometida a estrés térmico en dichas pruebas (ver figuras A5 y A6). Ésto podría sugerir que, a pesar que la población de control no fue sometida a altas temperaturas de manera periódica, dicha población mostró una ligera adquisición de propiedades termotolerantes.

2.3. Caracterización fenotípica

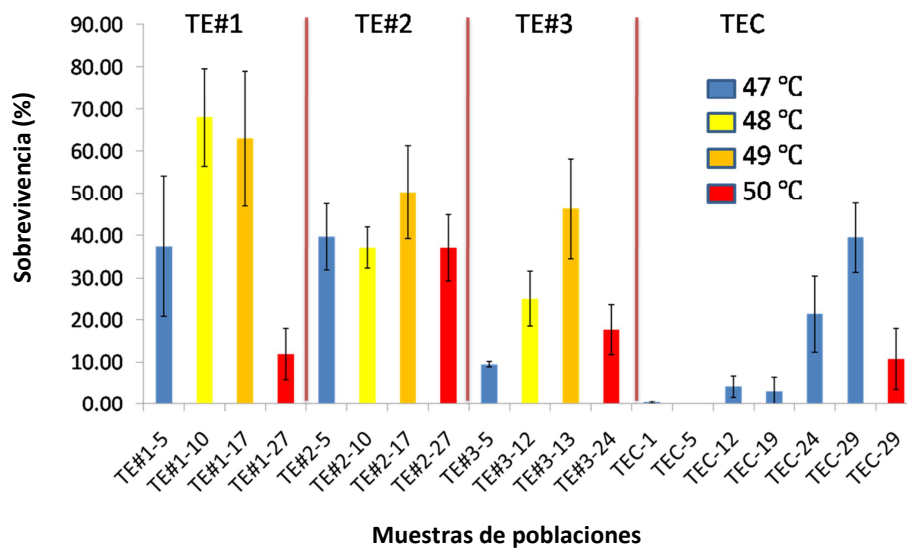
2.3.1. Pruebas de viabilidad

La tabla 2 y la figura 5 muestran los resultados de las pruebas de viabilidad realizadas con el fin de caracterizar la sobrevivencia de las poblaciones listadas, empleando como tiempo de exposición una hora. La tabla muestra una viabilidad promedio de las réplicas ensayadas con su correspondiente desviación estándar (STD). De acuerdo a los resultados, se puede observar que la sobrevivencia en TE#1 fue mayor a 48°C con respecto a la obtenida a 47°C, lo cual un mejoramiento de la termotolerancia entre 35 y 70 generaciones aproximadamente para dicha población. Para TE#2, la sobrevivencia más alta se obtuvo en la muestra ensayada a 49°C, es decir al cabo de 132 generaciones. TE#3 mostró un comportamiento ascendente de la sobrevivencia desde 47 a 49 °C. Sin embargo, el resultado más sorprendente lo mostró TEC, ya que la sobrevivencia incrementó drásticamente al cabo de 189 generaciones, para obtener una viabilidad cercana a 40% a 47°C. Por consiguiente, se puede inferir que la población TEC también evolucionó a ser resistente a estrés térmico, aun cuando dicha población solo fue tratada a 30°C.

Tabla 2. Resultados de las pruebas de viabilidad a altas temperaturas por una hora de exposición.

Población	Muestra	Descripción	Temp [°C]	Viabilidad [%]	STD
TE#1	TE#1-5	última población antes de incrementar la temp de 47 a 48°C	47	37,45	16,60
	TE#1-10	última población antes de incrementar la temp de 48 a 49°C	48	68,06	11,60
	TE#1-17	última población antes de incrementar la temp de 49 a 50°C	49	62,99	16,1
	TE#1-27	última población de la evolución	50	11,86	6,03
TE#2	TE#2-5	última población antes de incrementar la temp de 47 a 48°C	47	39,73	7,8
	TE#2-10	última población antes de incrementar la temp de 48 a 49°C	48	37,1	4,84
	TE#2-17	última población antes de incrementar la temp de 49 a 50°C	49	50,22	11,03
	TE#2-27	última población de la evolución	50	37,06	7,75
TE#3	TE#3-5	última población antes de incrementar la temp de 47 a 48°C	47	9,48	0,71
	TE#3-12	última población antes de incrementar la temp de 48 a 49°C	48	25,07	6,55
	TE#3-13	última población antes de incrementar la temp de 49 a 50°C	49	46,27	11,81
	TE#3-24	última población de la evolución	50	17,69	5,9
TEC	TEC-1	primera población de control durante la evolución	47	0,35	0,31
	TEC-5	-	47	0	0
	TEC-12	-	47	4,17	2,56
	TEC-19	-	47	3,09	3,26
	TEC-24	-	47	21,39	9,03
	TEC-29	última población de control	47	39,53	8,14
	TEC-29	última población de control	50	10,73	7,25

Figura 5. Resultados de las pruebas de viabilidad a alta temperatura por una hora de exposición.



2.3.2. Análisis de fluorescencia de las poblaciones

Como las poblaciones a estudiar durante la evolución fueron creadas mediante la mezcla de las cepas de tipo salvaje marcadas con GFP y YFP, el objetivo de dicho análisis es mostrar el comportamiento de las proporciones de dichas cepas. Las figuras 6, 7, 8 y 9 muestran la variación de las proporciones de fluorescencia verde (GFP), fluorescencia amarilla (YFP) y la proporción de células no-fluorescentes en cada una de las poblaciones utilizadas en la investigación. Paralelamente, se muestran las temperaturas empleadas durante los experimentos de evolución adaptativa en las poblaciones correspondientes.

La figura 6 corresponde a la población TE#1, en la cual se puede observar un evento adaptativo en el punto en el cual la temperatura es ajustada desde 47°C a 48°C. Desde dicho punto, las células GFP dominaron prácticamente por completo sobre las demás, y por ende, hay coherencia con el hecho de que la viabilidad evaluada a 48°C haya sido mayor que a 47°C. De acuerdo a la figura 7, la población TE#2 mostró un comportamiento muy similar a TE#1, en la cual, también, la proporción dominante fue GFP. Para TE#3 (ver figura 8), el comportamiento de la proporción a lo largo de las generaciones obtenidas diferenció en el hecho de que la proporción que resultó dominante fue YFP. Además, el evento adaptativo se presentó en el punto en el cual la temperatura fue ajustada de 48 a 49°C, y rápidamente de 49°C a 50°C, lo cual explica que la viabilidad haya sido más alta en la muestra sometida a 49°C.

Figura 6. Análisis de proporción de fluorescencia de la población TE#1.

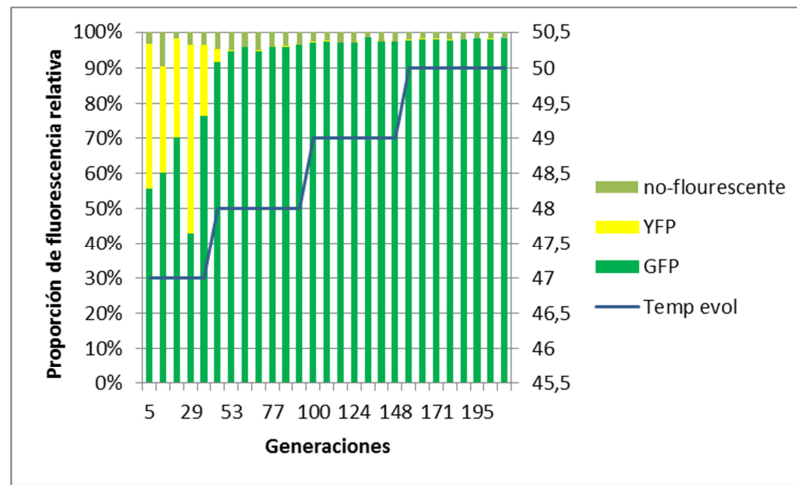


Figura 7. Análisis de proporción de fluorescencia de la población TE#2.

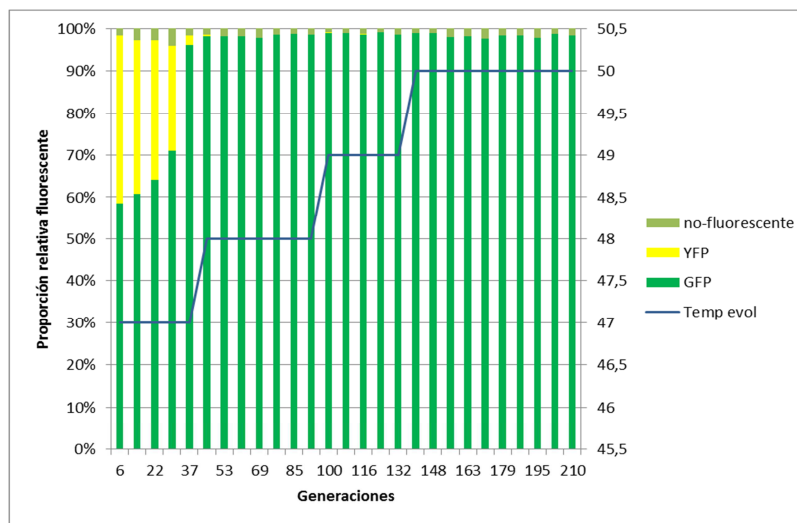
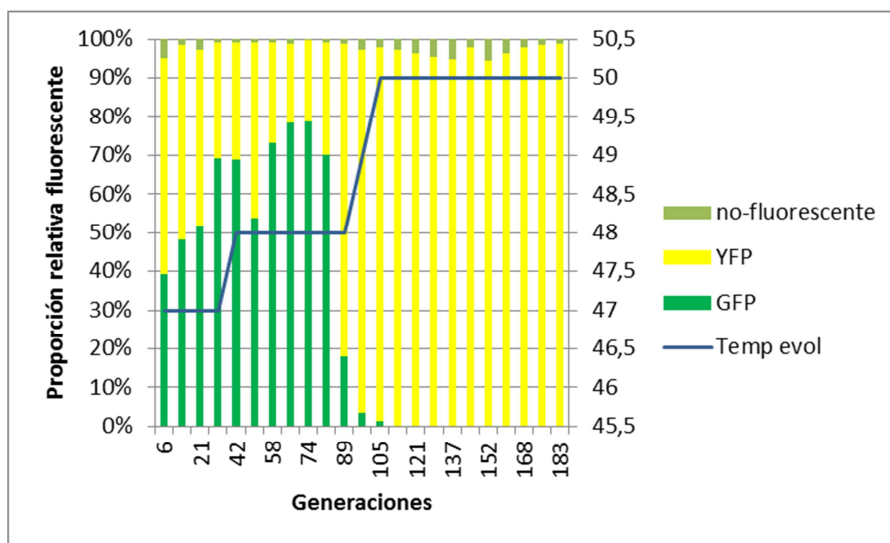
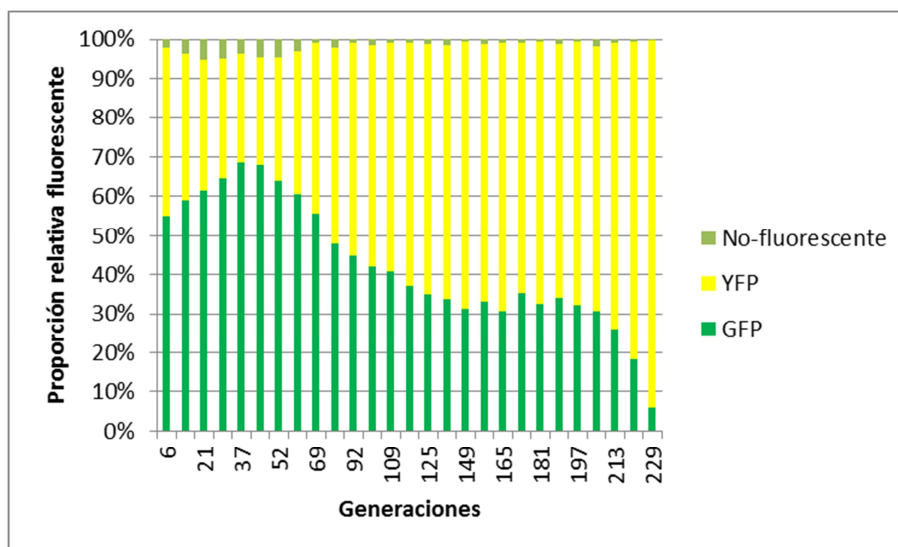


Figura 8. Análisis de proporción de fluorescencia de la población TE#3.



Analizando la población de control, se encontró que en las últimas generaciones, la proporción predominante fue YFP (ver figura 9). Sin embargo, en los puntos en los cuales la viabilidad incrementó considerablemente, no se observaron cambios drásticos en las proporciones de células fluorescentes. Como las muestras analizadas para los estudios fenotípicos fueron tomadas antes de realizar el correspondiente tratamiento adaptativo de estrés térmico. De esta manera, se puede inferir que la adquisición de termotolerancia en la población TEC, se dio en los días en que las células fueron inoculadas en nuevos cultivos. Por ende, se plantea la posibilidad de que las mutaciones fueron conferidas de manera aleatoria. Para confirmar esto, se realizaron las pruebas de viabilidad sobre otra población de control independiente de esta investigación que recibió el mismo tratamiento evolutivo, es decir, a unas condiciones de 30°C por 30 minutos. Los resultados indicaron que dicha población de control mostró baja viabilidad a temperaturas entre 47 y 50°C por una hora de exposición. Por tanto, se confirmó que la adquisición de mutaciones benéficas para la termotolerancia en la población de control, aparecieron por casualidad.

Figura 9. Análisis de proporción de fluorescencia de la población TEC.



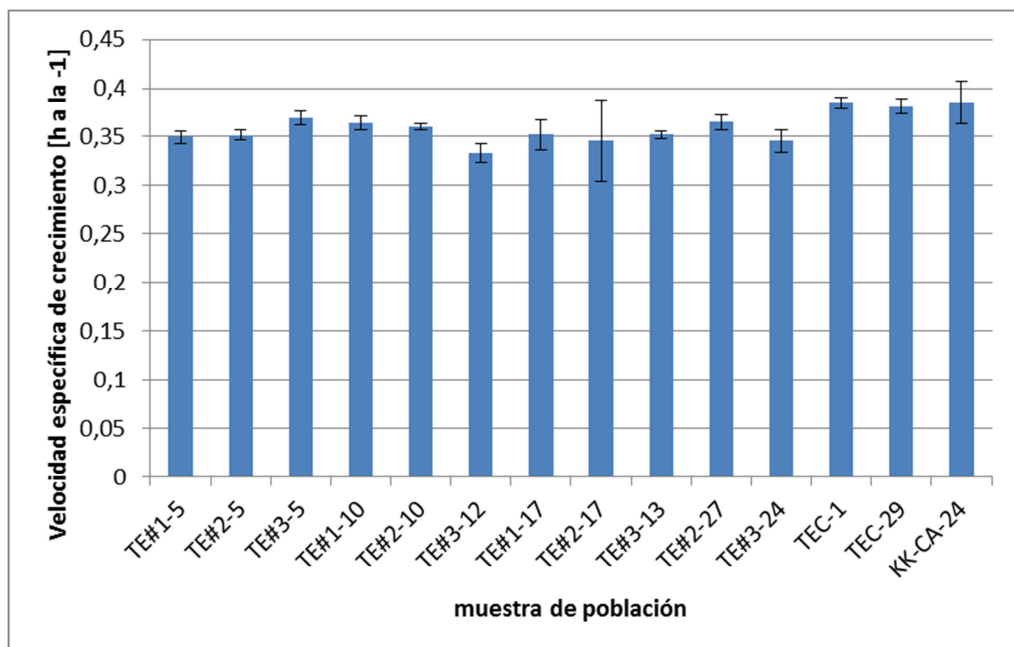
2.3.3. Cinética de crecimiento a 30° C

Como resultados destacables de este estudio, se encontró que la velocidad específica de crecimiento (μ) no se diferenció considerablemente entre las muestras de las poblaciones evolucionadas y las muestras de la población de control y de la cepa de tipo salvaje, nombrada como KK-CA-24 en las figuras del Anexo B (ver tabla 3 y figura 10). Interesantemente, analizando las curvas de crecimiento exponencial de dichas muestras de poblaciones (ver Anexo B), se encontró que la fase adaptativa fue ligeramente más corta para las muestras de las poblaciones evolucionadas, en comparación con la primera muestra de la población de control, TEC-1, y con KK-CA-24. La última muestra de la población de control, TEC-29, también mostró una fase adaptativa más corta, semejante a las poblaciones evolucionadas, lo cual es coherente con el hecho de que la población de control experimentó una ganancia de termotolerancia. Como ya se explicó, dicha termotolerancia fue adquirida por mutaciones benéficas conferidas de manera aleatoria.

Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento de las poblaciones a 30°C

Población	μ [h ⁻¹]	STD [h ⁻¹]
TE#1-5	0,3495	6,17E-03
TE#2-5	0,35178	5,12E-03
TE#3-5	0,36942	6,69E-03
TE#1-10	0,36414	7,61E-03
TE#2-10	0,36036	2,99E-03
TE#3-12	0,333	9,48E-03
TE#1-17	0,3522	1,54E-02
TE#2-17	0,34632	4,14E-02
TE#3-13	0,35202	3,60E-03
TE#2-27	0,3648	7,26E-03
TE#3-24	0,34554	1,16E-02
TEC-1	0,38472	6,01E-03
TEC-29	0,38112	7,54E-03
KK-CA-24	0,38502	2,19E-02

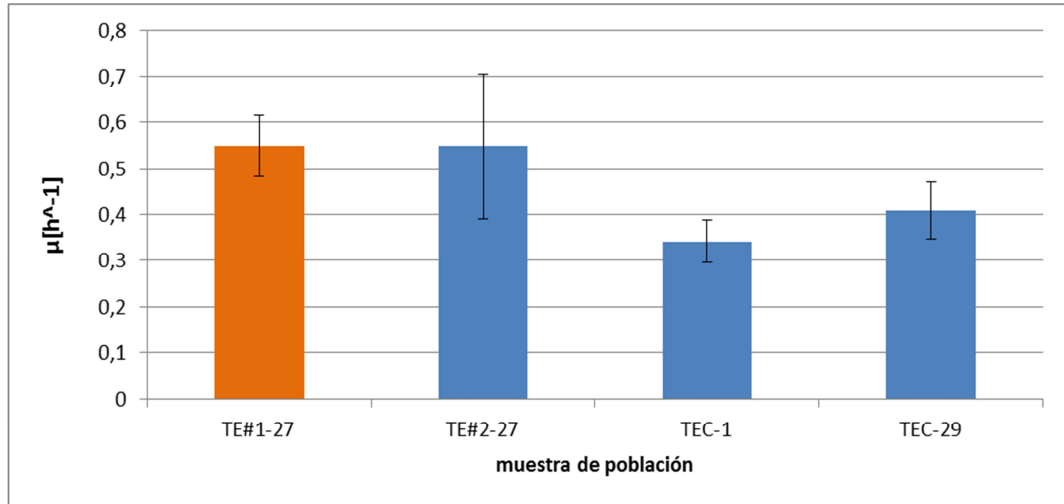
Figura 10. Velocidad específica de crecimiento de las poblaciones a 30°C



2.3.4 Cinética de crecimiento a 43°C

Estimando las velocidades específicas de crecimiento de las poblaciones TE#1-27 y TE#2-27 (últimas muestras de las correspondientes poblaciones, obtenidas en la evolución), junto con las poblaciones TEC-1 (primera población de control de la evolución) y TEC-29 (última población de control de la evolución) se obtuvo la figura 11. Aritméricamente, se obtuvo una mayor velocidad específica de crecimiento en las poblaciones evolucionadas, comparadas con las de las muestras de la población de control. Para valorar si dicha diferencia es significativa, se realizó una prueba estadística T-test student, tomando como punto de comparación la muestra TEC-1, puesto que, por los estudios mencionados previamente, la población de control empleada en esta investigación presentó evolución a ser tolerante a altas temperaturas, lo cual no es el caso normal. Se encontró que TE#1-27 presentó diferencia estadística con respecto a la población de control (valor $p < 0,05$), lo cual indica que las células de la población evolucionada TE#1 presentaron mejor facilidad para su crecimiento ante un estrés térmico continuo de 43°C. Dicho resultado muestra un buen indicio acerca de la estrategia de evolución empleada, puesto que refleja que, mediante la misma, se pueden obtener células que logran crecer ante una condición adversa de estrés térmico continuo, teniendo en cuenta que su crecimiento óptimo se da entre 28 y 37°C. En contraste, la población TE#2-27 no se encontró estadísticamente diferente en comparación con la población de control, TEC-1 (valor $p > 0,05$). Al realizar la prueba estadística entre la última población de control, TEC-29, en comparación con la primera muestra, TEC-1, no se obtuvo una diferencia significativa (valor $p > 0,05$) en su velocidad de crecimiento, lo cual indica que el incremento de propiedades termotolerantes en la población de control no fue tan considerable, en comparación con la población evolucionada TE#1.

Figura 11. Velocidad específica de crecimiento de las poblaciones a 43°C



3. CONCLUSIONES

La evolución adaptativa fue una técnica efectiva para la obtención de cepas de *Candida glabrata* capaces de crecer ante un estrés térmico de 43°C.

Se obtuvieron cepas que pueden adaptarse más rápidamente al medio YNB a 30°C.

Mutaciones benéficas, adquiridas aleatoriamente en las células, pueden también ser responsables de conferir propiedades de termotolerancia en *Candida glabrata*.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Balat, M., Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ Convers Manage*, 2010. **52** (0): p. 858-875.
- [2] Hahn Hägerdal, B., et al., Bioethanol- the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol*, 2006. **24** (12): p. 549-555.
- [3] Zaldivar, J., Nielsen, J. y Olsson, L., Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001. **56** (0): p. 17-34.
- [4] Wheals, A. E., et al., Fuel ethanol after 25 years. *Focus*, 1999. **17** (0): p. 482-487.
- [5] Jeffries, T. W y Yong-su, J., Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeast. *Adv Appl Microbiol*, 2000. **47** (0): p. 221-268.
- [6] Hernández, M. T., Tendencias actuales en la producción de bioetanol. En: Conferencia dictada en la facultad de Ingeniería – TEC Landívar, Universidad Rafael Landívar (Noviembre de 2007): p. 1-17
- [7] Benjaphokee, S., et al., Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. *New biotechnology*, 2012. **29** (3): p. 379-386.

- [8] Shi, D., Wang, C. y Wang, K., Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009. **36** (0): p. 139-147.
- [9] Lin, Y., et al., The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. Biochem Bioph Res Co, 2009. **387** (0): 778-783.
- [10] Pramanik, K. y Rajni K., Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. J Biosci Bioeng, 2012. **114** (6): p. 622-629.
- [11] Argüelles, J. C., Thermotolerance and trehalose accumulation induced by heat shock in yeast cells of *Candida albicans*. FEMS Microbiology Letters, 1996. **146** (0): p. 65-71.
- [12] Bai, F. W. y Zhao, X. Q., Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. J Biotechnol, 2009. **144** (0): p. 23-30.
- [13] Abdel-Banal, BMA., et al., High-temperature fermentation; how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **85** (0): p.861-867.

- [14] Balakumar, S., Arasaratnam, V. y Balasubramaniam, K., Isolation and improvement of a thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *World J Microb Biot*, 2001. **17** (0): p. 739-746.
- [15] Hasunuma, T., y Kondo, A., Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochem*, 2012. **47** (0): p. 1287-1294.
- [16] Shima, J., Nakamura, T. y Watanabe, I., Characterization of a spontaneous flocculation mutant derived from *Candida glabrata*: a useful strain for bioethanol production. *J Biosci Bioeng*, 2009. **107** (4): 379-382.
- [17] Shima, J., Nakamura, T. y Watanabe, I., Strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* for bioethanol production. *J Biosci Bioeng*, 2010. **110** (2): p. 176-179.
- [18] Aguilera, L.L., Estudio de Pga26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. Trabajo de grado Doctora. Valencia, España: Universidad de Valencia. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología y Ecología, 2009. 70 p.
- [19] Fernández, T., et al., Aislamiento y evaluación de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de aguardientes y rones. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2008. **6** (1): p. 64-70.

BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-BANAL, BMA., et al., High-temperature fermentation; how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010. **85** (0): p.861-867.

AGUILERA, L.L., Estudio de Pga26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. Trabajo de grado Doctora. Valencia, España: Universidad de Valencia. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología y Ecología, 2009. 70 p.

ARGÜELLES, J. C., Thermotolerance and trehalose accumulation induced by heat shock in yeast cells of *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 1996. **146** (0): p. 65-71.

BAI, F. W. y Zhao, X. Q., Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *J Biotechnol*, 2009. **144** (0): p. 23-30.

BALAKUMAR, S., Arasaratnam, V. y Balasubramaniam, K., Isolation and improvement of a thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *World J Microb Biot*, 2001. **17** (0): p. 739-746.

BALAT, M., Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ Convers Manage*, 2010. **52** (0): p. 858-875.

BENJAPHOKEE, S., et al., Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high

temperature, acid and ethanol. *New biotechnology*, 2012. **29** (3): p. 379-386.

FERNÁNDEZ, T., et al., Aislamiento y evaluación de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de aguardientes y ron. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2008. **6** (1): p. 64-70.

HAHN Hägerdal, B., et al., Bioethanol- the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol*, 2006. **24** (12): p. 549-555.

HASUNUMA, T., y Kondo, A., Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochem*, 2012. **47** (0): p. 1287-1294.

HERNÁNDEZ, M. T., Tendencias actuales en la producción de bioetanol. En: Conferencia dictada en la facultad de Ingeniería – TEC Landívar, Universidad Rafael Landívar (Noviembre de 2007): p. 1-17.

JEFFRIES, T. W y Yong-su, J., Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeast. *Adv Appl Microbiol*, 2000. **47** (0): p. 221-268.

LIN, Y., et al., The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. *Biochem Bioph Res Co*, 2009. **387** (0): 778-783.

PRAMANIK, K. y Rajni K., Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. *J Biosci Bioeng*, 2012. **114** (6): p. 622-629.

SHI, D., Wang, C. y Wang, K., Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009. **36** (0): p. 139-147.

SHIMA, J., Nakamura, T. y Watanabe, I., Characterization of a spontaneous flocculation mutant derived from *Candida glabrata*: a useful strain for bioethanol production. J Biosci Bioeng, 2009. **107** (4): 379-382.

SHIMA, J., Nakamura, T. y Watanabe, I., Strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* for bioethanol production. J Biosci Bioeng, 2010. **110** (2): p. 176-179.

WHEALS, A. E., et al., Fuel ethanol after 25 years. Focus, 1999. **17** (0): p. 482-487.

ZALDIVAR, J., Nielsen, J. y Olsson, L., Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **56** (0): p. 17-34.

ANEXO A: Resultados de las pruebas de termotolerancia durante la evolución adaptativa

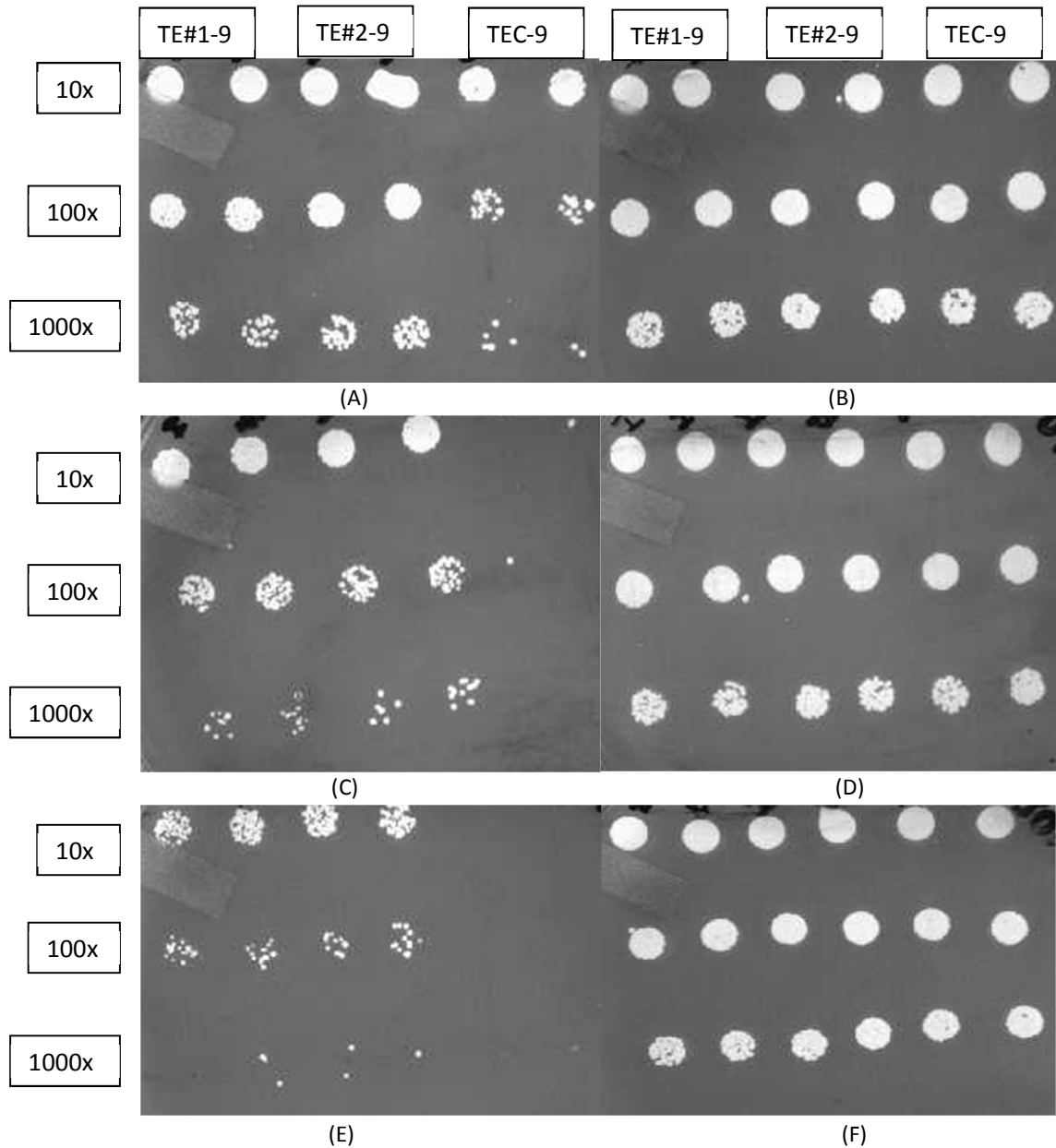


Figura A1. Prueba de termotolerancia para TE#1 y TE#2. Condiciones: 48°C (A); 49°C (C) y 50°C (E). (B), (D) y (F) corresponden a los cultivos de control (sin estrés). Temperatura escogida para el siguiente nivel: 49°C.

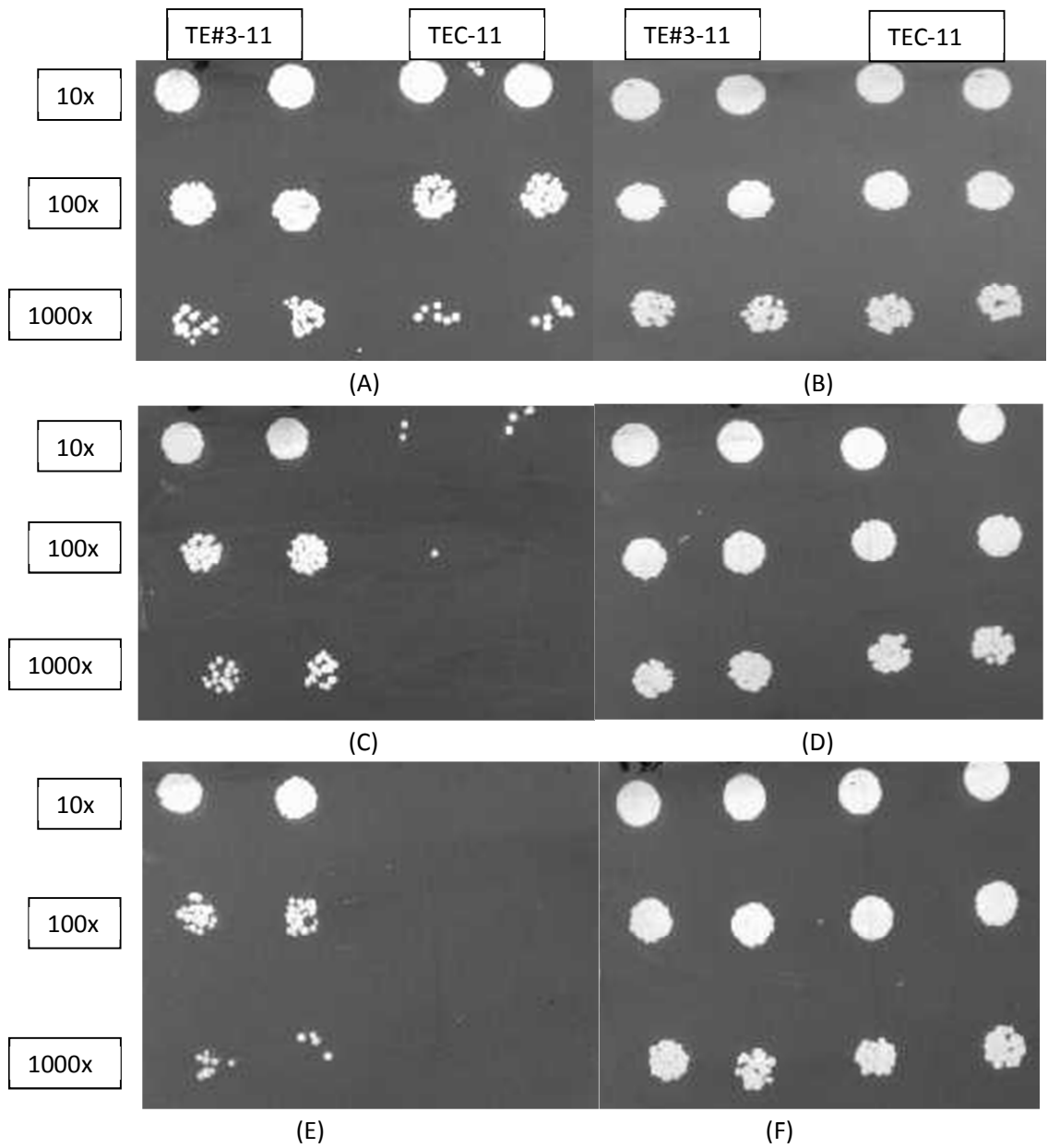


Figura A2 Prueba de termotolerancia para TE#3. Condiciones: 48°C (A); 49°C (C) y 50°C (E). (B), (D) y (F) corresponden a cultivos de control (sin estrés). Temperatura escogida para el siguiente nivel: 50°C

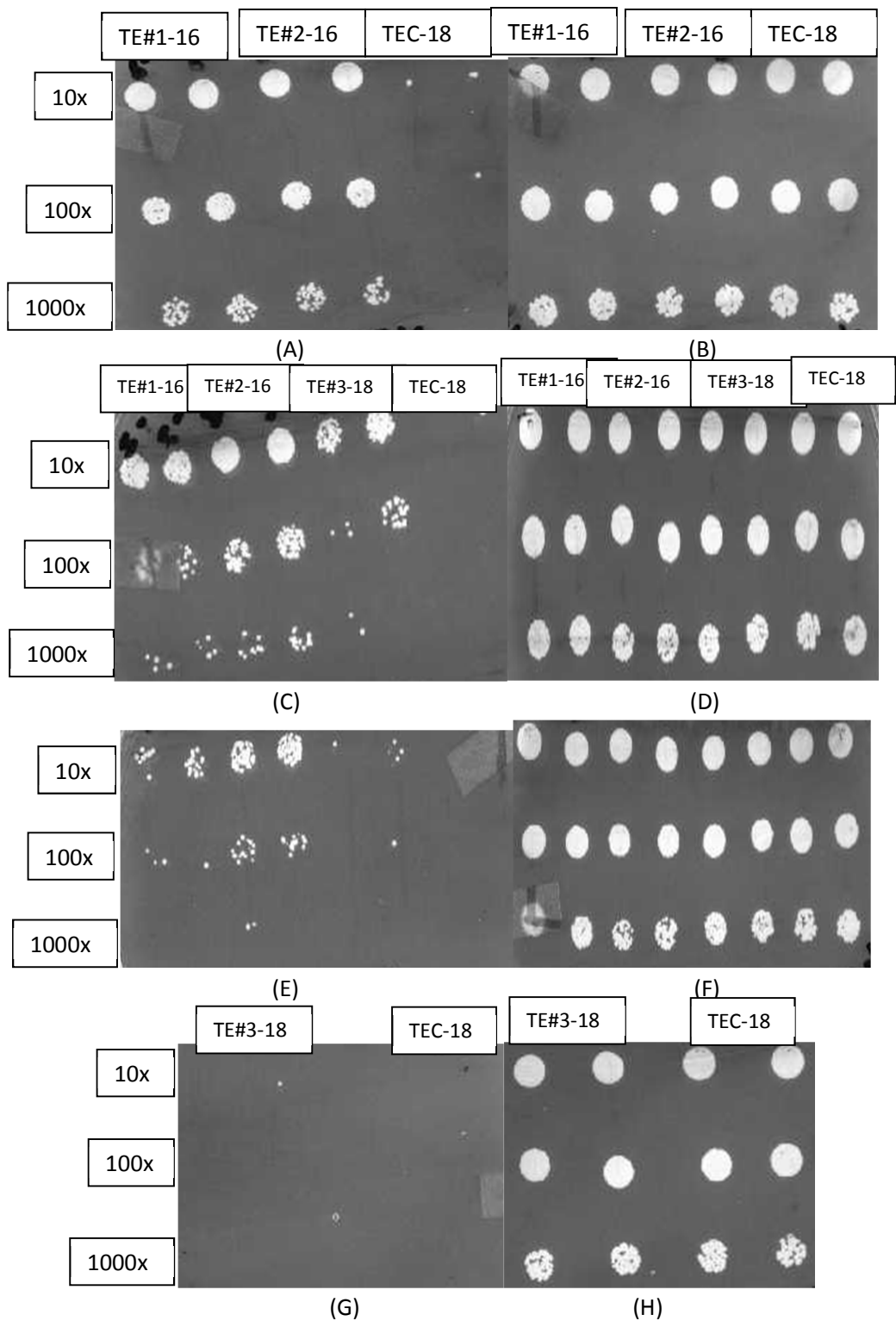


Figura A3. Prueba de termotolerancia. Condiciones: 49°C (A); 50°C (C); 51°C (E) y 52°C (G). (B), (D), (F) y (H) corresponden a cultivos de control (sin estrés). Temperatura escogida para siguiente nivel: 50°C.

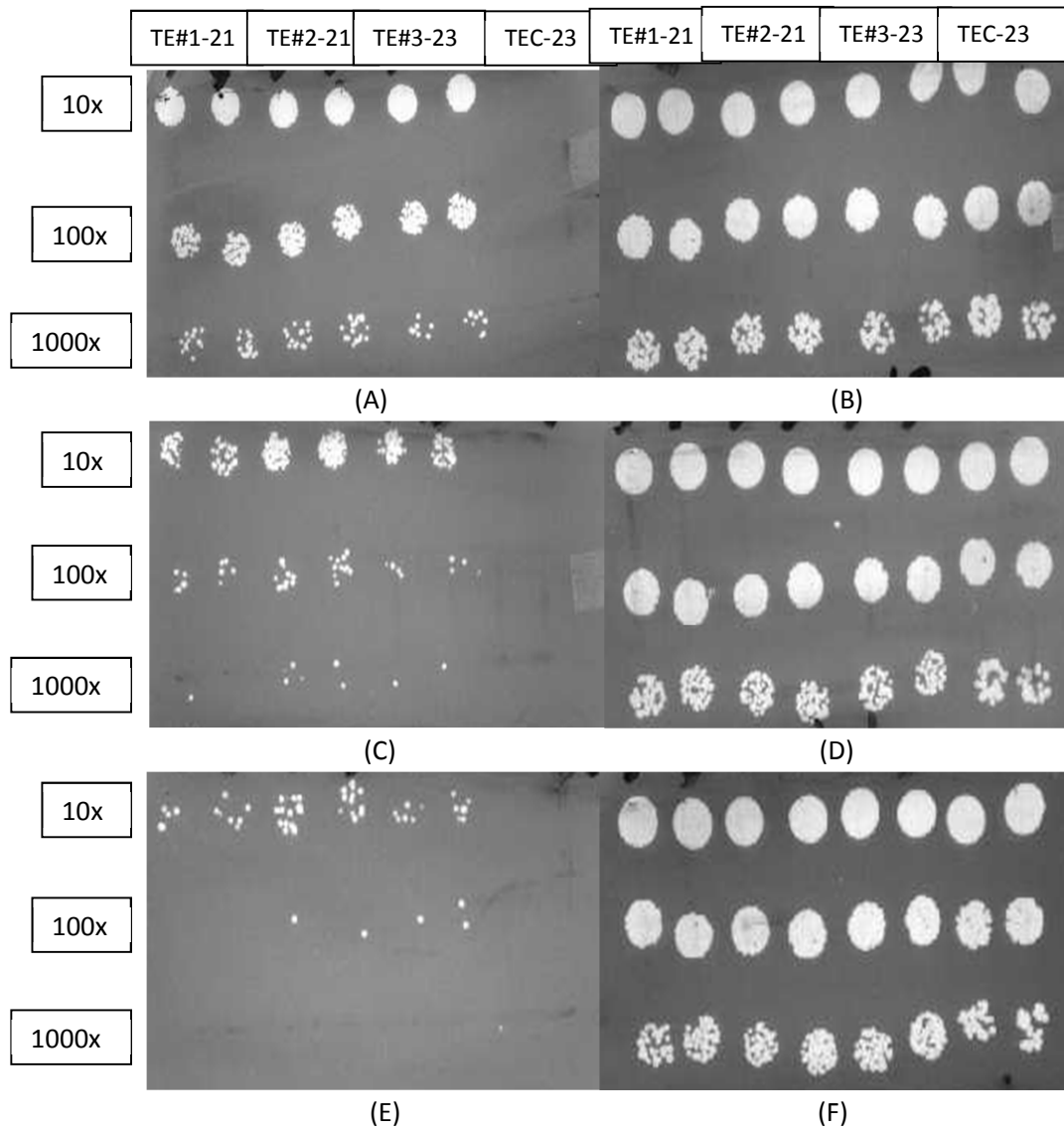


Figura A4. Prueba de termotolerancia. Condiciones: 50°C (A); 51°C (C) y 52°C (E). (B), (D) y (F) corresponden a cultivos de control (sin estrés). Temperatura escogida para el siguiente nivel: 50°C para TE#1 y TE#2. Nota: TE#3 fue terminada con esta prueba.

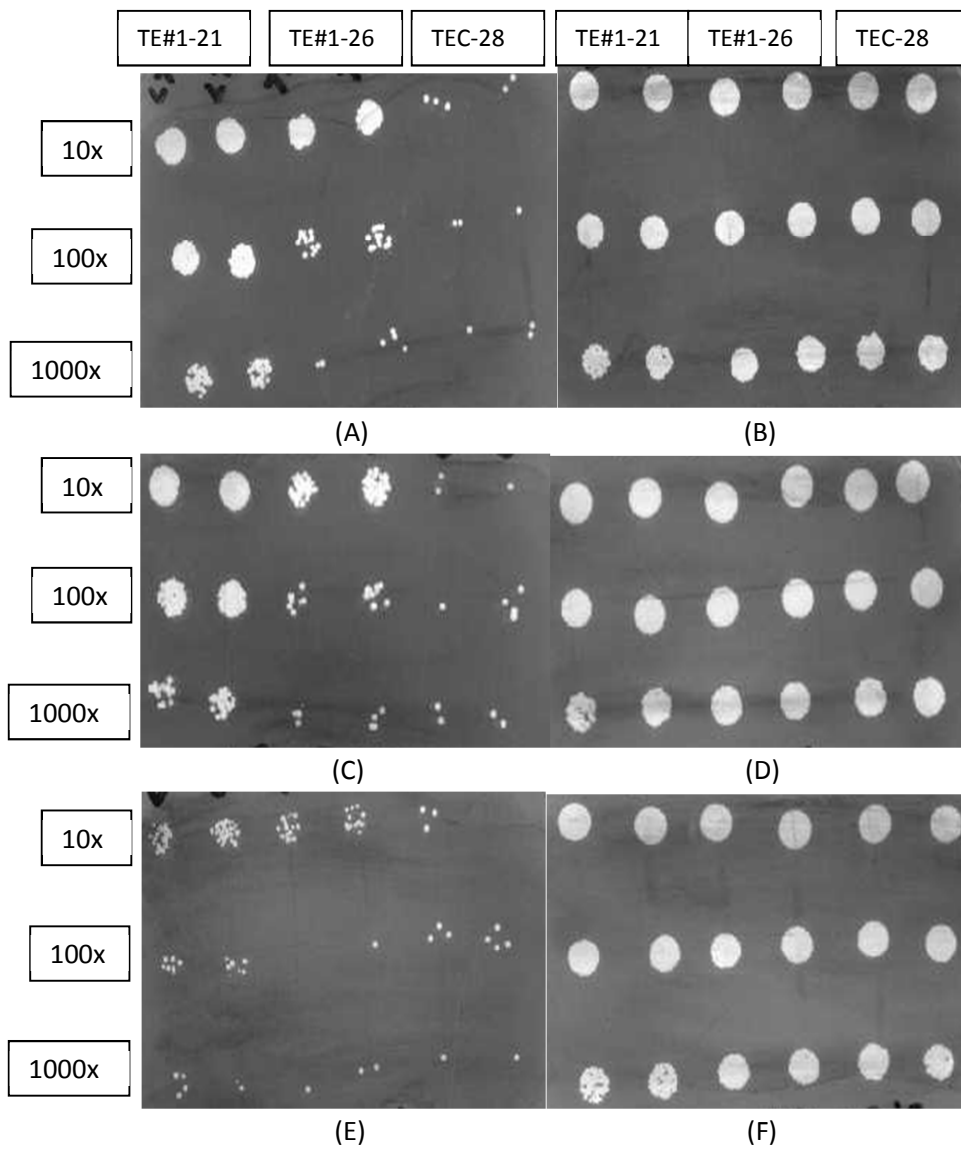


Figura A5. Última prueba de termotolerancia para TE#1. Condiciones: 50°C (A); 51°C (C) y 52°C (E). (B), (D) y (F) corresponden a cultivos de control (sin estrés)

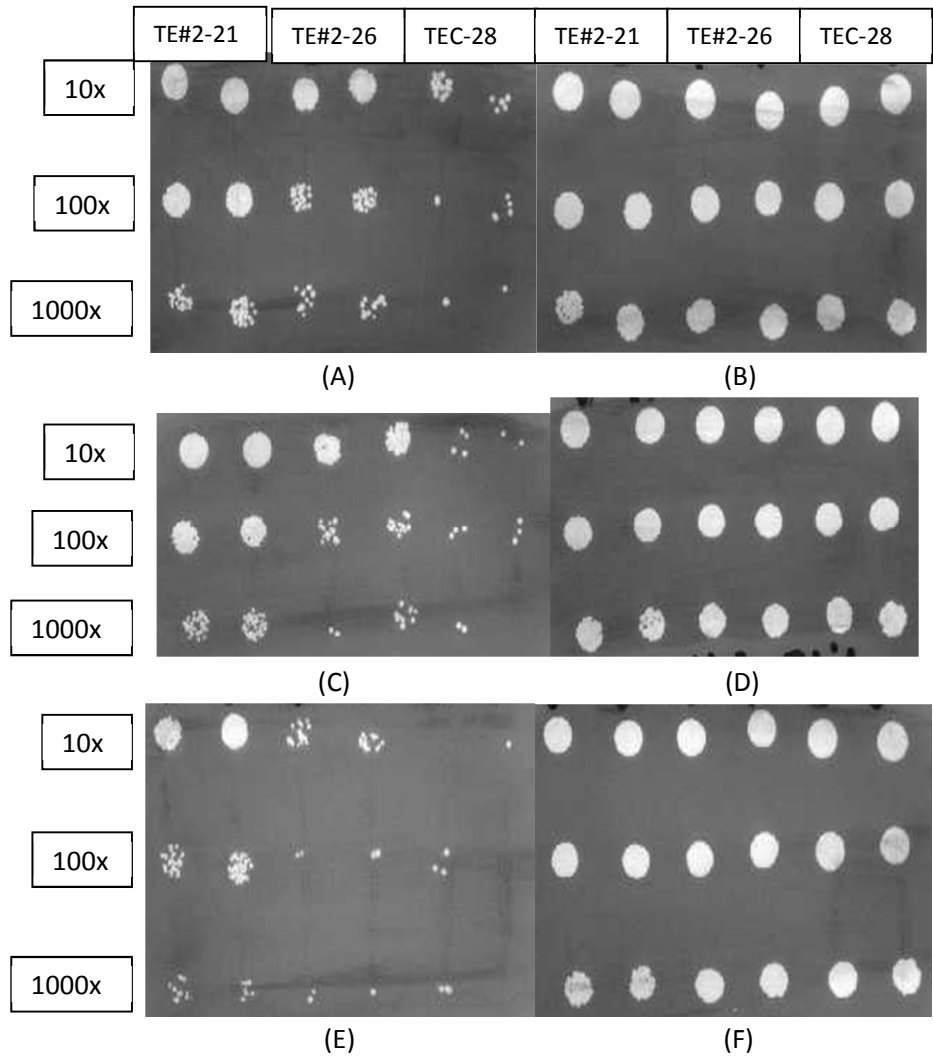


Figura A6. Última prueba de termotolerancia para TE#2. Condiciones: 50°C (A); 51°C (C) y 52°C (E). (B), (D) y (F) corresponden a cultivos de control (sin estrés)

ANEXO B: Curvas de crecimiento exponencial a 30°C

Figura B1. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#1-5.

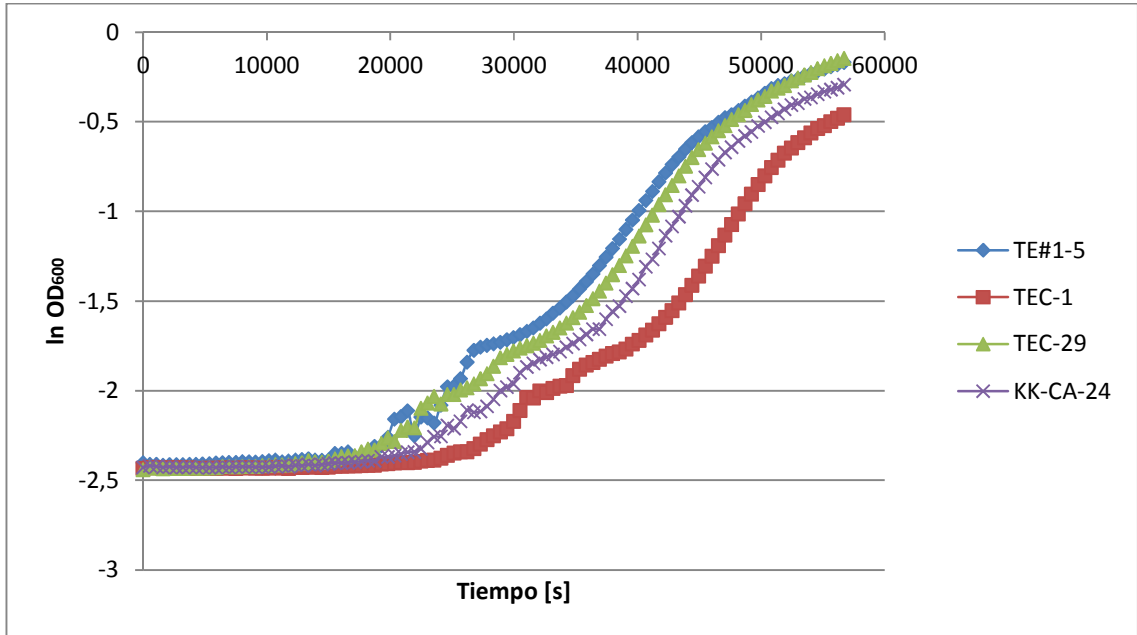


Figura B2. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#2-5.

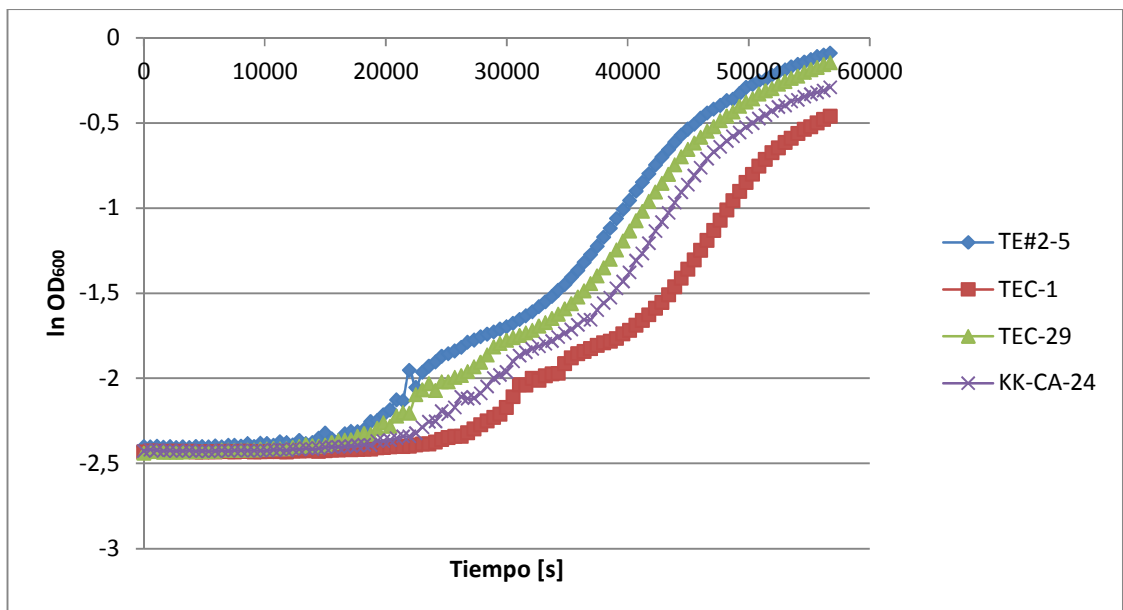


Figura B3. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#3-5.

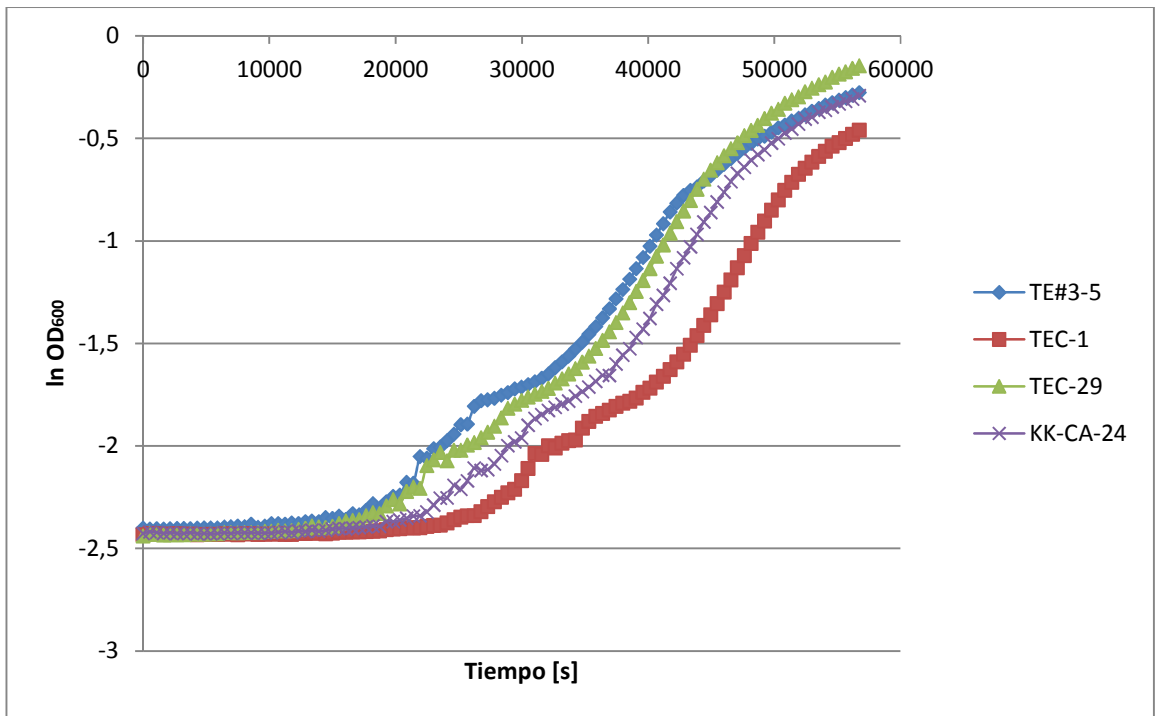


Figura B4. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#1-10.

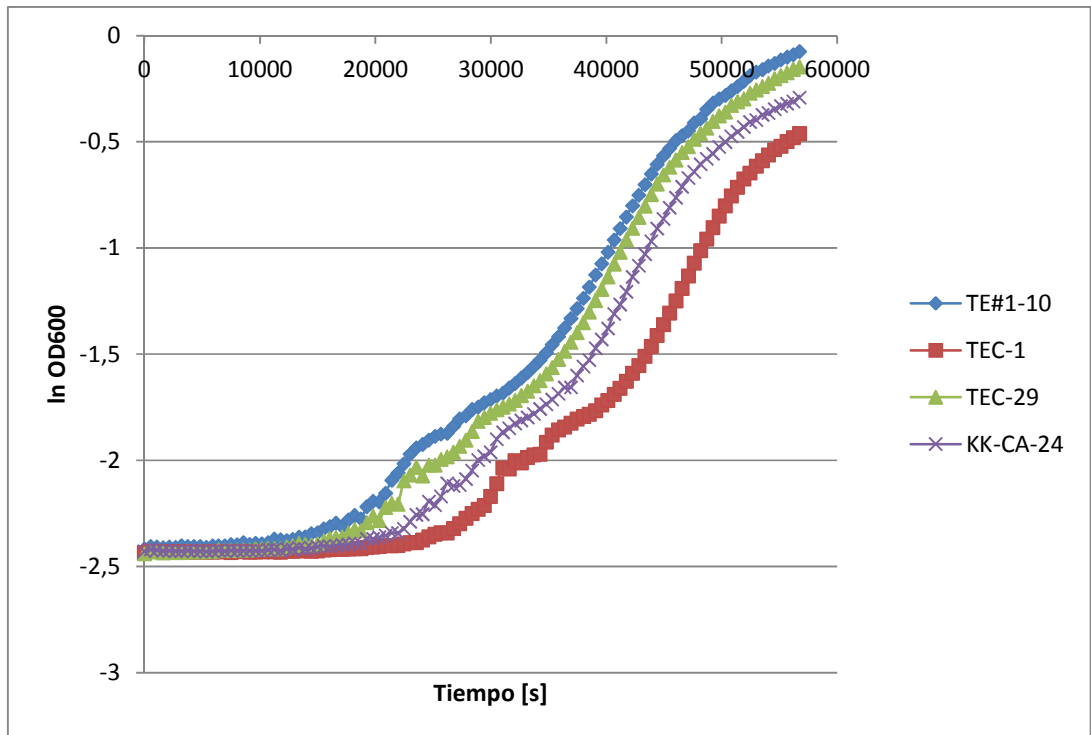


Figura B5. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#2-10.

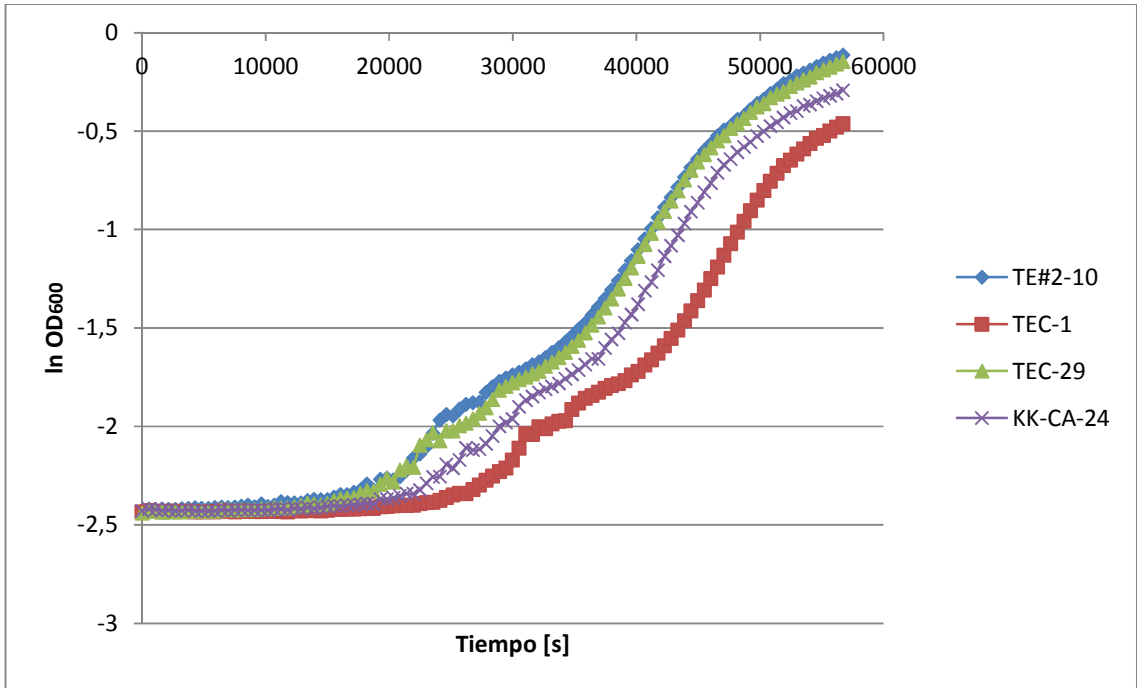


Figura B6. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#3-12.

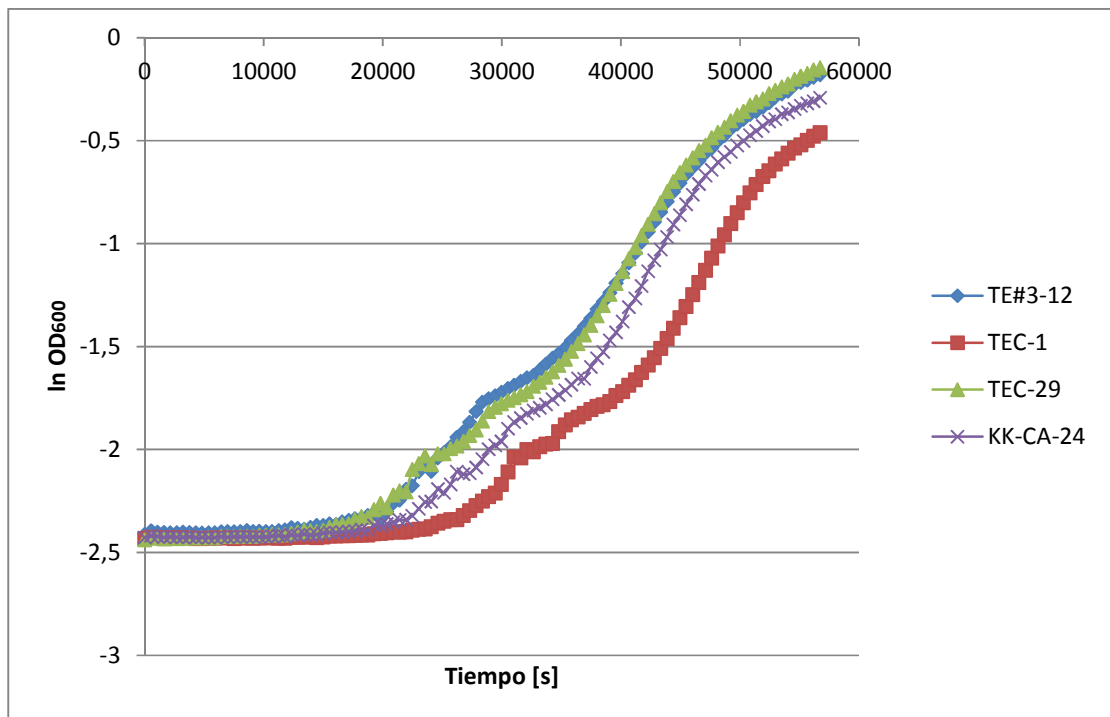


Figura B7. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#1-17.

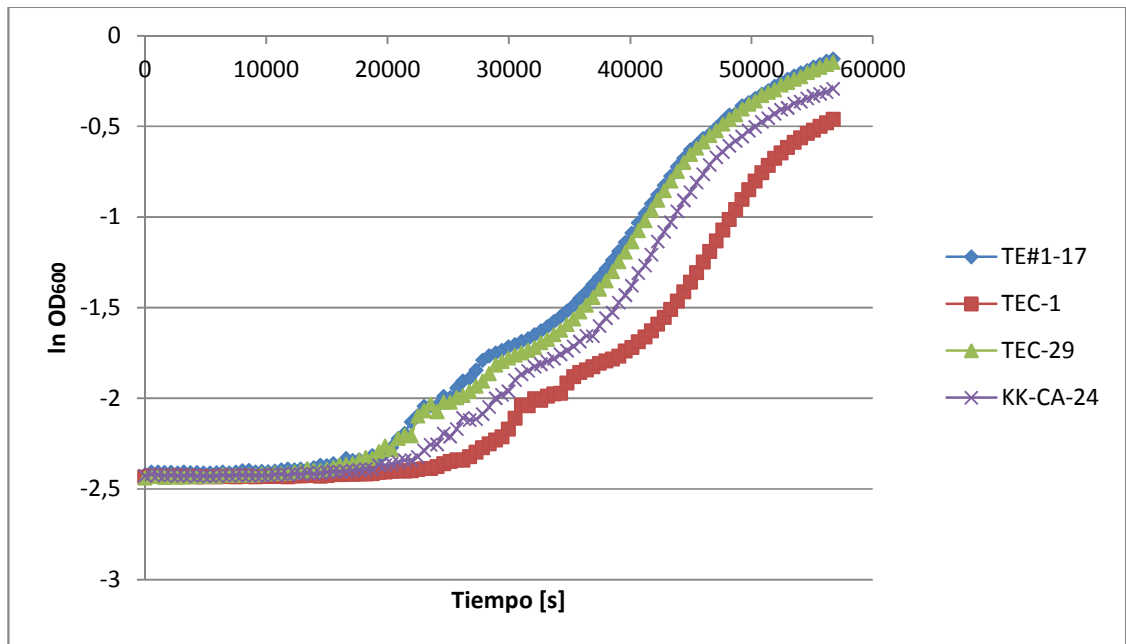


Figura B8. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#2-17.

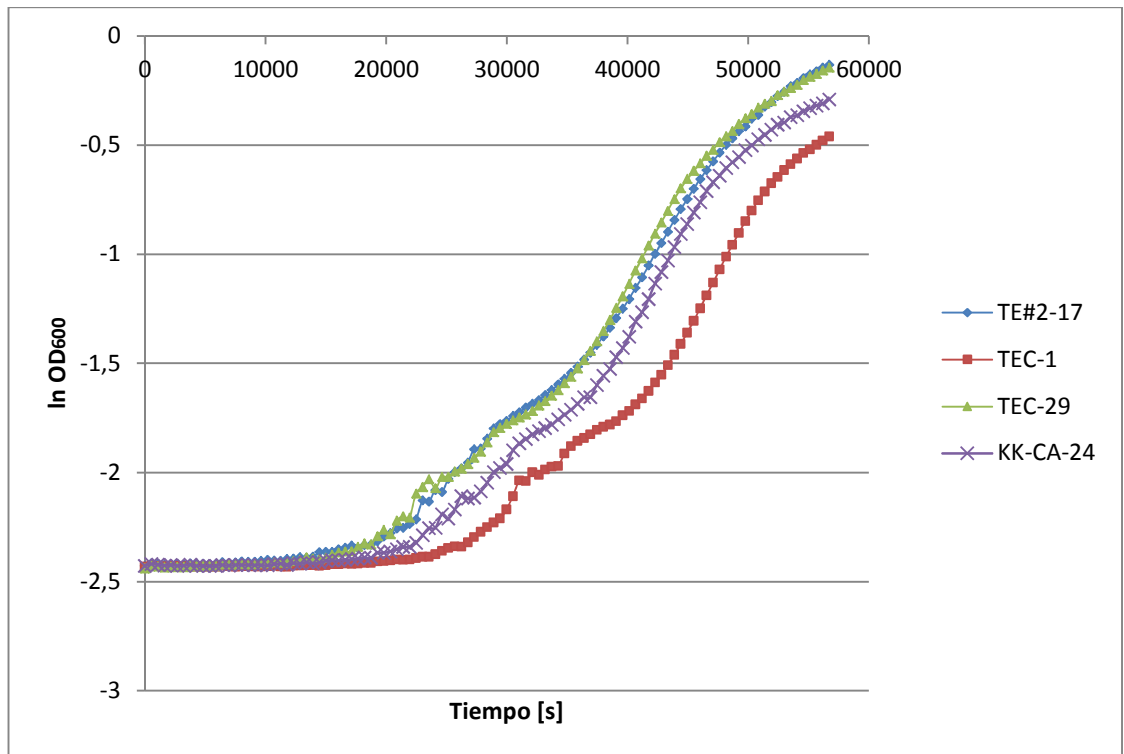


Figura B9. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#3-13.

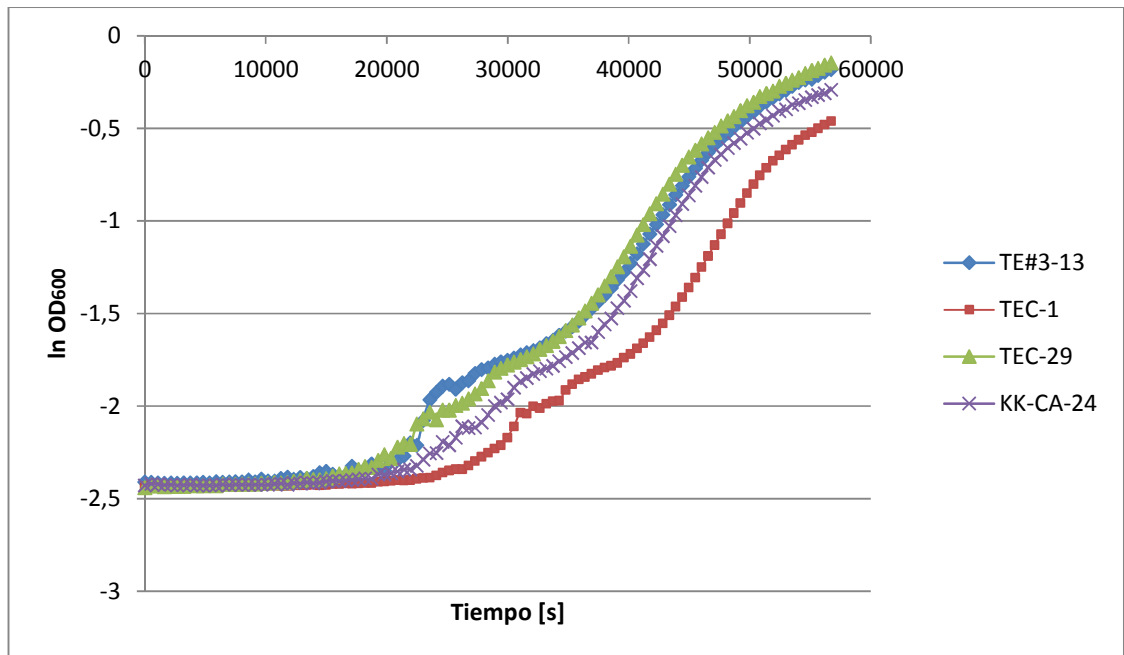


Figura B10. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#2-27.

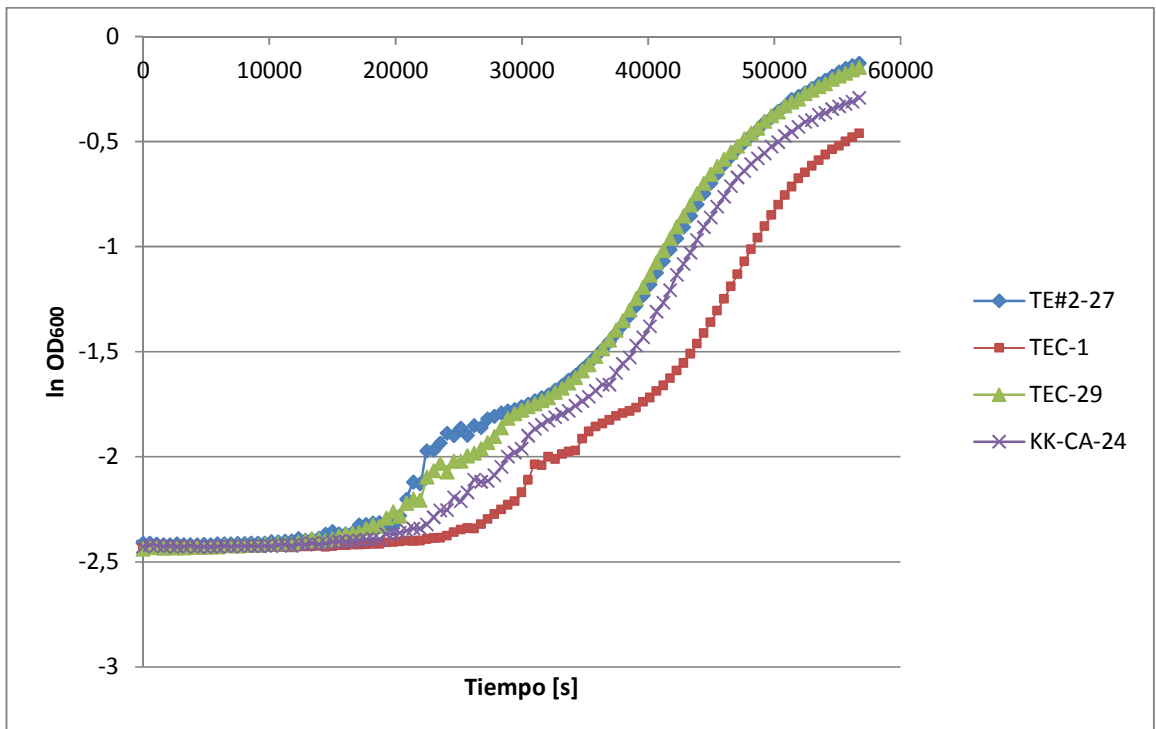


Figura B11. Comparación de las curvas de crecimiento exponencial para la población evolucionada TE#3-24.

