



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE FACTIBILIDAD DE APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS PARA EL
ABATIMIENTO DE ARSÉNICO EN EL PROCESO AAA DE LA EMPRESA
ECOMETALES LIMITED

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO E INGENIERO
CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

JUAN EDUARDO AMADO HINOJOSA

PROFESOR GUÍA:
ÁLVARO OLIVERA NAPPA

PROFESORA COGUÍA:
BARBARA ANDREWS FARROW

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
JUAN ASENJO DE LEUZE
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE

2017

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología
POR: Juan Eduardo Amado Hinojosa
FECHA: octubre 2017
PROFESOR GUÍA: Álvaro Olivera Nappa

**EVALUACIÓN DE FACTIBILIDAD DE APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS PARA
EL ABATIMIENTO ARSÉNICO EN EL PROCESO AAA DE LA EMPRESA
ECOMETALES LIMITED**

En el marco del proyecto FONDEF IT16M10041 “Abatimiento de arsénico en la industria del cobre utilizando métodos biotecnológicos de última generación: genomas y bioinformática”, se desarrolló este trabajo en modalidad *side project*, con el objetivo de evaluar la factibilidad de incorporación de bioprocesos para disminuir la carga arsenical presente en el flujo de PLS ya tratado, dentro del proceso de abatimiento de arsénico y antimonio (AAA) de la empresa EcoMetales Limited.

La primera etapa del trabajo se centró en el diseño e implementación de un microorganismo bioacumulador de arsénico que pudiese ser utilizado como adsorbente en la segunda etapa del trabajo, consistente en el diseño de procesos biotecnológicos y la evaluación de la factibilidad técnica de su incorporación en la planta actual del proceso AAA. Se determinó que abatimiento de arsénico mediante alternativas biotecnológicas debía ser sobre el flujo líquido con concentración de arsénico total cercana a los 2 g/L.

Se diseñaron metodologías de manipulación genética para incorporar genes en una cepa de *Escherichia coli* modificada que permitiese expresión en superficie de una fitoquelatina sintética capaz de quelar AsO_4^{-3} . La manipulación del material genético se realizó satisfactoriamente hasta la recircularización del plasmidio de transformación, etapa que no se concretó e imposibilitó caracterizar la adsorción de AsO_4^{-3} en la superficie celular.

El estudio de operaciones unitarias capaces de incorporar el microorganismo diseñado arrojó que el abatimiento de arsénico podría realizarse en filtros percoladores rellenos con cuarzo recubierto con biomasa, o en estanques agitados con partículas en suspensión, también recubiertas. Se diseñaron ambos procesos y se obtuvo la potencia de consumo de los procesos; se realizó un análisis de sensibilidad de los parámetros termodinámicos de adsorción de arsénico sobre células, y se determinó que el único proceso factible es el abatimiento en filtros percoladores con un 50% de cobertura de la superficie de su relleno. Además, se encontró una relación algebraica que restringe la relación de los valores de los parámetros de la isoterma de adsorción que hacen factible el proceso.

Se concluye que existen dificultades en la manipulación de oligonucleótidos de bajo peso molecular y en la posterior transformación bacteriana. Además, se propone realizar un estudio en detalle de alternativas de separación de biomasa distintas a la centrifugación, el estudio de alternativas de disposición de la biomasa conformada por microorganismos modificados genéticamente, y la evaluación del uso de aguas negras como potencial fuente de nutrientes para cultivos continuos de *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

Terminando finalmente mi proceso de formación profesional, quisiera en estas primeras líneas hacer mención honrosa a quienes han contribuido a forjar al ser humano que firma este trabajo de título.

Primero, y naturalmente, agradezco a mi familia. A cada uno de ellos. Parece obvio, pero no pasa siempre que existe la necesidad genuina de reconocer el tremendo trabajo que, sobre todo los padres, realizan de manera incondicional. Lo he notado haciendo uso de mi visión realista (e insisto, no pesimista) de las cosas, cuando observo y concluyo lo favorable y cálida que es mi realidad en este sentido. Un gran saludo de agradecimiento, y con alegría les declaro que, a pesar de las humanas disfuncionalidades, la misión está cumplida. Simplemente, gracias.

Agradezco a los profesores de mi comisión, por la tremenda formación de la cual me han hecho partícipe. Valoro enormemente su gran voluntad, las oportunidades brindadas, y su experiencia y sabiduría compartida en lo académico y personal.

Agradezco a mi profesor guía. Un verdadero guía en varios sentidos, quien deja ver la verdadera mente sentidora y pensante debajo de todos los rótulos, armaduras, corazas y escudos... algo que parece tan simple pero que a la vez es tan escaso. Seguramente tendré muchos adherentes si afirmo que el mundo necesita más seres así, hechos de luz. Larga vida, Álvaro.

Agradezco a los amigos. Cómo no hacerlo. A Guillermo y Byron por cada momento en el inusual y “diferente” camino de nuestro encuentro; con Camila en el team, ha sido lo mismo, pero aun más potente; por los momentos teñidos de lo bueno y lo malo, lo feo y lo raro, los excesos, las reclusiones, las risas... gracias a los tres. A Javiera, por su admirable estabilidad y estoicismo en la sobriedad, y su madurez fundada en la experiencia y también en la falta de ella; gracias por las conversaciones profundas y gramaticalmente elevadas, el apoyo académico y el soporte emocional. A los amigos de siempre, por constituir el cable al origen y raíces.

Agradezco a José Duguet, por compartir el brillo de su mente, experiencia y sabiduría de manera desinteresada; poco de lo reportado en este documento hubiese sido posible de concebir sin su ayuda y participación. Agradezco también a los investigadores del CeBiB: a Diego y al grupo ‘aceitunasas’, por destrabarme de los obstáculos que la biología molecular ubica egoístamente en el laboratorio.

Agradezco al Centro de Bioingeniería y Biotecnología y a su Unidad de Transferencia Tecnológica, por considerarme dentro del proyecto FONDEF y darme la oportunidad de realizar mi memoria en este tema.

Finalmente, agradezco de manera general a cada persona que ha aportado en mi formación, sobre todo en la de mi criterio y capacidad analítica y comunicativa; estos tres elementos constituyen lo más valioso que a mis ojos poseo. Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1. Introducción y motivación | 1 |
| 2. Antecedentes..... | 3 |
| 2.1. Proceso de abatimiento de arsénico y antimonio..... | 3 |
| 2.1.1. Etapa de oxidación | 3 |
| 2.1.2. Etapa de precipitación | 4 |
| 2.1.3. Etapa de separación sólido-líquido | 4 |
| 2.1.4. Etapa de disposición..... | 5 |
| 2.2. Herramientas biológicas y moleculares exploradas para el abatimiento de arsénico | 5 |
| 2.2.1. Mecanismos de tolerancia de arsénico y determinación de especies arsénico-tolerantes..... | 6 |
| 2.2.2. Mecanismos de biooxidación..... | 7 |
| 2.2.3. Mecanismos de bioacumulación de arsénico y metales..... | 9 |
| 2.3. Fitoquelatinas: expresión, química y potenciales aplicaciones..... | 10 |
| 2.4. Procesos de fijación de arsénico | 14 |
| 3. Objetivos..... | 16 |
| 3.1. Objetivo general | 16 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 16 |
| 4. Metodología..... | 17 |
| 4.1. Estudio de expresión heteróloga de fitoquelatinas..... | 17 |
| 4.1.1. Análisis de las secuencias nucleotídicas para el diseño del sistema de expresión heteróloga..... | 17 |
| 4.1.2. Determinación de las técnicas de biología molecular a utilizar | 23 |
| 4.1.3. Screening | 26 |
| 4.1.4. Medición de bioadsorción y eficiencia del abatimiento de arsénico..... | 27 |
| 4.4.4. Estudio de operaciones unitarias y procesos biotecnológicos potencialmente implementables en el proceso AAA de ECL..... | 28 |
| 5. Resultados y discusión | 29 |
| 5.1. Diseño de los vectores de transformación | 29 |
| 5.2. Construcción de los vectores de transformación..... | 32 |
| 5.3. Transformación bacteriana y screening de Escherichia coli..... | 44 |
| 5.4. Bioproceso industrial para el abatimiento de arsénico | 50 |
| 5.4.1. Fijación de células en matrices sólidas y adsorción de arsénico..... | 50 |
| 5.4.2. Determinación y diseño de procesos para fijación de arsénico..... | 56 |
| 5.4.2.1. Abatimiento en columnas empacadas | 56 |
| 5.4.2.2. Abatimiento en estanque agitado..... | 67 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 5.5.3. | Evaluación y comparación entre los procesos diseñados | 71 |
| 5.5.3.1. | Determinación de parámetros de comparación..... | 71 |
| 5.5.3.2. | Análisis de sensibilidad | 73 |
| 5.5.3.3. | Comparación de procesos y selección de las condiciones de factibilidad 76 | |
| 6. | Conclusiones..... | 78 |
| 7. | Bibliografía..... | 81 |
| 8. | Anexos | 89 |
| 8.1. | Anexo A – Imágenes y gráficos | 89 |
| 8.2. | Anexo B – Mecanismo de reacción de Fenton..... | 100 |
| 8.3. | Anexo C – Secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de TU-Ag43, EGFP y SP-Ag43 101 | |
| | SP-Ag43: 52 residuos aminoacídicos, 156 bases | 101 |
| | EGFP: 239 residuos aminoacídicos, 717 bases..... | 101 |
| | TU-Ag43: 486 residuos aminoacídicos + codón de término, 161 bases | 102 |
| 8.4. | Anexo D – Partidores para la síntesis e inserción de fragmentos PCL en el vector de expresión | 103 |
| | Partidores para la síntesis de PCL1 | 103 |
| | Partidores para la síntesis de PCL2..... | 103 |
| | Partidores para la síntesis de PCL3..... | 104 |
| | Partidores para la síntesis de PCL4..... | 104 |
| | Partidores para la linealización del vector pET22b(+) en la zona de inserción de los fragmentos PCL..... | 104 |
| 8.5. | Anexo E – Partidores para la obtención de los plasmidios p02, p03, p04, p05, p06, p07, p08 y p09 | 105 |
| 8.6. | Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y Gibson Assembly | 106 |
| | Cóctel para PCR recursivo | 106 |
| | Cóctel para etapa de elongación por OE-PCR..... | 106 |
| | Cóctel para etapa de amplificación por OE-PCR | 106 |
| | Mix para digestión de pBS con EcoRV | 106 |
| | Mix para ligación con extremos romos..... | 106 |
| | Cóctel para PCR de colonias | 107 |
| | Cóctel para PCR de linealización de pET22b(+) modificado | 107 |
| | Cóctel para PCR de amplificación de SP-Ag43 desde pET22b(+) modificado | 107 |
| | Cóctel para PCR de amplificación de EGFP-TU desde pET22b(+) modificado..... | 107 |
| | Mix para la doble digestión de pET22b(+) nativo | 108 |

| | |
|---|-----|
| Master Mix al 2X para cinco alícuotas de ligación por Gibson Assembly | 108 |
| Cóctel para PCR de amplificación de productos de Gibson Assembly | 108 |
| 8.7. Anexo G – Protocolo para la preparación de células de Escherichia coli electrocompetentes | 109 |
| Materiales | 109 |
| Procedimiento..... | 109 |
| 8.8. Anexo H – imágenes de screening de transformación | 110 |
| Placas para screening de la primera transformación en E. coli Top 10 (PCL1, PCL2, PCL3 y PCL4) | 110 |
| Placas para screening de la segunda transformación en E. coli Top10 (PCL2 y PCL4)... | 111 |
| Placas para screening de la transformación de E. coli BL21(DE3) con el vector de expresión modificado..... | 112 |
| 8.9. Anexo I – Memorias de cálculo para el proceso de abatimiento de arsénico en filtros percoladores | 113 |
| 8.9.1. Dimensionamiento de filtros percoladores | 113 |
| 8.9.2. Dimensionamiento de la centrífuga de discos para la concentración del caldo del biorreactor | 122 |
| 8.9.3. Dimensionamiento del biorreactor para el acondicionamiento de los filtros percoladores..... | 124 |
| 8.10. Anexo J – Memorias de cálculo del proceso de abatimiento de arsénico en tanques agitados 131 | |
| 8.10.1. Dimensionamiento de estanque agitado | 131 |
| 8.10.2. Dimensionamiento del estanque acondicionador del flujo de sólidos..... | 134 |
| 8.10.3. Dimensionamiento de la centrífuga para la concentración del caldo acondicionador | 136 |
| 8.10.4. Dimensionamiento del biorreactor para el proceso de abatimiento en estanque agitado | 138 |
| 8.10.5. Dimensionamiento del sedimentador tubular | 142 |
| 8.11. Nomenclatura..... | 143 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1: Caracterización del flujo de PLS ya abatido y sus principales especies. | 5 |
| Tabla 2: Detalle de los espaciadores seleccionados para el diseño de los constructos de expresión de PC..... | 29 |
| Tabla 3: Detalle de las PC sintéticas seleccionados para el diseño de los constructos. | 29 |
| Tabla 4: Resumen de PCR exploratorios para la amplificación y purificación del vector backbone pET22b(+). | 37 |
| Tabla 5: Resumen de los resultados de amplificación por PCR de distintos fragmentos introducidos en el plasmidio de expresión. | 48 |
| Tabla 6: Parámetros cinéticos del crecimiento de Escherichia coli recombinante genérica. | 63 |
| Tabla 7: Demanda de potencia de los dos procesos de abatimiento de arsénico diseñados, para las distintas combinaciones de recubrimiento de cuarzo y razón de diámetros..... | 74 |
| Tabla 8: Detalle de los partidores utilizados para la eliminación de marcos de lectura a partir de los plasmidios p10, p11, p12 y p13. | 105 |
| Tabla 9: Biomasa total requerida para cubrir porcentajes del área total interna del filtro. | 117 |
| Tabla 10: Relación entre el porcentaje de cobertura de la superficie de contacto del cuarzo, con la concentración de salida de los filtros percoladores..... | 118 |
| Tabla 11: Relación entre el porcentaje de cobertura del cuarzo y las concentraciones en equilibrio entregadas por la isoterma de Henry. | 119 |
| Tabla 12: Relación entre el porcentaje de cobertura de la superficie de cuarzo y la concentración celular de alimentación para el acondicionamiento de los filtros..... | 121 |
| Tabla 13: Valores reportados para la constante S según la razón entre el diámetro del estanque y del impeller | 133 |
| Tabla 14: Valores del diámetro del impeller, velocidad crítica de agitación y potencia consumida para distintas configuraciones del impeller tipo turbina de 6 paletas planas. | 133 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: procesos de EcoMetales implementados en DCH. Elaboración propia. | 2 |
| Figura 2: diagrama de flujo del proceso AAA. | 4 |
| Figura 3: Diagrama de bombas iónicas existentes en una célula arsénico-tolerante. En rojo: bomba de influjo; verde: bomba de eflujo; violeta: bomba de cotransporte. Las bombas de eflujo son las responsables de mantener las concentraciones intracelulares de arsénico bajo los niveles citotóxicos. Elaboración propia. | 6 |
| Figura 4: Modelo de expresión de enzimas compartimentalizadas. Lisosomas y peroxisomas necesitarían un sistema de bombas de influjo de arsenito para su metabolización. El modelo también supone bombas de eflujo en la membrana plasmática para mantener la viabilidad. Elaboración propia. | 9 |
| Figura 5: Estructura química de una fitoquelatina natural. El residuo de ácido glutámico (izquierda) se une covalentemente mediante el carbono γ y del radical al grupo amino de la cisteína (central), unida mediante su carboxilo al grupo amino de la glicina ubicada fuera de la secuencia oligomérica. Elaboración propia. | 10 |
| Figura 6: Estructura química de una fitoquelatina sintética. Todos los enlaces entre residuos son a través de los carbonos α de sus estructuras. Elaboración propia. | 12 |
| Figura 7: Representación esquemática del plasmidio utilizado (pCM3) para la transformación de <i>C. metallidurans</i> . REP: origen de replicación; pan: promotor <i>mrgA</i> modificado de <i>Bacillus subtilis</i> ; SS: secuencia codificante del péptido señal para transporte a membrana; EC20sp: gen codificante para la PC ₂₀ sintética; E-tag: secuencia codificante del epítipo para marcaje; IgA β : secuencia codificante del dominio β del sistema de secreción proteasa IgA de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ; CM: gen de resistencia al cloranfenicol; hok/sok genes codificantes involucrados en la estabilidad segregacional. | 12 |
| Figura 8: Definición esquemática del análisis de balance de masa de adsorción en carbón. Modificado de Metcalf y Eddy (2003) | 15 |
| Figura 9: Constructo introducido en el plasmidio pET-22b(+) luego de eliminar el péptido para transporte al medio extracelular, pelB. SP-Ag43: péptido señal para transporte a membrana de Ag43 (156pb); EGFP: proteína fluorescente verde mejorada (717pb); TU-Ag43: unidad de translocación de Ag43 (1461 pb). Elaboración propia. | 17 |
| Figura 10: Plasmidio pET-22b(+) modificado (plasmid01), construido por Lagos (2014). En el espacio en blanco se deben introducir las secuencias nucleotídicas relativas a la expresión de fitoquelatinas. Elaboración propia. | 18 |
| Figura 11: Expresión en superficie del sistema Ag43. En rojo se muestra SP-Ag43, y en celeste se representa, para el caso anteriormente descrito, la secuencia de EGFP. Modificado de Microbusters (2015). | 18 |
| Figura 12: Estructura tridimensional de EGFP 2Y0G. A: muestra la distancia aproximada entre un átomo de la base del barril beta y un átomo de la zona superior, siendo cercana | |

| | |
|---|----|
| a 40 Å; B: en esferas se muestran los residuos aminoacídicos pertenecientes al extremo carboxilo (rojo) y amino (azul). Imagen generada en PyMOL. | 19 |
| Figura 13: Concepción de la amplificación para eliminar EGFP de los sistemas plasmid10, plasmid11, plasmid12 y plasmid13. Las flechas representan los partidores: en sentido reverse amplifica un plasmidio hacia el extremo amino desde un spacer (flecha en rojo) y tiene complementariedad con el extremo 5' de la secuencia de TU-Ag43 (segmento morado); en sentido forward amplifica un plasmidio hacia el extremo carboxilo desde Tu-Ag43 (flecha morada) y tiene complementariedad con el extremo 3' de un spacer (segmento rojo). Elaboración propia. | 21 |
| Figura 14: Concepción de la amplificación para eliminar secuencias codificantes de PC de los sistemas plasmid11 y plasmid12. Las flechas representan los partidores: en sentido reverse se amplifica un plasmidio hacia el extremo amino desde SP-Ag43 (flecha negra) y tiene complementariedad con el extremo 5' de la secuencia de un spacer (segmento rojo); en sentido forward se amplifica un plasmidio hacia el extremo carboxilo desde un spacer (flecha roja) y tiene complementariedad con el extremo 3' de SP-Ag43 (segmento negro). Elaboración propia. | 21 |
| Figura 15: Concepción de la amplificación para eliminar la secuencia codificante de EGFP de los sistemas plasmid04 y plasmid05. Las flechas representan los partidores explicados anteriormente en la Figura 13. Elaboración propia..... | 22 |
| Figura 16: Diagrama resumen del diseño secuencial de los plasmidios para obtener los controles necesarios para medir expresión en superficie y bioadsorción. Elaboración propia. | 22 |
| Figura 17: Representación del producto de PCR recursivo. En anaranjado se muestran los partidores forward y reverse (A y B). Las barras verdes ilustran la zona de hibridación de ambos partidores, que como producto de PCR generan el fragmento de doble hebra AB. Elaboración propia..... | 23 |
| Figura 18: Representación del método de amplificación por OE-PCR. En una primera etapa, los fragmentos AB y CD (productos de la PCR recursiva explicada anteriormente) hibridan en la zona de barras verdes y la acción de una DNA polimerasa completa el híbrido de doble hebra en los extremos 3', generando una baja cantidad de copias del fragmento ABCD correspondiente al fragmento PCL. En la segunda etapa, se utilizan los partidores A y B del PCR recursivo anterior para amplificar el híbrido ABCD. Elaboración propia. | 24 |
| Figura 19: Procedimiento completo del ensamble DNA para la obtención de los fragmentos PCL (en anaranjado) con colas para Gibson Assembly, representadas en azul. Se muestra en la figura el primer paso, desde partidores (A, B, C y D) que ya poseen colas para Gibson hibridan entre ellos en el PCR recursivo generando los fragmentos AB y CD, que por OE-PCR logran amplificar los fragmentos completos PCL con colas incluidas | 25 |
| Figura 20: Combinaciones fitoquelatina-spacer que serán probadas en distintos transformantes. Elaboración propia..... | 30 |

| | |
|--|----|
| Figura 21: Variantes del vector p01 que incluyen cada una un fragmento PCL distinto, y su denominación (a la izquierda). Elaboración propia..... | 30 |
| Figura 22: Ubicación de los partidores para la linealización del vector backbone. Elaboración propia. | 31 |
| Figura 23: Electroforesis en gel de agarosa para visualización de los productos de PCR recursivo. En orden según los carriles, las muestras son como se denota a continuación: 1: 50bp ladder; 2: partidor PC1-2 (53b); 3: partidor PCL3-4 (33b); 4: PCL1-12; 5: PCL2-12; 6: PCL2-34; 7: PCL3-12; 8: PCL3-34; 9: PCL4-12; 10: PCL4-34. | 32 |
| Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa para visualización de los productos de OE-PCR. Las muestras en orden según carriles son como sigue: 1: 50bp ladder; 2: PCL2-12; 3: PCL2-34; 4: PCL2; 5: PCL3-12; 6: PCL3-34; 7: PCL3; 8: PCL4-12; 9: PCL4-34; 10: PCL4. | 34 |
| Figura 25: Electroforesis en gel de agarosa para purificación de pBS digerido con EcoRV. El carril izquierdo muestra 1 kb DNA ladder; el carril derecho posee la totalidad de la muestra para purificación. | 35 |
| Figura 26: Amplificación por partes de los fragmentos que van unidos por homología a los fragmentos PCL. En azul se muestran las zonas de homología de los fragmentos a amplificar con el vector backbone para una posterior ligación por Gibson Assembly. Los partidores con texto en rojo fueron diseñados por Lagos (2014) en un trabajo anterior y gentilmente proporcionados por su autor. Elaboración propia. | 38 |
| Figura 27: Electroforesis en gel de agarosa para la purificación de amplicones (60 minutos a 80V). En amarillo se muestra el largo esperado del amplicón comparado con el obtenido, y en blanco se muestran las bandas de peso molecular del ladder. A: gel 2% para purificación del amplicón SP-Ag43. B: gel 1% para purificación del amplicón EGFP-TU. | 39 |
| Figura 28: Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 65 minutos a 80V para la purificación de la doble digestión de pET22b(+) nativo. Carril 1: 1 kb ladder; carril 2: pET22b(+) digerido con NdeI; carril 3: pET22b(+) digerido con NdeI y MscI (doble digestión); carril 4: pET22b(+) digerido con MscI; carril 5: pET22b(+) sin digerir. | 40 |
| Figura 29: Diagrama que ilustra los procedimientos de Gibson Assembly sucesivos. EL primero (GA1) une la secuencia del péptido señal con la de PCL; el segundo (GA2) une GA1 con el fragmento EGFP-TU-Ag43; el tercero une GA2 con el vector backbone. Es necesario hacer notar que PCL tiene homología para unirse por Gibson Assembly con SP-Ag43 y con EGFP; además, SP-Ag43 y TU-Ag43 tienen homología con el vector backbone para ser incorporados en un plasmidio y recircularizarlo. Elaboración propia. | 41 |
| Figura 30: Electroforesis en gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 85 V. En A las muestras son como sigue: 1: 50bp ladder; 2: PCL1-SPAg43; 3: PCL2-SPAg43. En B, las muestras son como sigue: 1: PCL3-SPAg43; 3: PCL4-SPAg43. | 42 |

| | |
|---|----|
| Figura 31: Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 45 minutos a 85V. Carril 1: 1kb ladder; 2: TU-EGFP-PCL1-SPAg43; 3: TU-EGFP-PCL3-SPAg43; 4: TU-EGFP-PCL4-SPAg43. | 43 |
| Figura 32: Electroforesis en gel de agarosa para visualización del producto de la PCR de colonias. Los carriles 1' y 1'' contienen 50bp DNA ladder. Los demás carriles contienen las muestras según como se menciona a continuación: 2: PCL1-A1; 3: PCL1-B1; 4: PCL1-B2; 5: PCL1-C1; 6: PCL1-C2; 7: PCL1-C3; 8: PCL2-D1; 9: PCL2-D2; 10: PCL2-E1; 11: PCL2-F1; 12: PCL2-F2; 13: PCL2-F3; 14: PCL3-G1; 15: PCL3-G2; 16: PCL3-G3; 17: PCL3-H1; 18: PCL3-H2; 19: PCL3-H3; 20: PCL3-I1; 21: PCL3-I2; 22: PCL3-J1; 23: PCL3-K1; 24: PCL4-L1; 25: PCL4-L2; 26: PCL4-M1; 27: PCL4-M2; 28: PCL4-M3..... | 45 |
| Figura 33: Electroforesis en gel de agarosa para la visualización del PCR de colonias PCL2 y PCL4. En los carriles, las muestras son como sigue: 1: 50 bp ladder; 2: Colonia 2.1 (PCL2); 3: Colonia 2.2 (PCL2); 4: Colonia 2.3 (PCL2); 5: Colonia 2.4 (PCL2); 6: Colonia 4.1 (PCL4); 7: Colonia 4.2 (PCL4); 8: Colonia 4.3 (PCL4); 9: Colonia 4.4 (PCL4). | 47 |
| Figura 34: Diagrama de los resultados de secuenciación. La zona en color rosado representa una secuencia no determinada. | 49 |
| Figura 35: Variación de la motilidad electroforética (a) y de la hidrofobicidad superficial (b) respecto al tiempo de cultivo (en puntos blancos). Se observa que la movilidad disminuye al principio de la fase estacionaria y luego comienza a aumentar, mientras que la hidrofobicidad aumenta al inicio de la misma etapa y luego disminuye para mantenerse constante..... | 52 |
| Figura 36: Sitios de adsorción macroporo, mesoporo, microporo y submicroporo en un sólido. Adaptado de Metcalf y Eddy | 53 |
| Figura 37: Cinética de captación de Hg^{2+} en perlas de quitosán recubierto con cisteínas. La concentración de adsorbente fue de 0,19 g/L y el pH igual a 4,0..... | 58 |
| Figura 38: Dependencia del flux de alimentación con respecto a las constantes de la ecuación de diseño del filtro percolador. La altura se mantuvo fija igual a 3,5 m. Simulación realizada en MATLAB. | 59 |
| Figura 39: Dependencia de la capacidad de abatimiento de arsénico del filtro con el porcentaje de recubrimiento del relleno con biomasa. Los datos exactos se reportan en la Tabla 10 del Anexo 8.9.1. | 60 |
| Figura 40: Variación de la potencia consumida por agitación como función de la razón entre el diámetro de impeller y del estanque, para distintos valores de VVM. Los cálculos son válidos para impellers de tipo turbina de aletas planas. | 65 |
| Figura 41: Variación de la potencia necesaria para la agitación según el diámetro calculado del impeller para valores tabulados de la razón D_E/D_i y de N_P | 68 |
| Figura 42: Simulación de los resultados de funcionamiento del estanque de adsorción considerando distintos grados de recubrimiento de las partículas con biomasa. | 69 |

| | |
|--|----|
| Figura 43: Potencia consumida como función de la razón entre el diámetro del impeller y el diámetro del estanque. Se muestran curvas para los valores de VVM iguales a 0,2, 0,5 y 0,7 m ³ /m ³ -min. | 71 |
| Figura 44: Distribución de la demanda de potencia de cada equipo, según el proceso diseñado en el cual están insertos. | 72 |
| Figura 45: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en filtros percoladores, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 50% y una razón D _i /D igual a 0,45. | 75 |
| Figura 46: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en estanques agitados, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D _i /D igual a 0,3. | 75 |
| Figura 47: Simulación del proceso de abatimiento en filtros con 50% de recubrimiento y razón de diámetros del reactor de 0,45. A: superficie de potencias, la barra de colores indica magnitud (MW); B: curva de nivel de 5,76 MW, la zona achurada contiene los pares (K _F ,m) que generan potencias de consumo inferiores a 5,76 MW. | 77 |
| Figura 48: Imagen del proceso de lixiviación ácida de los polvos de fundición | 89 |
| Figura 49: Imagen de los puntos de intervención biotecnológica propuestos por la empresa. Se ilustra abajo la variación de pH desde el inicio al final del proceso El punto 1 que se propone está en el proceso de lixiviación ácida de los polvos de fundición (no referenciado). El punto 4 corresponde al cual se pretende estudiar e intervenir en este trabajo (imagen modificada). | 89 |
| Figura 50: Fotografía del gel de electroforesis (agarosa 2% por 45 minutos a 80 V) para visualización del estado de integridad de los partidores. Carril 1 y 16: 1kb y 50bp ladder, respectivamente. Los carriles 5 superior e inferior contienen la muestra correspondiente a los stocks del partidor EGFP-F 5 μM y 100 μM, respectivamente. Se observa que se encuentran degradados casi en su totalidad. | 90 |
| Figura 51: Diagrama de Pourbaix para el sistema SiC/SiO ₂ (10 ⁻⁶ M para especies solubles). Las líneas discontinuas verticales muestran la predominancia de dióxido de carbono /carbonatos y la de dióxido de silicio/silicatos | 91 |
| Figura 52: Diagrama de Pourbaix de acero al carbono 1018 en solución acuosa al 5M de monoetanolamina, conteniendo 0,2 mol/mol de CO ₂ y una presión parcial de O ₂ de 0 kPa, a 40°C. La zona gris representa la aleación de hierro con carbono | 92 |
| Figura 53: Diagrama de distribución del ácido arsénico y arsenioso, y sus aniones desprotonados..... | 92 |
| Figura 54: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en filtros percoladores, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 90% y una razón D _i /D igual a 0,45. | 93 |
| Figura 55: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en filtros percoladores, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D _i /D igual a 0,3. | 93 |

| | |
|---|-----|
| Figura 56: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en filtros percoladores, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D_i/D igual a 0,45. | 94 |
| Figura 57: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en filtros percoladores, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D_i/D igual a 0,6. | 94 |
| Figura 58: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en estanques agitados, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 90% y una razón D_i/D igual a 0,45. | 95 |
| Figura 59: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en estanques agitados, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D_i/D igual a 0,45. | 95 |
| Figura 60: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en estanques agitados, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D_i/D igual a 0,6. | 96 |
| Figura 61: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en estanques agitados, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 50% y una razón D_i/D igual a 0,45. | 96 |
| Figura 62: Curva de nivel 5,76 MW obtenida de la superficie de potencias como función de los parámetros de la isoterma de Freunlich, para el proceso de abatimiento de arsénico en filtros que tienen el 50% de su superficie interna recubierta con biomasa producida en un biorreactor cuya razón de diámetros es 0,45. En rojo se observa los datos extraídos directamente de la curva de nivel bajo estudio; en negro se muestra una regresión exponencial cuya ecuación se muestra en el interior del gráfico, con un $R^2=1$ | 97 |
| Figura 63: Diagrama de flujo del proceso propuesto de abatimiento de arsénico en filtros percoladores. | 98 |
| Figura 64: Diagrama de flujo del proceso propuesto de abatimiento de arsénico en estanques agitados. | 99 |
| Figura 65: Fotografía de siembra en placas de células E. coli Top10 transformadas por electroporación con el vector pBS recircularizado luego de ligarle los insertos PCL. Las placas A, B y C corresponden a transformantes con pBS con el inserto PCL1, las placas D, E y F con el inserto PCL2 (no reportadas), placas G, H, I, J y K con el inserto PCL3, y placas L y M con el inserto PCL4 (no reportadas). | 110 |
| Figura 66: Fotografía de siembra en placas (LB agar + ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + X-gal 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + IPTG 0,5 mM) de células E. coli Top10 transformadas por electroporación con el vector pBS recircularizado luego de ligarle los insertos PCL. Las placas A y B contienen controles positivo y negativo, respectivamente. Las placas C, D y E contienen transformantes con el inserto PCL2; Las placas F, G y H contienen transformantes con el inserto PCL4. | 111 |

| | |
|---|-----|
| Figura 67: Fotografía de siembra en placas (LB agar + ampicilina 100 µg/mL) de Escherichia coli BL21(DE3) transformadas por electroporación con el vector p10 (placas A, B y C), p12 (placas D, E y F) y p13 (placas G, H e I)..... | 112 |
| Figura 68: Esfericidad de partículas como función de la porosidad del lecho relleno con partículas uniformes | 113 |
| Figura 69: Simplificación de la geometría de un bacilo. Se le asigna a cada longitud característica el parámetro de altura o largo, según corresponda (elaboración propia). | 116 |
| Figura 70: Balance de masa de ácido arsénico para determinar la biomasa requerida. | 117 |
| Figura 71: Diagrama para el balance de biomasa del filtro percolador. | 120 |
| Figura 72: Diagrama para el balance de masa sobre la centrifuga de discos. | 122 |
| Figura 73: Diagrama para el balance de masa sobre el biorreactor. | 124 |
| Figura 74: Diagrama para el balance de energía sobre el biorreactor. | 127 |
| Figura 75: Diagrama para el balance de masa sobre el estanque de abatimiento de arsénico..... | 131 |
| Figura 76: Diagrama para el balance de masa del estanque acondicionador. | 134 |
| Figura 77: Diagrama para el balance de masa sobre la centrifuga de discos. | 136 |

1. INTRODUCCIÓN Y MOTIVACIÓN

Esta memoria se enmarca en el contexto de un convenio entre el Centro de Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB) y la empresa EcoMetales Limited (ECL), siendo entonces un nexo entre el estudiante de pregrado y la industria.

EcoMetales es una empresa filial del *holding* CODELCO que ofrece soluciones ambientales a la minería y procesos para la recuperación de metales, para contribuir a resolver los problemas que genera la disposición de residuos mineros, aprovechando de recuperar los componentes de valor presentes en dichos residuos [1].

EcoMetales desarrolla procesos industriales a partir de investigación aplicada y genera soluciones innovadoras y ambientalmente sustentables. EcoMetales procesa actualmente residuos provenientes de las Divisiones de Chuquicamata y Ventanas y posee el único tratamiento de residuos mineros a nivel mundial para convertir el arsénico en un residuo estable, la escorodita [1].

Específicamente, el trabajo se centra en el proceso de abatimiento de arsénico y antimonio (AAA) de la planta que procesa corrientes provenientes de la división Chuquicamata (DCH). Este proceso se encuentra secuencialmente ubicado inmediatamente después del proceso de lixiviación ácida de los polvos de fundición (Figura 48, Anexo A – Imágenes) generados en el horno *flash* del proceso pirometalúrgico del concentrado de cobre. En la Figura 1 se muestran las corrientes de entrada y de salida del conjunto de estos dos procesos.

El arsénico trivalente (As(III)) y pentavalente (As(V)) inhibe las funciones energéticas relacionadas con la mitocondria. Los compuestos trivalentes tienen alta afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas y pueden causar la desactivación de enzimas. El arsénico pentavalente compite con el fosfato en las reacciones de la célula, y puede desacoplar la fosforilación oxidativa, impidiendo la conservación de los enlaces altamente energéticos del adenosín trifosfato [2]. Como resultado de lo anterior, el consumo de arsénico causa numerosas enfermedades de la piel y efectos carcinógenos sobre el pulmón, vejiga, piel, próstata, hígado y nariz. Además, puede causar muerte prenatal, mortalidad posnatal, enfermedad isquémica del corazón, diabetes mellitus, nefritis, nefrosis, hipertensión, enfisema, bronquitis, obstrucción respiratoria, linfoma, y deficiencia en el desarrollo, entre otros efectos [3]. Todo lo anterior revela la importancia de estabilizar el arsénico para minimizar el contacto con personas y animales.

EcoMetales es la única compañía que ha implementado a nivel industrial un proceso para el abatimiento de arsénico en forma de escorodita bajo condiciones atmosféricas (proceso AAA). Se ha comprobado que esta forma de abatimiento de As es técnica y económicamente factible para materiales con contenido significativo de Cu. Sin embargo, tiene la debilidad de que el peróxido de hidrógeno utilizado en la oxidación de As(III) es un reactivo muy inestable y de alto costo [4].

Debido a la alta tasa de descomposición del peróxido de hidrógeno y a su elevado costo, equivalente aproximadamente al 50% de los costos de insumos de la planta, EcoMetales

ha explorado varias de las alternativas químicas convencionales para suplir este reactivo o complementar esta etapa, pero su implementación no fue posible debido a altos costos, bajos rendimientos, dependencia de insumos críticos, entre otras razones. En consecuencia, aún no se ha logrado encontrar una opción técnica y económicamente viable [4].

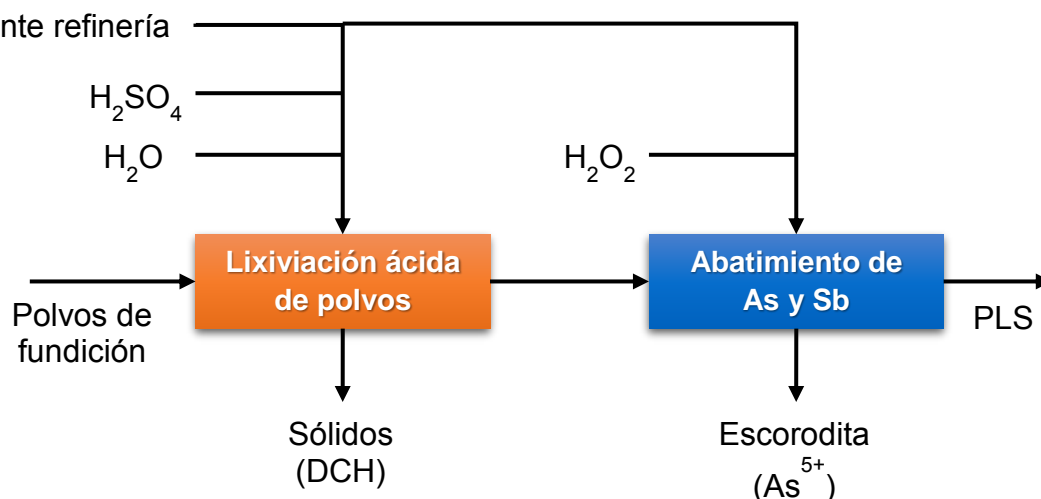


Figura 1: procesos de EcoMetales implementados en DCH (elaboración propia).

ECL se prepara actualmente para enfrentar el futuro aumento tanto del flujo de alimentación de polvos a la planta, como del arsénico contenido en ellos. Es por esto que se ha estudiado que la capacidad futura de la Planta Productiva de ECL presenta “cuellos de botella” en algunas de sus operaciones unitarias. La oxidación con peróxido de hidrógeno, por ejemplo, es una etapa crítica del proceso AAA y de la cual depende la correcta precipitación selectiva del As. Debido a la inestabilidad del peróxido de hidrógeno, la eficiencia de oxidación en esta etapa es muy sensible a la composición de la solución, pH y temperatura, entre otros factores, siendo este además un insumo de alto costo. De acuerdo con información entregada por la empresa, en esta etapa se descompone aproximadamente el 70% del peróxido agregado, lo cual impacta fuertemente en el costo de operación de la planta [4].

Bajo las condiciones actuales, el proceso AAA permite abatir el 85% del As que contienen los polvos, sin embargo, ante fluctuaciones importantes del contenido de As de la alimentación, el costo en peróxido de hidrógeno para oxidar As(III) y cumplir con el estándar de 1 g/L en el efluente, es casi tan alto como la multa que se debe pagar a DCH [4].

Dado lo anterior, y teniendo en cuenta el crecimiento de la extracción de material de las minas y la disminución de la ley de cobre en el mineral extraído de las mismas, EcoMetales Limited recurre al CeBiB para la búsqueda de alternativas biotecnológicas que permitan disminuir los costos de operación del proceso AAA, que a su vez traerían beneficios medioambientales al disminuir la utilización de agentes químicos altamente reactivos; lo anterior permite además que la empresa sea consecuente con sus valores de extensión de una cultura de excelencia, innovación y desarrollo sustentable [5].

2. ANTECEDENTES

2.1. Proceso de abatimiento de arsénico y antimonio

En lo que respecta al tratamiento de flujos altos en metales y/o metaloides, las técnicas convencionales más prometedoras de remediación involucran precipitación química, coagulación convencional, adsorción por carbones activados, adsorción por materiales naturales, intercambio iónico y osmosis reversa. Otras técnicas usadas son contención, extracción, oxidación-reducción, estabilización/solidificación, remediación de acuíferos mejorados con surfactantes, inmovilización, lavado de suelos, decapado de aire, precipitación, vitrificación, desorción térmica, separación por membranas, extracción de vapor sólido, tratamiento electroquímico y oxidación *in situ* [3].

El procedimiento actual que existe para la estabilización de las especies de arsénico presentes en los flujos de la planta de EcoMetales consiste en la oxidación de todas las moléculas e iones de este elemento hasta que alcance su pentavalencia (As^{5+}), para que luego en presencia de ion férrico genere una sal insoluble fácil de separar mecánicamente, que luego es colocada en un depósito. De esta manera se asegura que casi la totalidad del arsénico extraído en el proceso minero sea dispuesta de manera inocua y estable en un lugar destinado para este propósito.

ECL posee la patente relativa al proceso para el abatimiento de arsénico en forma de escorodita bajo condiciones atmosféricas; este proceso está constituido por cuatro etapas principales: oxidación, precipitación, separación sólido-líquido y disposición (Figura 2).

El principal flujo de entrada corresponde a PLS (*pregnant leaching solution*), alto en cobre y otros metales, arsénico, antimonio y con un pH extremo inferior a la unidad. Estas características son los principales factores que complejizan la concepción y el diseño de una intervención de corte biotecnológico en alguna sección del proceso, ya que los organismos capaces de tolerar estas condiciones de cultivo y operación no cuentan con herramientas moleculares ampliamente estudiadas y estandarizadas como las que poseen organismos neutrófilos, mesófilos y heterótrofos, además de que las potenciales modificaciones genéticas que otorgaren características biorremediadoras son difíciles de implementar y tienen bajos rendimientos de transformación mediante las técnicas conocidas de biología molecular e ingeniería genética.

2.1.1. Etapa de oxidación

El objetivo de esta etapa es oxidar todas las especies de arsénico hasta su estado V en forma de arseniato (AsO_4^{3-}), necesario para la estabilización como escorodita. La oxidación del PLS comienza con un estanque de almacenamiento para el mismo, donde se diluye con agua para luego alimentar al reactor de oxidación.

El reactor es simultáneamente alimentado, tanto con PCL como con peróxido de hidrógeno al 50%, y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ producido a partir de magnetita y ácido sulfúrico en un proceso auxiliar dentro de la misma planta. El $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ actúa como catalizador de la

reacción de Fenton de oxidación con peróxidos (Anexo B – Mecanismo de reacción de Fenton), y proporciona el férrico como catión para la formación del cristal de escorodita.

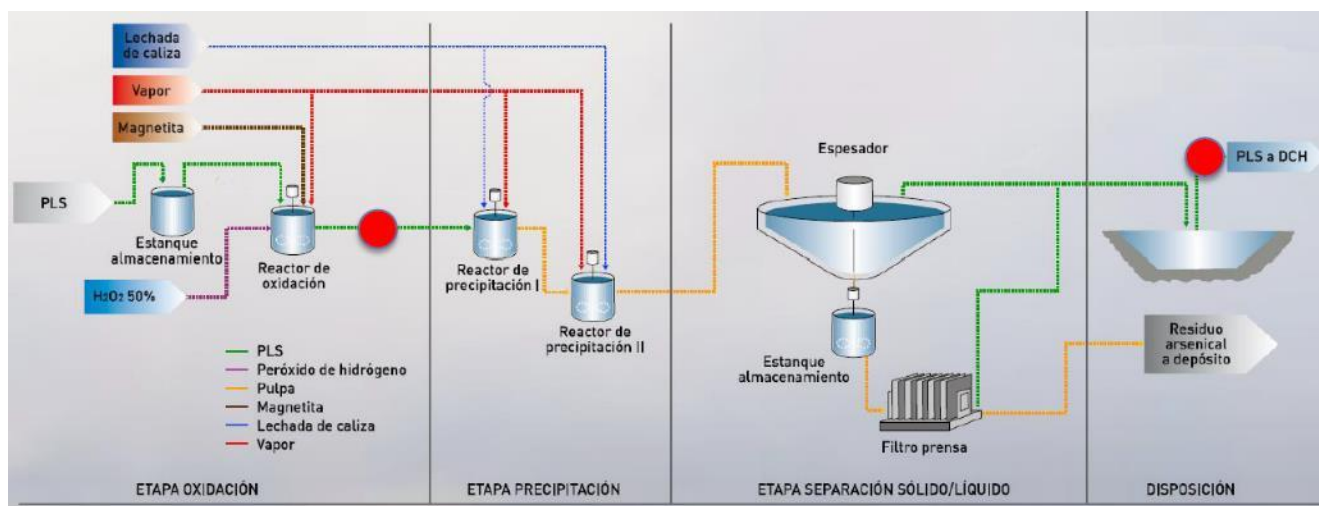


Figura 2: diagrama de flujo del proceso AAA [6].

2.1.2. Etapa de precipitación

Esta etapa está constituida por dos reactores agitados dispuestos en serie para la formación de escorodita bajo condiciones de presión atmosférica. Lo óptimo es agregar caliza y vapor saturado frescos a ambos reactores, debido a que la precipitación aumenta su eficiencia a medida que aumenta la cantidad de etapas.

Para lo anterior se alimenta sulfato férrico a una concentración mayor a 180 g/L de hierro en el primer reactor, y se adiciona pulpa de lechada de caliza (CaCO₃) en ambos reactores para aumentar el pH de la solución desde 0,8 hasta un valor final de 1,5. En esta etapa es de vital importancia mantener la temperatura entre 80-85°C, para lo cual se inyecta vapor saturado a alta presión [4].

El aumento de pH permite mantener la estabilidad del ion férrico (Fe³⁺), haciendo posible que éste forme complejos con los iones arseniato formados en la etapa anterior y con moléculas de agua, generando así la escorodita. Es primordial en esta etapa mantener las condiciones de operación óptimas de los reactores, ya que esto favorece la formación escorodita cristalina, que es estable; de otra manera podría generarse escorodita amorfa, más lábil, y, por lo tanto, potencialmente dañina.

2.1.3. Etapa de separación sólido-líquido

Luego de la precipitación del arsénico como escorodita, la corriente es transportada hacia un espesador. La fracción clarificada y empobrecida en arsénico es transportada como PLS de vuelta a la división Chuquicamata, mientras que el *underflow* es llevado a un filtro prensa; el filtrado de esta etapa se mezcla con el *overflow* del espesador (destinado a DCH), y el sólido en forma de escorodita es transportado en calidad de residuo arsenical estabilizado al depósito.

2.1.4. Etapa de disposición

La scorodita es un residuo no peligroso, de acuerdo con el Reglamento Sanitario sobre Manejo de Residuos Peligrosos (D.S.148), donde el arsénico se cristaliza en una matriz de hierro ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Patente EcoMetales N°50423, 2014) [7].

La scorodita es la forma más estable utilizada hoy a nivel industrial, en el mundo. El proceso fue desarrollado por profesionales chilenos [7].

La scorodita se dispone en un depósito ubicado a 1 km de la planta EcoMetales, el cual tiene una capacidad de 1.370.000 toneladas de este mineral. Cubre una superficie de 25 hectáreas y tiene una vida útil de 15 años (hasta 2027 aproximadamente) [7].

2.2. Herramientas biológicas y moleculares exploradas para el abatimiento de arsénico

Teniendo en consideración las condiciones de operación que deberían tolerar microorganismos involucrados en alguna operación unitaria que pudiere ser integrada al proceso AAA, es evidente la necesidad de buscar especies con características particulares que le permitan proliferar en condiciones de alta fuerza iónica, pH bajo, pobreza nutritiva del medio y altas concentraciones mínimas inhibitorias¹, entre otras.

Con respecto al punto del proceso a intervenir, y dadas las características explicitadas en el párrafo anterior, se propone que tal intervención sea aguas abajo respecto al espesador (Figura 49, Anexo A – Imágenes), particularmente abatiendo el arsénico residual que queda en el flujo de PLS que es reincorporado a DCH.

En la Tabla 1 se muestran los iones principales que componen el PLS en este punto del proceso.

Tabla 1: Caracterización del flujo de PLS ya abatido y sus principales especies [6].

| ESPECIE | UNIDAD DE MEDIDA | VALOR PROMEDIO |
|------------------|------------------|----------------|
| As | g/L | 1,861 |
| As ³⁺ | g/L | 1,132 |
| As ⁵⁺ | g/L | 0,895 |
| Cu | g/L | 17,776 |
| Fe | g/L | 4,820 |
| Fe ²⁺ | g/L | 3,958 |
| Fe ³⁺ | g/L | 15,468 |
| Sb | ppm | 15,162 |
| ORP | mV | 414,246 |

¹ La concentración mínima inhibitoria (MIC) se define como la menor concentración de As(III) o As(V) que inhibe completamente el crecimiento bacteriano en medio con agar después de 72 y 120 horas de incubación en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente. [8]

Las características fisiológicas que permiten la supervivencia de las especies que crecen en condiciones químicas similares a las mostradas en la Tabla 1, son fundamentalmente las asociadas a la tolerancia de metales como cobre, zinc, plomo, plata, cadmio, manganeso y níquel, y de semimetales como arsénico y antimonio: una especie microbiana tolerante de estas condiciones sería capaz de proliferar con una tasa que permita biorremediar el flujo mediante alguna estrategia bioquímica, como por ejemplo, biooxidación del As(III) a As(V) y bioacumulación, ya sea por adsorción a superficie celular o por compartimentalización organelar.

De esta manera, se deduce que una potencial intervención biotecnológica del proceso AAA podría enfocarse en la mejora de los mecanismos moleculares para la tolerancia, la bioacumulación o la oxidación de los metales y metaloides.

2.2.1. Mecanismos de tolerancia de arsénico y determinación de especies arsénico-tolerantes

Liao *et al.* (2010) aseguran que la resistencia arsenical de microorganismos está dada por la presencia de los genes *ArsA* y *ArsB*, ya que son los encargados de formar una bomba transmembrana de eflujo que exporta As(III) del citoplasma, disminuyendo las concentraciones intracelulares de arsénico en su forma tóxica [8]. Es claro entonces que la capacidad de tolerancia de especies arsenicales es dada principalmente por bombas de eflujo en la membrana plasmática; naturalmente, si el arsénico entra a la célula, se presume la existencia de bombas de influjo de especies arsenicales (Figura 3).

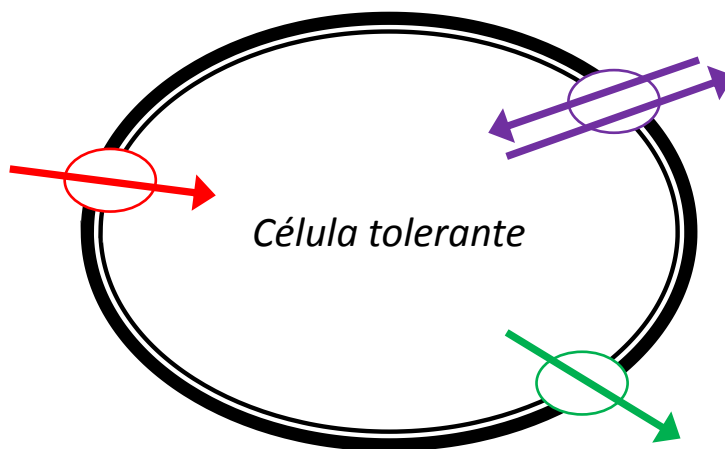


Figura 3: Diagrama de bombas iónicas existentes en una célula arsénico-tolerante. En rojo: bomba de influjo; verde: bomba de eflujo; violeta: bomba de cotransporte. Las bombas de eflujo son las responsables de mantener las concentraciones intracelulares de arsénico bajo los niveles citotóxicos (elaboración propia).

Saltikov *et al.* (2001) demostraron que existe similitud funcional entre el operón *ars* de *Escherichia coli* y genes encontrados en enterobacterias provenientes de arroyos y aguas negras [9]. El operón *ars* codifica para cinco genes: *ArsC* (arseniato reductasa), que reduce arseniato a arsenito; *ArsA*, ATPasa translocadora de iones unida a membrana; *ArsB*, proteína de membrana interna que forma el canal extrusor de iones arsenito; *ArsD*,

inductor independiente del control de proteína; y ArsR, proteína que genera un cambio conformacional que causa que el represor se disocie del promotor del operón, permitiendo la transcripción [9, 10].

El estudio anterior permite reafirmar el rol que cumplen las bombas de eflujo en las especies arsénico-tolerantes. Además, muestra algunos sistemas biológicos como potenciales blancos de transformación para biorremediar el PLS mediante la incorporación de genes de interés para oxidación y/o bioacumulación. Se concluye que estas especies serían *Xanthomonas oryzae*, *Yersinia spp.*, *Serratia spp.*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca* [9]. Sin embargo, la capacidad para realizar modificaciones de estos organismos mediante técnicas de biología molecular e ingeniería genética está fuertemente sujeta a la disponibilidad de herramientas moleculares estandarizadas para la concreción del estudio experimental de este trabajo.

A partir de análisis metagenómicos realizados en aguas con alto contenido de arsénico ubicadas en Taiwán y Chile, se concluye que hay variados géneros bacterianos que proliferan de manera natural en condiciones similares a las dadas por el PLS. Estos géneros son *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Psychrobacter*, *Vibrio*, *Citrobacter* y *Bosea* [8, 11]. La principal desventaja de estos microorganismos es que al ser extremófilos, sus metabolismos no permiten un crecimiento rápido.

Thorsen *et al.* (2009) estudiaron las bases genéticas de tolerancia de arsénico y cadmio en sus formas arsenito (AsO_2^-) e ion cadmio (Cd^{2+}) en *Saccharomyces cerevisiae*. Se determinó mediante estudios transcriptómicos que el estrés celular generado por un ambiente rico en arsénico induce una sobre-expresión de genes en los mutantes estudiados, relacionados con el metabolismo del azufre, regulación de la fase mitótica, biogénesis del citoesqueleto, transporte vesicular y generación de vacuolas y lisosomas [12]. Sin embargo, levaduras parecen no ser realmente relevantes en este estudio debido a sus características neutrófilas y la relativa lentitud de crecimiento respecto a algunas especies procariontes.

2.2.2. Mecanismos de biooxidación

Como se ha mencionado con anterioridad, la especie arsenical estable, no reactiva y precipitable corresponde al arseniato, por lo que se hace necesario convertir todo el arsénico presente en el PLS a arseniato, lo cual sería posible de realizar mediante reacciones enzimáticas.

Muller *et al.* (2002) determinaron la existencia de dos marcos abiertos de lectura (*AoxA* y *AoxB*) organizados en una estructura operónica en β -proteobacterias metal-resistentes. Las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias de DNA de *AoxA* y *AoxB* corresponden a dos proteínas de 174 y 826 aminoácidos, respectivamente. El análisis de estas secuencias mostró que existe una fuerte similitud con secuencias de las dos subunidades de la enzima arsenito oxidasa de *Alcaligenes faecalis*, estructura ya cristalizada con anterioridad. Se demuestra que estos genes codifican para las dos

subunidades de la arsenito oxidasa, y que ambas son imprescindibles para la actividad enzimática [13].

Las arsenito oxidasas entonces constituyen una alternativa directa para la oxidación del arsénico del PLS. Variados estudios muestran la presencia de esta enzima y similares en microorganismos arsénico-tolerantes.

Campos *et al.* (2009) realizaron análisis metagenómicos desde rocas volcánicas del Desierto de Atacama, determinando que dos géneros bacterianos presentes en la muestra expresan activamente arsenito oxidasas: *Burkholderia cepacia* y *Rhizobium sp.* [14]. Además, se determinó la presencia de géneros y especies anteriormente categorizadas como arsénico-tolerantes: *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Pantoea*, entre otras.

En particular, destaca el crecimiento quimioautolitótrofo de las especies arsenito oxidasa positivas, ya que utilizan arsenito como donador de electrones, oxígeno molecular como aceptor de electrones y bicarbonato (HCO_3^-) como fuente de carbono; los cultivos para aislamiento fueron preparados con una concentración de arsenito igual a 500 $\mu\text{g/mL}$, el cual a las 50 horas de cultivo estaba oxidado prácticamente en su totalidad [14].

Campos *et al.* (2010) lograron aislar y caracterizar una nueva especie (*Pseudomonas arsenicoxydans*), también a partir de análisis metagenómico de muestras de sedimento del Valle de Camarones en el Desierto de Atacama. Se logró determinar dentro de su caracterización, que *P. arsenicoxydans* también contiene los genes *Aox*, reforzando la efectividad de esta enzima y entregando antecedentes consecuentes y correlativos entre la tolerancia y oxidación de arsenito [15].

Por otra parte, en este contexto es importante destacar la importancia de la compartimentalización en la actividad enzimática. Blumhoff *et al.* (2013) lograron demostrar que la actividad enzimática de aconitasa se dobla cuando la expresión heteróloga es en la mitocondria, respecto a la expresión citosólica [16]. A partir de esto, se deduce la importancia del correcto *targeting* de arsenito oxidasa en una eventual expresión recombinante de la misma. Una estrategia pertinente sería expresar esta enzima en lisosomas, para no afectar el ambiente bioquímico y electroquímico que rodea la oxidación (Figura 4).

Otra estrategia que podría ser utilizada es la sobreexpresión de genes relacionados con la biogénesis de peroxisomas. Los peroxisomas fueron definidos originalmente como organelos que realizan las reacciones de oxidación, dando paso a la formación de peróxido de hidrógeno. Como el peróxido de hidrógeno es dañino para la célula, los peroxisomas también contienen la enzima catalasa, que descompone el peróxido ya sea convirtiéndolo en agua o usándolo para oxidar otro compuesto orgánico [17]. Así, un aumento en la biosíntesis de peroxisomas podría generar oxidación inespecífica de especies arsenicales hasta su pentavalencia (arseniato), además de una posible sobreproducción de peróxido de hidrógeno (Figura 4), que podría suplir una fracción de la demanda de este compuesto por parte de ECL.

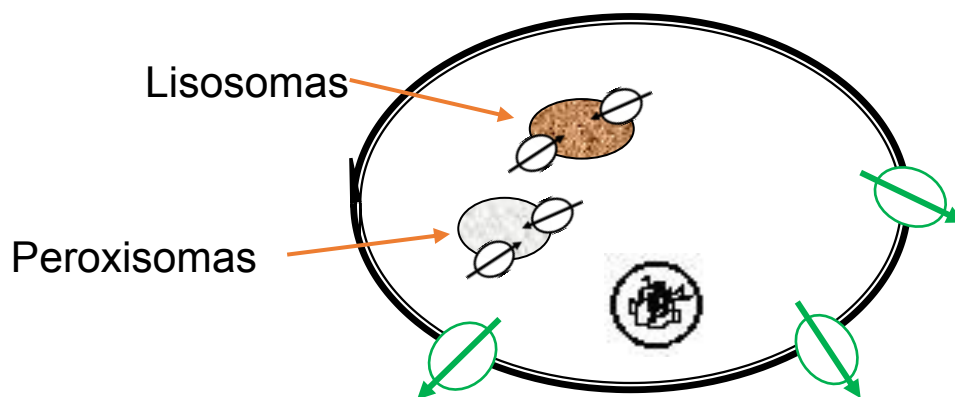


Figura 4: Modelo de expresión de enzimas compartimentalizadas. Lisosomas y peroxisomas necesitarían un sistema de bombas de influjo de arsenito para su metabolización. El modelo también supone bombas de eflujo en la membrana plasmática para mantener la viabilidad (elaboración propia).

2.2.3. Mecanismos de bioacumulación de arsénico y metales

De manera general, los organismos más ampliamente conocidos para la biorremediación de suelos y aguas con alta carga de arsénico pertenecen al reino *Plantae*.

Según Silva *et al.* (2006), el factor de bioacumulación (BF) se define como la razón entre la concentración de una especie en la biomasa vegetal y la concentración de la misma especie en el suelo, y se ha utilizado para determinar la efectividad de las plantas en la remoción de metales (y semimetales) desde el suelo. El factor de translocación (TF) se define como la razón de concentraciones de una especie entre el ápice de una planta y sus raíces, y ha sido utilizado para determinar la efectividad de las plantas en la translocación de metales desde las raíces a sus ápices. Por lo tanto, una planta hiperacumuladora de arsénico debe tener $BF > 1$ y $TF > 1$, y también una acumulación total mayor a 1 g de arsénico por kg de biomasa vegetal [18].

Ma *et al.* (2001) descubrieron que el helecho *Pteris vittata* es extremadamente eficiente en la extracción de arsénico desde el suelo y la translocación en su biomasa, creciendo en tierras con concentraciones de hasta 1500 ppm. Esta planta constituye el primer hiperacumulador de arsénico conocido, así como el primer helecho que funciona como acumulador de especies arsenicales, dado que se reporta en este estudio un BF igual a 126 y un TF de 24 para esta especie [19]. *P. vittata* asimila el arseniato a través del sistema de transporte de fosfato, siendo capaz de acumular en sus ápices hasta 23 g de arsénico por kilogramo de peso seco [20, 21].

Yang *et al.* (2009) lograron determinar que la localización subcelular de arsénico en *P. vittata* es principalmente las vacuolas, que almacenan el arsénico mayoritariamente en sus formas inorgánicas (arsenito), llegando a contener sobre el 90% del arsénico total asimilado por las frondas [22]. Por otra parte, Zhao *et al.* (2003) estudiaron el rol de las fitoquelatinas en la bioacumulación de especies arsenicales en *P. vittata*, determinando que la mayor parte del arsénico se acumuló en los ápices en forma de arsenito, cuya concentración se correlaciona proporcionalmente con la concentración de fitoquelatinas de largo 2 (PC₂), que ven evidentemente inducida su expresión en presencia de arseniato [23].

2.3. Fitoquelatinas: expresión, química y potenciales aplicaciones

Se desprende de la sección anterior la importancia de los péptidos denominados fitoquelatinas en los mecanismos de bioacumulación de aniones de ácidos de arsénico y de otros metales que se encuentran en relativa abundancia en los flujos de PLS de la planta AAA.

De manera particular, la expresión nativa de fitoquelatinas en especies vegetales se atribuye a la acción de enzimas. Grill *et al.* (1989) han confirmado la identificación de una actividad enzimática que sintetiza fitoquelatinas (PC) desde glutatión (GSH). La reacción involucra la transpeptidación de la mitad γ -Glu-Cys del GSH inicialmente con una segunda molécula de GSH para formar PC_(n-2) o, en etapas posteriores, con una molécula de fitoquelatina para producir un oligómero de largo (n+1); esta enzima γ -Glu-Cys dipeptidil transpeptidasa ha sido nombrada PC sintasa. La enzima parcialmente purificada es activa sólo en la presencia de iones metálicos [24].

Ha *et al.* (1999) lograron expresar de manera heteróloga los genes PC sintasa de *Arabidopsis thaliana* y *Schizosaccharomyces pombe* en *Escherichia coli*, confirmando que efectivamente la síntesis de fitoquelatinas se ve directamente activada por iones arseniato [25]. Además, Schmöger *et al.* (2000) determinaron que existe una correlación directa entre la producción de PC (medidas en unidades de grupos -SH) y el aumento de concentración de arseniato en cultivos en suspensión de *Rauvolfia serpentina* [26].

Bioquímicamente, las fitoquelatinas son polipéptidos atípicos sintetizados no ribosomalmente que tienen sólo estructura primaria consistente en secuencias repetidas de γ -glutamil-cisteinil dipéptido y con una glicina en el carboxilo terminal, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (Figura 5). El valor n puede variar entre 2 y 11 (PC₂ a PC₁₁), pero generalmente fluctúa entre 2 y 5 [27].

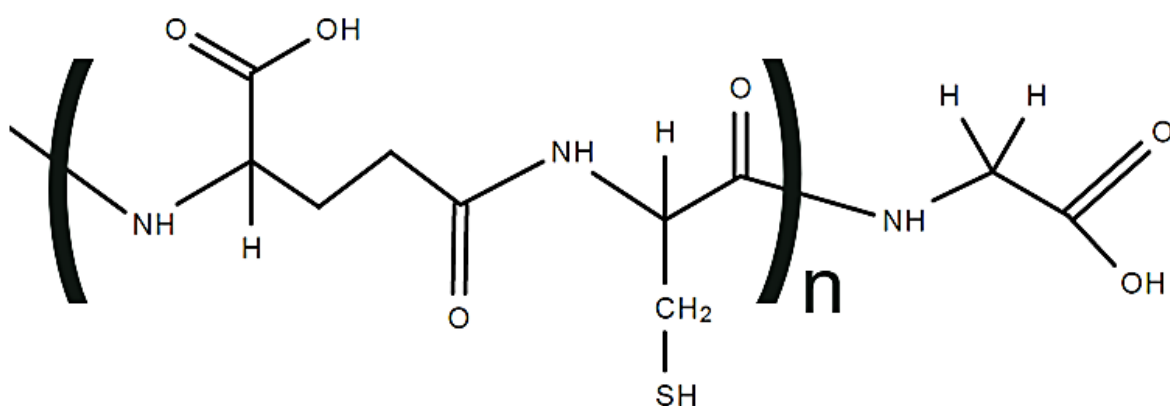


Figura 5: Estructura química de una fitoquelatina natural. El residuo de ácido glutámico (izquierda) se une covalentemente mediante el carbono γ del radical al grupo amino de la cisteína (central), unida mediante su carboxilo al grupo amino de la glicina ubicada fuera de la secuencia oligomérica (elaboración propia).

Spain *et al.* (2003) caracterizaron moléculas sintéticas análogas a fitoquelatinas de distintos largos (n=2-6) mediante espectroscopía HNMR y NMR bidimensional BASHD, en cuanto a la acidez de sus grupos sulfhidrilo y potenciales de óxido-reducción. Se determinó que la disociación protónica de los grupos tiol de los residuos de cisteína aumenta con la posición de éstos en la secuencia y también con el largo de la molécula, siendo los más ácidos los residuos de cisteína unidos a la glicina terminal en los análogos de mayor largo (n=6), alcanzando un valor K_a de 10,02, en contraste con la primera cisteína de los análogos de largo 2, que alcanzan un K_a igual a 9,39 [27].

El potencial de óxido-reducción (E°) para los grupos tiol de análogos PC₂ es de -0,224V para la formación de enlaces disulfuro intramoleculares; este valor es similar al potencial de formación de enlaces del mismo tipo en otros péptidos, aunque en este caso la cantidad de átomos dentro del anillo formado es menor (13 átomos, en contraste con otros péptidos, que albergan entre 20 y 38 átomos en el anillo formado por el puente disulfuro) [27].

La mayor dificultad en el diseño de un sistema de expresión heterólogo para PC sintasa se basa en que la proteína proveniente de *P. vittata*, que es el principal bioacumulador, no se encuentra en los repositorios como secuencia aminoacídica y su estructura no ha sido caracterizada *in silico*, lo cual impide la determinación del paralelo entre los codones de uso frecuente en esta planta y en un microorganismo potencialmente transformable, así como la simulación *in silico* de su actividad enzimática.

Biondo *et al.* (2012) lograron expresar una fitoquelatina de síntesis traduccional (Figura 6) mediante un constructo incorporado en *Cupriavidus metallidurans* CH34. Demostraron la inmovilización de Pb²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺ y Mn²⁺, alcanzando concentraciones cercanas a 550, 500, 400, 170, 80 y 60 nmol/mgdw, respectivamente, mediante la expresión en *surface display* de una PC₂₀. El constructo utilizado considera, entre otros elementos, la existencia de un promotor fuerte inducible, un transportador a membrana, un gen de resistencia para selección y genes para la estabilidad segregacional del plasmidio (Figura 7) [28].

La principal ventaja de esta estrategia de expresión heteróloga consiste en que la síntesis de la PC no depende de la actividad enzimática de una PC sintasa, sino que sólo depende de la inducción dada por metales. Además, permite la inserción directa en la membrana mediante *surface display*, lo cual disminuye las limitantes relacionadas con la transferencia de masa de las especies a quelar a través de la pared y la membrana y dentro del citosol, sino que sólo es necesario que difundan hasta la superficie de la bacteria.

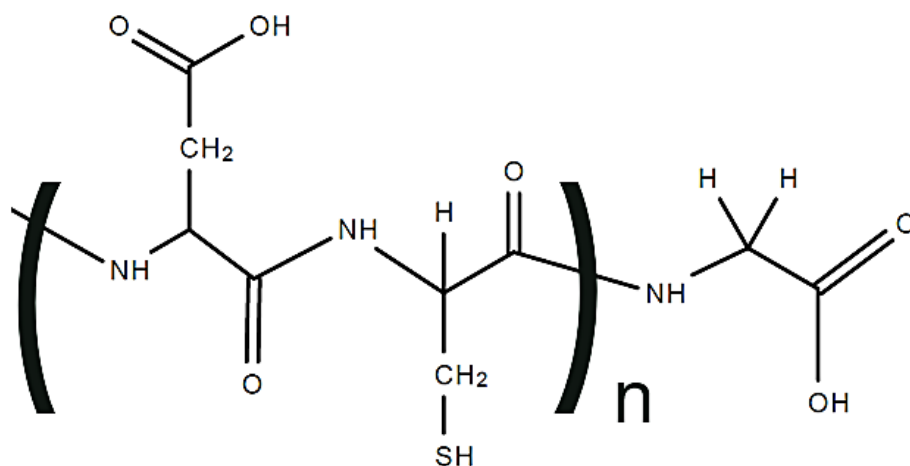


Figura 6: Estructura química de una fitoquelatina sintética. Todos los enlaces entre residuos son a través de los carbonos α de sus estructuras (elaboración propia).

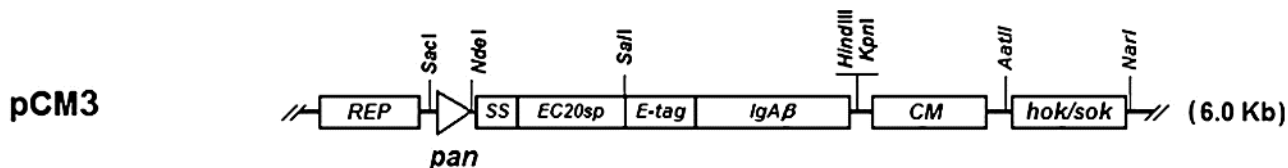


Figura 7: Representación esquemática del plasmidio utilizado (pCM3) para la transformación de *C. metallidurans*. REP: origen de replicación; pan: promotor *mrgA* modificado de *Bacillus subtilis*; SS: secuencia codificante del péptido señal para transporte a membrana; EC20sp: gen codificante para la PC₂₀ sintética; E-tag: secuencia codificante del epítipo para marcaje; IgA β : secuencia codificante del dominio β del sistema de secreción proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoeae*; CM: gen de resistencia al cloranfenicol; *hok/sok* genes codificantes involucrados en la estabilidad segregacional [28].

Considerando de manera global el análisis del estado del arte, y también las líneas de desarrollo establecidas en el proyecto formulado para FONDEF [4], se considera que la concepción, diseño e implementación de un sistema heterólogo para bioacumulación de arsénico, en conjunto con la determinación de las operaciones unitarias biotecnológicas involucradas para su potencial implementación a escala piloto, pueden ajustarse más adecuadamente a los alcances un trabajo de esta naturaleza. Particularmente, y teniendo en cuenta los últimos antecedentes reportados, se propone la concepción, diseño e implementación de un sistema de expresión heteróloga de fitoquelatinas sintéticas en *surface display* para la bioacumulación de especies arsenicales mediante la tecnología *whole cell catalyst*, ya que este método de operación no considera necesariamente la viabilidad de las células involucradas en la operación unitaria que recibiría directamente la corriente de PLS, o bien, diluciones de esta última.

Bajo la misma idea, es posible considerar entonces microorganismos que no necesariamente proliferen de manera satisfactoria en las condiciones expresadas en la Tabla 1, sino que sólo sean capaces de mantener su integridad celular bajo aquéllas, sin que sea estrictamente necesario que se encuentren como células viables. De esta

manera, la gama de alternativas de microorganismos fácilmente transformables se enfoca más hacia los que se han utilizado para ello más ampliamente de manera tradicional, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, entre otros.

Además, Lagos en su trabajo titulado 'Diseño de partidores para ligación de fragmentos mediante la técnica de *Gibson Assembly*' (2014) reporta un diseño en el cual se logra la expresión en modo *surface display* de proteínas mediante un constructo incorporado en el vector pET-22b(+). El constructo se basa en la acción de un autotransportador (AT) denominado antígeno 43 (Ag43) proveniente de una cepa de *Escherichia coli* uropatogénica. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, así como los partidores y la cepa transformada en este trabajo fueron gentilmente proporcionados por su autor.

Ag43 es uno de los AT más estudiados del tipo AIDA-I. Se produce como una preproteína de 1039 residuos aminoacídicos constituida por un péptido señal en el N terminal que dirige la translocación a través de la membrana citoplasmática hacia el periplasma, un dominio pasajero (dominio α ó α 43) y una unidad de translocación (dominio β o TU-Ag43). El procesamiento de Ag43 ocurre entre la unidad funcional α 43 y la unidad de translocación; no obstante, las dos subunidades se mantienen en contacto mediante interacciones no covalentes, con el dominio saliente α 43 a 10 nm de la superficie celular [29].

El método *surface display* utilizando Ag43 se basa en la acción autotransportadora de su péptido señal y el uso de la unidad de translocación de este mismo antígeno. El constructo incorporado en pET-22b(+) consiste en la unión de los genes codificantes para el péptido señal (SP-Ag43), seguido de una proteína fluorescente verde mejorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP, modificada de GFP nativa de *Aequorea victoria*), seguida por la unidad de translocación (TU-Ag43). De esta manera, la proteína fluorescente queda expuesta al medio extracelular gracias a su expresión dentro del mismo marco abierto de lectura que TU-Ag43, la cual queda translocada en la membrana.

En una primera etapa, se realizó la eliminación del autotransportador original del plasmidio pET-22b(+) (*pelB*) utilizando sitios de restricción, y en una segunda instancia se incorporó en el mismo lugar el constructo SP-EGFP-TU utilizando la técnica *Gibson Assembly*; todo lo anterior se encuentra en el *multiple cloning site* (MCS) del plasmidio. El hospedero utilizado para la expresión heteróloga fue *Escherichia coli* K-12.

A partir de lo anterior, se propone el diseño de un sistema de expresión heterólogo utilizando la cepa transformada anteriormente mencionada, que incorpore genes para expresión de fitoquelatinas sintéticas en el mismo hospedero para el cual fue diseñado el plasmidio.

2.4. Procesos de fijación de arsénico

De manera general, se tiene la necesidad de concebir una operación unitaria o un set de operaciones en las cuales se lleve a cabo la generación de la biomasa con actividad arsénico-quelante y también la fijación del arsénico presente en el PLS en la biomasa producida. Considerando esto, es posible realizar un estudio descriptivo de las opciones que podrían utilizarse para determinar cuál de ellas es la más adecuada en términos de la factibilidad técnica de implementación, el grado de mejora respecto a la situación actual, y las ventajas económicas que tal decisión pudiere traer consigo.

Los procesos de biosorción que usan organismos no viables son más aplicables que los que usan organismos vivos que requieren suministro de nutrientes y sistemas complejos de biorreactores para la mantención de una población microbiana saludable, lo cual se vuelve complejo como resultado de la toxicidad de los contaminantes y otras condiciones indeseadas del medio como la temperatura y pH de la solución a tratar [3]. Es por esto que la alternativa más adecuada corresponde a la concepción de un proceso anexo al ya existente en el cual se produzca la biomasa y posteriormente se traten los flujos altos en arsénico con ella.

La investigación relacionada con la biosorción de metales por biosorbentes ha aumentado, y se ha determinado que la biosorción depende no sólo del tipo de composición de la biomasa, sino que también de factores químicos y fisicoquímicos de la solución. La variedad de mecanismos involucrados incluye uno o más mecanismos de intercambio iónico, complejación, coordinación, adsorción, interacción electrostática, quelación y microprecipitación [3].

Para lograr determinar el tipo de operaciones unitarias que sería posible implementar, y el posterior dimensionamiento de los equipos correspondientes, es necesario primero conocer la fenomenología bajo la cual se rigen los procesos de fijación de especies arsenicales en la superficie celular con expresión de PC, y también la fijación de células bacterianas en distintos tipos de sólidos que servirían como soportes, además de barajar las alternativas existentes para la producción de la biomasa a utilizar.

La caracterización de biomasa adsorbente de metales pesados ha sido un tema de amplia investigación durante los últimos años. En particular, se ha estudiado la fijación de metales y metales pesados en la superficie celular mediante la expresión de moléculas quelantes de ellos. Biondo *et al.* (2012) han estudiado la fijación de Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} y Ni^{2+} ; todos los anteriores son cationes metálicos divalentes, lo cual no permite una extrapolación de tal caracterización a la quelación de especies arsenicales (oxoaniones arsenito y arseniato, especialmente arseniato, que es la forma predominante en los flujos de ECL luego de la oxidación con peróxido).

A escala industrial, particularmente en el tratamiento de aguas, se utiliza comúnmente el intercambio iónico para el ablandamiento de aguas a través de la remoción de cationes multivalentes. Este principio ha sido utilizado en aplicaciones de aguas servidas para la remoción de nitrógeno, metales pesados y sólidos disueltos totales [30]. De esta manera,

sería posible concebir una operación unitaria similar a un intercambio iónico para el abatimiento del arsénico remanente del proceso AAA. Para esto, el equipo a diseñar consistiría en una columna rellena con material adsorbente (partículas con células modificadas adheridas), el cual se alimentaría con el flujo de PLS presurizado, siendo el arsénico retenido en el relleno y el flujo de salida ya reabtido.

Otra posible alternativa consistiría simplemente en un estanque agitado dentro del cual las partículas a las cuales se adhieren las bacterias se mantendrían en suspensión hasta que tales células alcancen su saturación luego de un determinado tiempo de residencia. Tal es el caso de la remoción de constituyentes en solución con carbón activado pulverizado (PAC) [30], como se muestra a continuación.

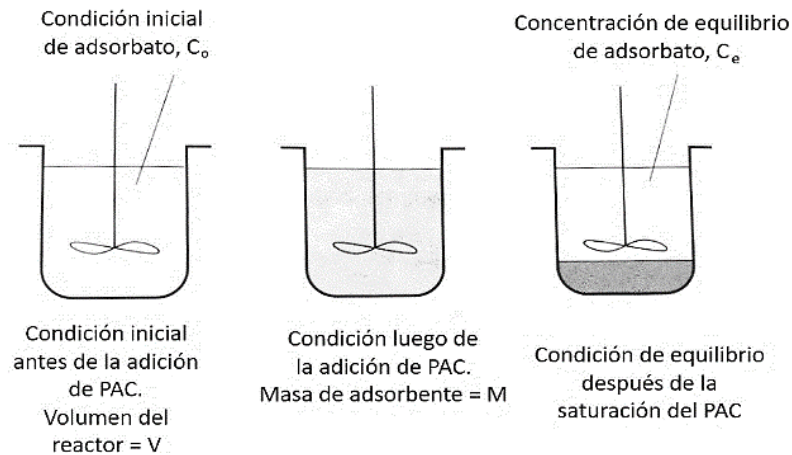


Figura 8: Definición esquemática del análisis de balance de masa de adsorción en carbón. Modificado de Metcalf y Eddy (2003) [30].

La ventaja que tienen ambos equipos es que las partículas con células adheridas que quedarían saturadas con arsénico, pueden ser separadas por principios mecánicos en el caso del estanque como en la Figura 8, o bien, no ser retiradas del equipo como en el caso de las columnas de adsorción similares a las de intercambio iónico; en este caso en particular, la etapa de regeneración del adsorbente es crucial para evaluar la factibilidad de su incorporación en el proceso actualmente existente, ya que determinaría la demanda de generación de biomasa y de fijación de células en partículas sólidas.

Dado lo anterior, se plantea el estudio y evaluación comparativa de ambas alternativas anteriormente propuestas, de manera de analizar sus características y ventajas comparativas, entregando las herramientas suficientes para evaluar ambas propuestas utilizando como *input* los parámetros de operación del proceso, y así determinar la conveniencia del estudio a nivel de ingeniería de detalle de la más ventajosa.

La fijación del arsénico mediante el uso de las tecnologías anteriormente mencionadas se basan en el principio de quelación de los aniones arsenicales a través del grupo sulfhidrilo de las PC [31], lo cual se ha confirmado mediante la resistencia de levaduras a concentraciones de arsénico, debido a que éstas son capaces de transportar los complejos sulfhidril-arsénico en las vacuolas por el transportador *ycf1p* [32]; además, se sugiere que plantas superiores pueden tener un mecanismo similar para la resistencia al arsénico, en particular para el $As(III)$ [33].

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar mediante análisis teórico y estudio experimental la factibilidad técnica de la incorporación de operaciones unitarias biotecnológicas en el proceso de abatimiento de arsénico y antimonio (AAA) de EcoMetales Limited.

3.2. Objetivos específicos

- Implementar, mediante ingeniería genética, un microorganismo recombinante que exprese características de bioacumulación de especies de arsénico mediante la expresión heteróloga en superficie de análogos de fitoquelatina para su uso como alternativa de abatimiento.
- Caracterizar la fisicoquímica de superficie del microorganismo diseñado con el fin de obtener parámetros termodinámicos para diseño de procesos.
- Definir alternativas de operaciones unitarias para el abatimiento de arsénico con el uso del microorganismo recombinante diseñado, dadas la escala del proceso AAA y las propiedades del microorganismo construido.
- Diseñar y comparar los tipos de operaciones unitarias seleccionadas y sus potenciales modificaciones, para establecer las condiciones de su prefactibilidad técnica en la empresa.

4. METODOLOGÍA

La metodología para la realización de este trabajo sigue dos líneas que se desarrollaron de manera simultánea. Una línea se relaciona con la ingeniería de bioprocesos y el análisis teórico de la incorporación de una operación biotecnológica en el proceso AAA con el fin de diseñar la implementación más cercana al óptimo. Una segunda línea se relaciona con el trabajo experimental a través de la aplicación de técnicas de ingeniería genética y biología molecular.

4.1. Estudio de expresión heteróloga de fitoquelatinas

4.1.1. Análisis de las secuencias nucleotídicas para el diseño del sistema de expresión heteróloga

Para comenzar con el diseño del sistema de expresión heteróloga de fitoquelatinas, es necesario considerar la secuencia que modifica el plasmidio pET-22b(+), mediante el protocolo diseñado por Lagos (2014). La secuencia se muestra en la Figura 9. El plasmidio resultante de este trabajo previo se denominará de ahora en adelante, *plasmid01* (p01).

La expresión de esta unidad transcripcional se encuentra regulada por el promotor T7 y por el operador lac original del operón lac [34]. Se conoce que el promotor T7 es de carácter fuerte debido a la alta selectividad y eficiencia para su reconocimiento por la RNA polimerasa [35], mientras que el operador lac permite la inducción de la expresión mediante el uso de IPTG, que suprime la represión sobre este operador [35].



Figura 9: Constructo introducido en el plasmidio pET-22b(+) luego de eliminar el péptido para transporte al medio extracelular, *pelB*. SP-Ag43: péptido señal para transporte a membrana de Ag43 (156pb); EGFP: proteína fluorescente verde mejorada (717pb); TU-Ag43: unidad de translocación de Ag43 (1461 pb). Elaboración propia.

Como el objetivo es que las fitoquelatinas queden expuestas hacia la superficie externa de la membrana citoplasmática, su secuencia debe ubicarse en una zona flanqueada por la secuencia de EGFP y la de SP-Ag43 (Figura 10) dentro del plasmidio, ya que este péptido señal, ubicado en el extremo amino, es procesado antes de que la secuencia aminoacídica completa quede translocada en la zona TU-Ag43 y expuesta hacia el medio extracelular río arriba, como se muestra en la Figura 11 (secuencias de SP-Ag43, EGFP y TU-Ag43 se muestran en el Anexo C – Secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de TU-Ag43, EGFP y SP-Ag43):



Figura 10: Plasmidio pET-22b(+) modificado (*plasmid01*), construido por Lagos (2014). En el espacio en blanco se deben introducir las secuencias nucleotídicas relativas a la expresión de fitoquelatinas. Elaboración propia.

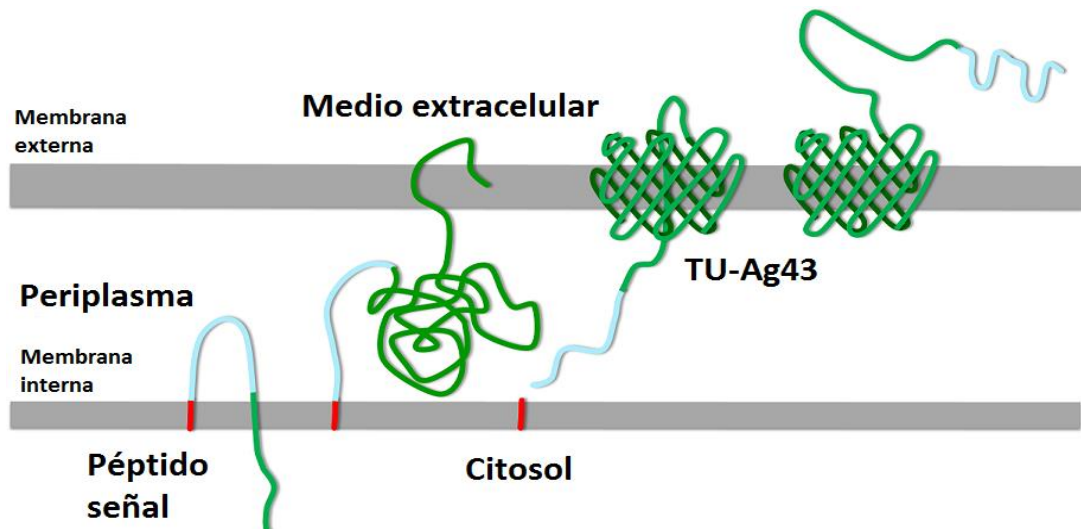


Figura 11: Expresión en superficie del sistema Ag43. En rojo se muestra SP-Ag43, y en celeste se representa, para el caso anteriormente descrito, la secuencia de EGFP. Modificado de Microbusters (2015) [36].

Así, se hace necesario determinar en qué zona de la estructura tridimensional de la proteína EGFP se encuentra el extremo amino, para conocer el grado de exposición al medio extracelular de un péptido de PC ubicado inmediatamente antes de EGFP. Para esto, se realizó un estudio de la estructura tridimensional de una secuencia de EGFP conocida disponible en el repositorio de NCBI [37] mediante la extensión PyMOL para Python en sistema operativo Windows [38]. De este análisis, se determinó el largo aproximado del barril β que genera la proteína y en qué zona de ella se ubican sus extremos amino y carboxilo. Los resultados se muestran en la Figura 12.

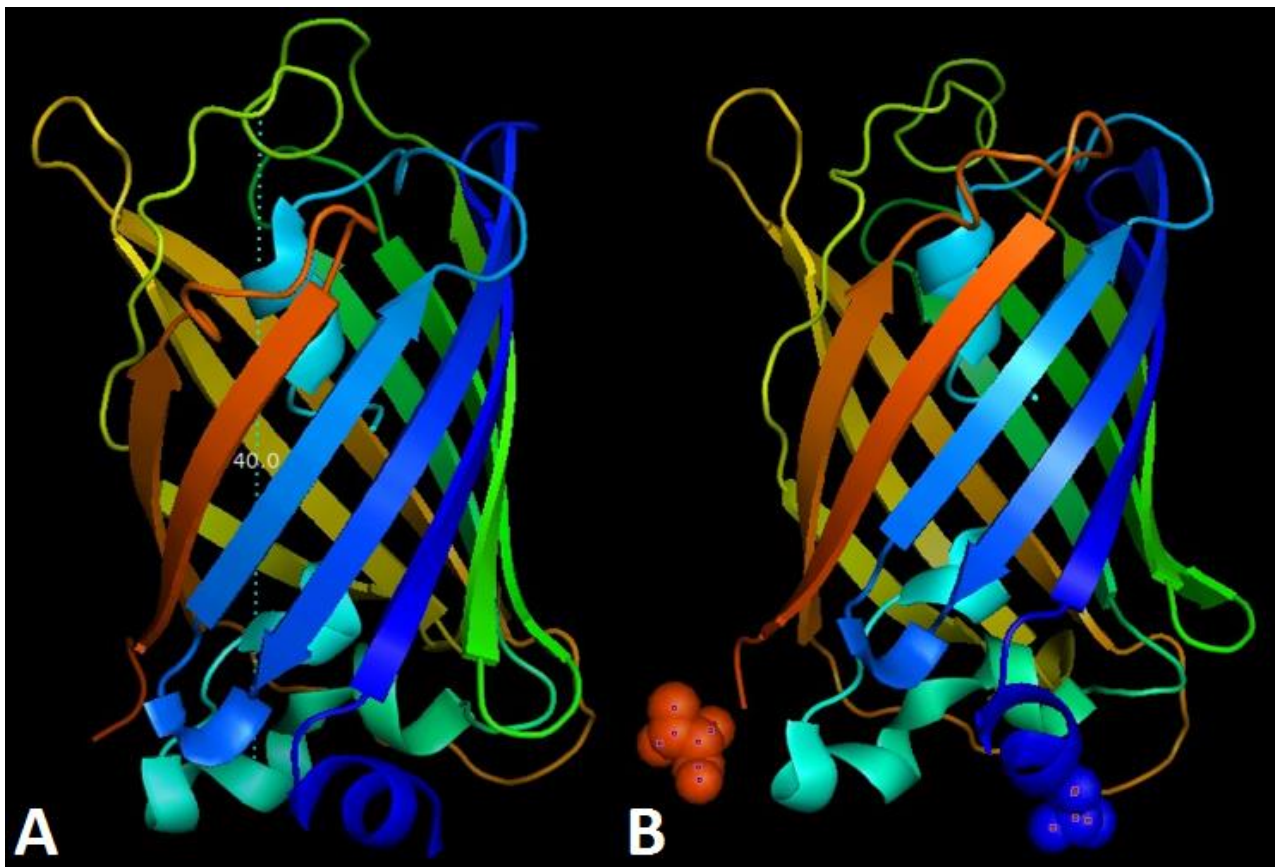


Figura 12: Estructura tridimensional de EGFP 2Y0G. A: muestra la distancia aproximada entre un átomo de la base del barril beta y un átomo de la zona superior, siendo cercana a 40 Å; B: en esferas se muestran los residuos aminoacídicos pertenecientes al extremo carboxilo (rojo) y amino (azul). Imagen generada en PyMOL.

Se observa que los extremos carboxilo y amino se encuentran ambos en la base inferior del barril beta, por lo cual, en el caso de expresar una molécula de fitoquelatina dentro del mismo marco abierto de lectura, ésta quedaría orientada hacia la membrana celular y no hacia el exterior de la célula.

Conocido lo anterior, se propone como una solución a este inconveniente la incorporación, a nivel de gen, de un péptido que genere una separación entre la EGFP y la PC. Chen *et al.* (2013) estudiaron las propiedades de péptidos existentes en la naturaleza que cumplen el rol de unir dos dominios proteicos funcionales (*linker*) o de generar una separación entre ellos (*spacer*), manteniendo una unión covalente.

Chen *et al.* (2013) establecieron que los criterios para la selección de un *spacer* o *linker* son su largo, composición, hidrofobicidad, estructura secundaria y labilidad frente a proteasas, y clasificaron los *linkers* estudiados como flexibles, rígidos o escindibles. Además, determinaron que aminoácidos pequeños como glicina, serina y treonina otorgan gran flexibilidad a la estructura primaria dada la libertad de movimiento de sus enlaces, y estabilidad por los puentes de hidrógeno que pueden formar, además de que comúnmente dispuestos en tándem no forman estructuras secundarias [39].

Para obtener una expresión funcional de un péptido del tipo PC, sería necesario, dada la orientación del extremo amino de la EGFP, que existiera un *spacer* relativamente largo y flexible entre ella y la PC para permitir movilidad y acción quelante sobre los iones del medio. Si se concibe el esqueleto de la estructura de un aminoácido como dos enlaces carbono-nitrógeno y un enlace carbono-carbono, el largo que aporta cada residuo aminoácido a un péptido sería de aproximadamente 4,4 Å en promedio [40].

Ahora, considerando que lo deseado es que la PC quede hacia el extremo opuesto al que se encontraría en el barril β de la EGFP, se requiere espaciar la PC una distancia similar al largo del barril EGFP, por lo que se necesitan 40/4,4~9,1 aminoácidos en el *spacer*.

En cuanto a la secuencia aminoacídica de la fitoquelatina sintética a expresar, se especula que el uso de un valor n encontrado comúnmente en la naturaleza (entre 2 y 5 [27]) puede resultar muy bajo para obtener una bioadsorción medible; por otro lado, expresar oligopéptidos tipo PC muy largos como en el trabajo de Biondo *et al.* (2012) puede generar fácilmente estrés redox en el hospedero debido a la gran cantidad de cisteínas que estas moléculas poseen en su estructura.

Teniendo en consideración entonces que es necesario diseñar fragmentos compuestos por distintos *spacers* y fitoquelatinas, se concibieron estas secuencias del tipo '*spacer* + PC' bajo el nombre de fragmentos PCL. Se consideró necesario probar con *spacers* de al menos dos largos distintos, como también con fitoquelatinas de dos largos distintos, entregando así cuatro combinaciones de fragmentos PCL, incorporadas en los plasmidios nombrados *plasmid10*, *plasmid11*, *plasmid12* y *plasmid13*.

Debido a que se desconocen las eventuales interacciones intermoleculares que pudieran actuar, se requiere conocer el posible impedimento estérico generado por EGFP al momento de expresar péptidos comparativamente más cortos, como lo son los fragmentos PCL.

Considerando lo anterior, se diseñaron otros cuatro sistemas de expresión similares a los anteriormente ilustrados pero que no poseen EGFP en sus secuencias (*plasmid06*, *plasmid07*, *plasmid08* y *plasmid09*, que serían construidos a partir de *plasmid10*, *plasmid11*, *plasmid12* y *plasmid13*, respectivamente).

Tales sistemas se pueden obtener al amplificar flanqueando con partidores la secuencia nucleotídica de EGFP "hacia fuera", incluyendo en ellos una zona de homología con la secuencia a la cual es necesario unirse para recircularizar el plasmidio sin la proteína fluorescente (Figura 13).

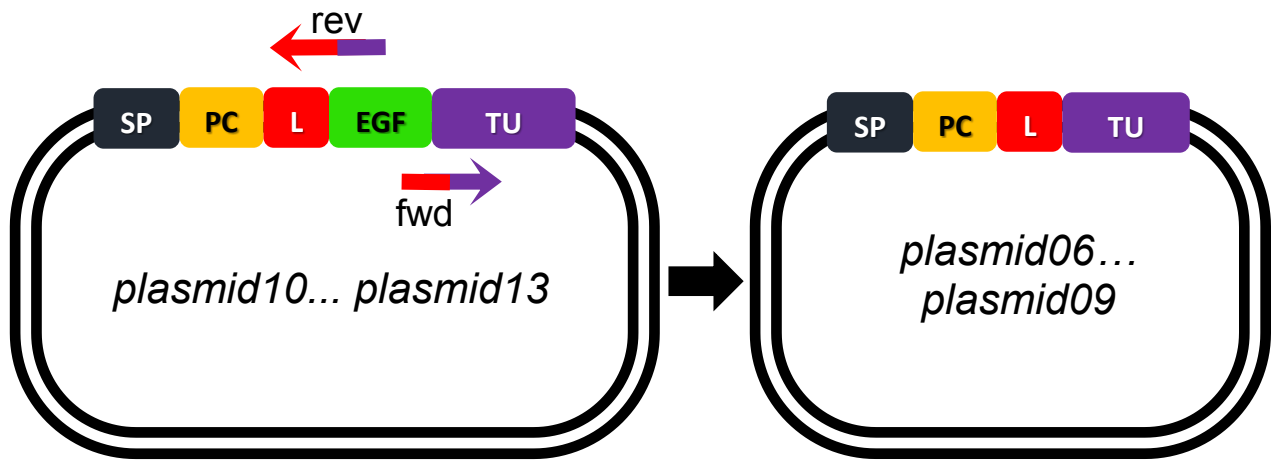


Figura 13: Concepción de la amplificación para eliminar EGFP de los sistemas *plasmid10*, *plasmid11*, *plasmid12* y *plasmid13*. Las flechas representan los partidores: en sentido *reverse* amplifica un plasmidio hacia el extremo amino desde un *spacer* (flecha en rojo) y tiene complementariedad con el extremo 5' de la secuencia de TU-Ag43 (segmento morado); en sentido *forward* amplifica un plasmidio hacia el extremo carboxilo desde Tu-Ag43 (flecha morada) y tiene complementariedad con el extremo 3' de un *spacer* (segmento rojo). Elaboración propia.

Una vez determinado el efecto de EGFP sobre los segmentos PCL en general, se pretende medir la misma eventual interferencia de EGFP, pero específicamente en la disposición tridimensional sobre los *spacers*. Para ello, se requiere eliminar los fragmentos codificantes para fitoquelatinas, lo cual se puede obtener, como en el caso anterior, flanqueando “hacia afuera” tales secuencias con partidores que consideren homología para una posterior recircularización del plasmidio sin PC. De esta manera, se generan los sistemas *plasmid04* y *plasmid05* a partir de *plasmid11* y *plasmid12*, respectivamente (Figura 14).

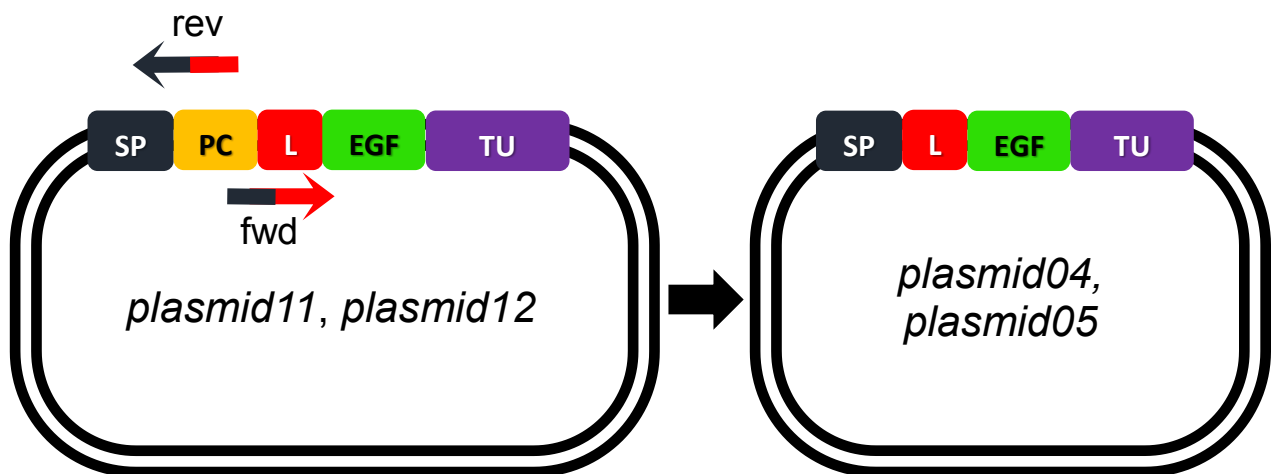


Figura 14: Concepción de la amplificación para eliminar secuencias codificantes de PC de los sistemas *plasmid11* y *plasmid12*. Las flechas representan los partidores: en sentido *reverse* se amplifica un plasmidio hacia el extremo amino desde SP-Ag43 (flecha negra) y tiene complementariedad con el extremo 5' de la secuencia de un *spacer* (segmento rojo); en sentido *forward* se amplifica un plasmidio hacia el extremo carboxilo desde un *spacer* (flecha roja) y tiene complementariedad con el extremo 3' de SP-Ag43 (segmento negro). Elaboración propia.

Otro control con el cual es importante contar es el relativo a la capacidad quelante de los mismos *spacers*, para lo cual es necesario obtener la expresión en membrana de sólo estos últimos. Tal sistema se puede obtener a partir de los sistemas *plasmid04* y *plasmid05*, pero eliminando esta vez la secuencia que codifica para EGFP, utilizando los mismos partidores usados para la construcción de los sistemas *plasmid07* y *plasmid08* (Figura 15).

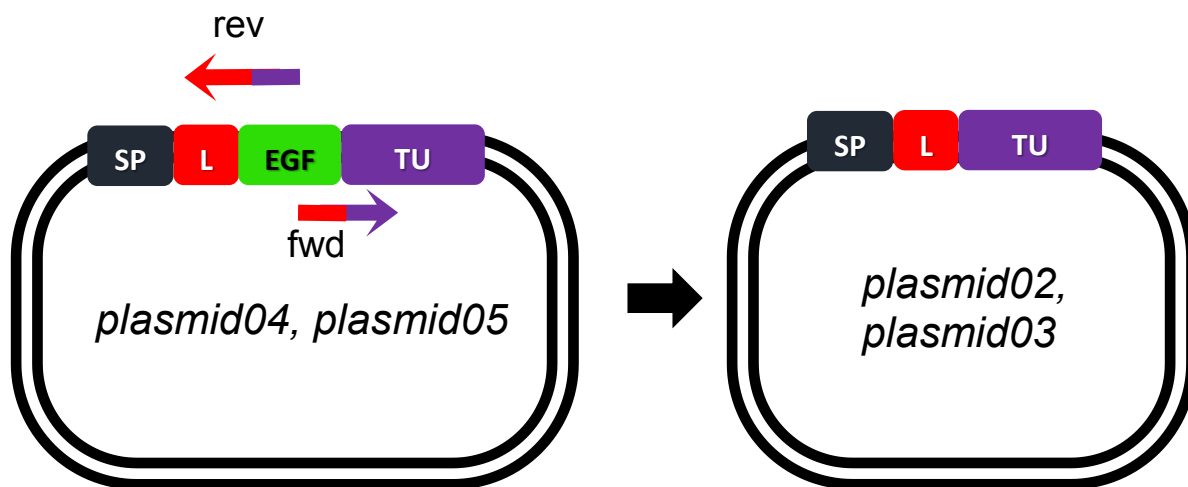


Figura 15: Concepción de la amplificación para eliminar la secuencia codificante de EGFP de los sistemas *plasmid04* y *plasmid05*. Las flechas representan los partidores explicados anteriormente en la Figura 13. Elaboración propia.

Finalmente, un último control corresponde al requerido para la determinación del efecto quelante de la EGFP, el cual corresponde simplemente a la secuencia presente en *plasmid01* mostrado en la Figura 9.

Para resumir, se muestra en el siguiente diagrama el diseño consecutivo de todas las variantes del sistema de expresión inicial *plasmid01*, con todos los controles necesarios para las mediciones de expresión y de actividad bioadsorbente (Figura 16).

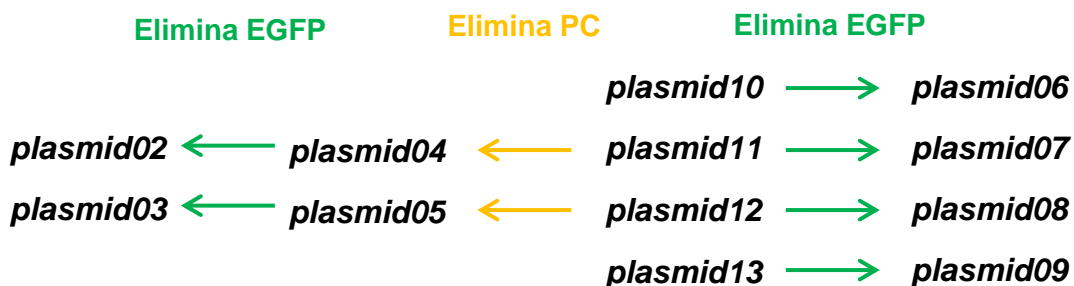


Figura 16: Diagrama resumen del diseño secuencial de los plásmidos para obtener los controles necesarios para medir expresión en superficie y bioadsorción. Elaboración propia.

4.1.2. Determinación de las técnicas de biología molecular a utilizar

A partir de lo que se ha especificado anteriormente relativo a la longitud de las fitoquelatinas por escoger, y los *spacers* ubicados inmediatamente en el extremo carboxilo de tales PC, se espera que estos fragmentos tengan un largo que varíe entre 70 y 120 pares de bases. Esto dificulta su síntesis directa, debido a que son demasiado largos para solicitar su síntesis química como partidores, que comercialmente pueden ser solicitados para su síntesis hasta 100 bases; al mismo tiempo, resultan ser muy cortos para ser sintetizados como genes completos, ya que lo común es encontrar ofertas de síntesis de genes desde 500 pares de bases.

Dado lo anterior, se propuso realizar la síntesis de los fragmentos PCL mediante PCR recursivo. Esta técnica tiene como primera ventaja el hecho de que es relativamente barata por cuanto los genes sintéticos son muy cortos. El principio consiste en generar *overlapping* entre los partidores (sin DNA templado) de manera de construir un gen completo por *annealing* y acción de una DNA polimerasa, extendiendo los extremos 3' de los oligonucleótidos para entregar productos de doble hebra más largos [41]. Un esquema explicativo de lo anterior es la Figura 17.

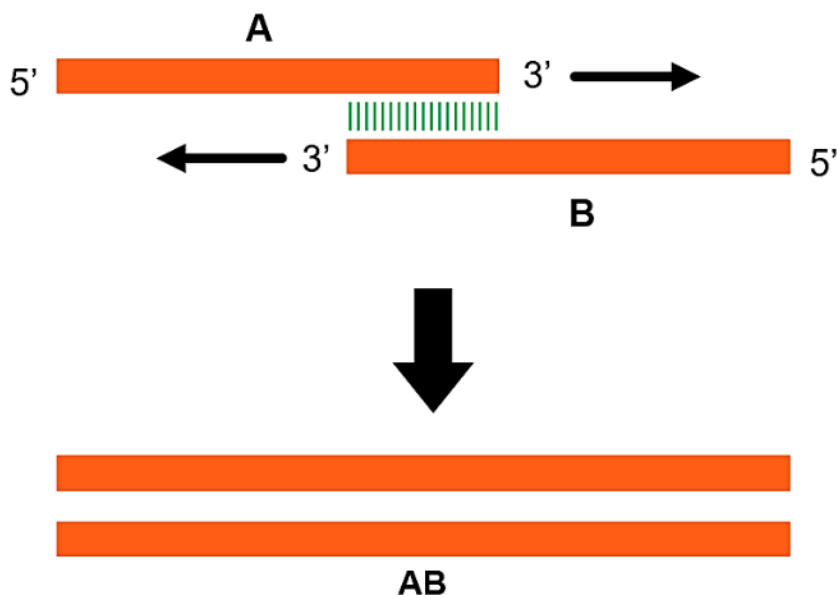


Figura 17: Representación del producto de PCR recursivo. En anaranjado se muestran los partidores *forward* y *reverse* (A y B). Las barras verdes ilustran la zona de hibridación de ambos partidores, que como producto de PCR generan el fragmento de doble hebra AB. Elaboración propia.

Para la reacción de PCR recursivo se usó la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, que usa una temperatura de denaturación de 98°C por 30 segundos, un tiempo de extensión de entre 15 y 30 segundos por kilobase y una temperatura de extensión óptima de 72°C, según el proveedor [42]; el tiempo de *annealing* es de entre 10 y 30 segundos y la temperatura queda determinada por la extensión y composición de los partidores de cada reacción.

Como se pretende armar un fragmento que contiene un *spacer* de alrededor de 9 residuos aminoacídicos unido a una PC_n sintética con n entre 2 y 11, se estima que el fragmento

final PCL tendría una extensión aproximada de entre 40 y 100 pb, para lo cual sería necesario tener algunos partidores con una extensión superior a las 50 bases. Esto dificulta la ejecución del diseño debido a que partidores tan largos no actúan bien como cebadores. Dado esto, se realizará una segunda etapa de síntesis de fragmentos PCL mediante la técnica de *overlap extension* PCR, en la cual se unen dos fragmentos blanco.

El método de síntesis por *overlap extension* PCR (OE-PCR) considera dos etapas: una primera en la cual los fragmentos blanco hibridan entre ellos en su zona de homología y se elonga en los extremos 3' el híbrido formado entre ellos, y una segunda en la cual se amplifica el híbrido utilizando partidores específicos [43]. En el caso particular de este diseño, los fragmentos blanco corresponderían a las secuencias sintetizadas por PCR recursivo, según la Figura 17, el fragmento llamado AB. El procedimiento se ilustra a continuación en la Figura 18.

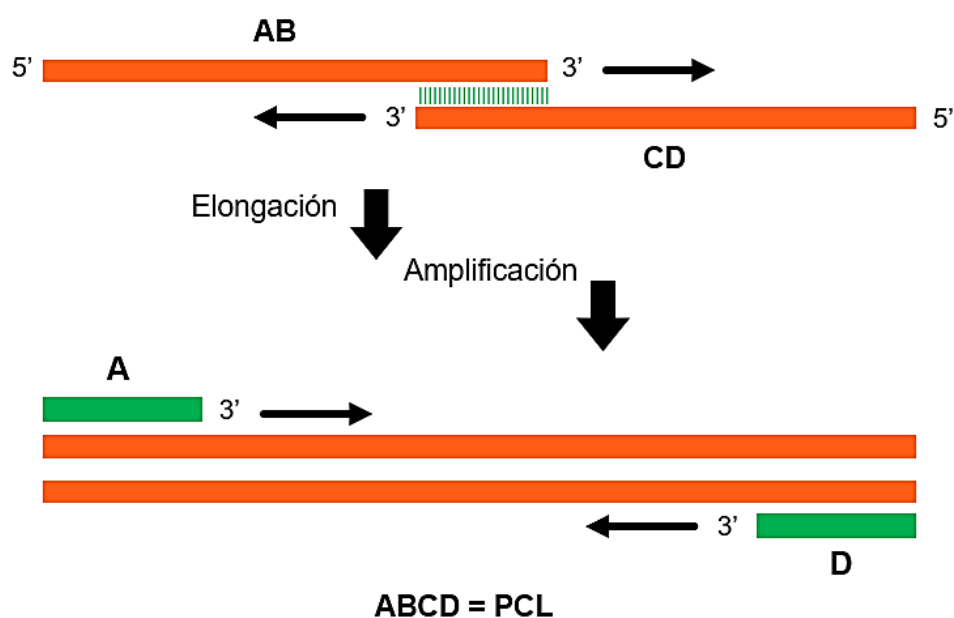


Figura 18: Representación del método de amplificación por OE-PCR. En una primera etapa, los fragmentos AB y CD (productos de la PCR recursiva explicada anteriormente) hibridan en la zona de barras verdes y la acción de una DNA polimerasa completa el híbrido de doble hebra en los extremos 3', generando una baja cantidad de copias del fragmento ABCD correspondiente al fragmento PCL. En la segunda etapa, se utilizan los partidores A y B del PCR recursivo anterior para amplificar el híbrido ABCD. Elaboración propia.

En ambas reacciones del proceso de OE-PCR se utilizó la enzima KOD Hotstart DNA Polymerase y sulfato de magnesio al 1,5 mM en la mezcla; esta polimerasa usa una temperatura de denaturación de 95°C por 2 minutos, un tiempo de extensión de entre 10 segundos por kilobase para templados menores a 50 pb y una temperatura de extensión óptima de 70°C, según el proveedor [44]; el tiempo de *annealing* es de 10 segundos y la temperatura queda determinada por la extensión y composición de los partidores de cada reacción.

Para conservar estos fragmentos ya sintetizados por distintas variantes de PCR, se pretendió incorporarlos en un vector de clonamiento mediante técnicas simples ya estandarizadas, para luego transformar una cepa bacteriana de clonamiento y perpetuarla. Se propuso utilizar el vector pBluescript II SK(+), que permite la

incorporación de fragmentos mediante la linealización con enzimas de restricción y la ligación con DNA ligasa. Además, tiene la ventaja de permitir realizar doble *screening* por resistencia a antibiótico y además por *blue-white selection* [45].

Posteriormente, se pretendió realizar la incorporación de los fragmentos PCL en el vector que posee el constructo para la expresión de Ag43 y EGFP. La metodología usada es la técnica de *Gibson Assembly*, que consiste en un método isotérmico de una reacción para ensamblar múltiples moléculas de DNA sobrelapadas por la acción conjunta de una 5' exonucleasa, una DNA polimerasa y una DNA ligasa [46]. En el trabajo de Lagos (2014), se logró expresar el constructo Ag43-EGFP mediante su clonación en el plasmidio pET22b(+); dado esto, y según las recomendaciones de diseño para esta técnica, fue necesario agregar a cada fragmento PCL una región de homología de entre 15 y 25 nucleótidos a cada extremo, con una temperatura de *melting* (T°_m) igual o superior a los 48°C [47]; esta incorporación fue realizada al momento de diseñar los partidores para ejecutar el PCR recursivo. Así, el procedimiento de síntesis de los fragmentos PCL con colas para *Gibson Assembly* se ilustra como sigue:

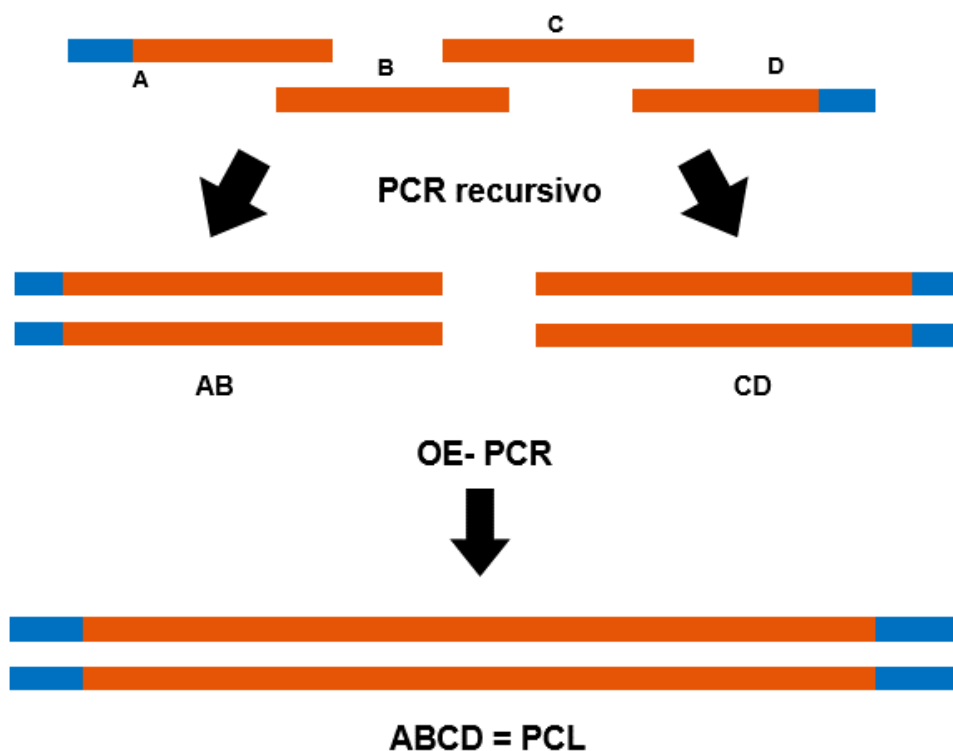


Figura 19: Procedimiento completo del ensamble DNA para la obtención de los fragmentos PCL (en anaranjado) con colas para *Gibson Assembly*, representadas en azul. Se muestra en la figura el primer paso, desde partidores (A, B, C y D) que ya poseen colas para Gibson hibridan entre ellos en el PCR recursivo generando los fragmentos AB y CD, que por OE-PCR logran amplificar los fragmentos completos PCL con colas incluidas. Elaboración propia.

Una vez que los fragmentos están construidos mediante PCR recursivo y OE-PCR, se realizó un *Gibson Assembly* para introducirlo en el vector de expresión pET22b(+) modificado que incluye los marcos de lectura de SP-Ag43, EGFP y TU-Ag43. Como se mencionó anteriormente, los PCL fueron insertos entre el marco de lectura del péptido

señal y el de la EGFP, para que, de esta forma, al ser procesado el SP-Ag43, la secuencia aminoacídica del PCL quedara expuesta al medio extracelular.

El procedimiento para realiza la ligación por *Gibson Assembly* se realiza con una T5 exonucleasa, Taq ligasa y Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, y utiliza como medio de reacción el *isothermal buffer*, preparado con PEG8000, *buffer* Tris-HCl a pH 7,5, cloruro de magnesio, NAD⁺, deoxinucleótidos, ditiotreitól y agua libre de nucleasas. El tiempo de ligación es de media hora y la temperatura del proceso es la temperatura de *melting* de las colas complementarias, típicamente entre 50 y 52°C.

Se postula que una expresión eficiente con las variantes del vector pET22b(+), que es un vector de expresión, sería posible mediante la transformación de una *Escherichia coli* cepa BL21(DE3), ya que es utilizada ampliamente como cepa de expresión debido a la presencia genómica del gen de T7 RNA polimerasa [48], que tiene reconocimiento específico por el promotor y terminador que flanquean el CMS de los plasmidios pET [35], favoreciendo así la transcripción de los marcos de lectura insertos ahí. Además, *E. coli* BL21(DE3) tiene una deficiencia natural de las proteasas lon y OmpT, que en las cepas K-12 y B sirven para degradar proteínas mal plegadas y prevenir la acumulación de proteínas ciclo-específicas; las células deficientes en estas proteasas son mucho más susceptibles de una mejor la producción de proteínas de genes clonados [48].

4.1.3. Screening

El primer paso en cuanto a transformación de células correspondió a la ligación de los fragmentos PCL en el vector de clonamiento pBluescript II SK(+) (pBS). El procedimiento consiste en realizar una digestión con la enzima restrictiva EcoRV, la cual linealiza el pBS realizando un corte en el gen *LacZ*, para luego hacer una ligación de extremos romos del vector, donde el inserto es el fragmento PCL. Los pBS que no tienen el inserto en la zona *polylinker* producen colonias azules en una cepa apropiada de bacteria; los plasmidios que tienen el inserto producen colonias blancas usando la misma cepa, porque los insertos interrumpen la región codificante del fragmento del gen *lacZ* [45].

Una vez recircularizado el vector mediante su ligación con T4 ligasa según el procedimiento especificado por el proveedor [49], éste fue introducido en un cultivo de células competentes. En particular, *Escherichia coli* cepa Top10 posee propiedades que contribuyen a su utilidad como cepa de clonamiento. Las cepas nativas de *E. coli* contienen endonucleasas no específicas en el espacio periplasmático. Debe tenerse extremo cuidado para evitar la degradación de plasmidios en la extracción desde este tipo de cepas nativas. La mutación *endA* elimina esta endonucleasa y puede mejorar significativamente la calidad de las preparaciones plasmidiales [50].

La selección por colores puede ser vista sembrando en placas Petri con medio LB que contenga 100 µg/mL de ampicilina, 80 µg/mL de X-gal fresco y 20 mM de IPTG. Las colonias que contienen fagémidos sin inserto resultan azules luego de ser incubadas por 12-18 horas a 37°C. Las colonias con fagémidos que contienen inserto permanecerán blancas. Para un mejoramiento del color azul, se pueden colocar las placas de a 4°C por dos horas y luego ser incubadas *overnight* a 37°C [45].

Las colonias blancas deben ser picadas para realizar un PCR de colonias, el cual, en el caso de resultar positivo, indica que esa colonia debe ser crecida en medio líquido para extraer el DNA plasmidial de esa unidad formadora de colonias que es recombinante, y solicitar la secuenciación de esa zona del fagémido modificado para corroborar la correcta inserción y perpetuación de ese clon. Esta PCR se realizó utilizando la enzima GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase, el buffer *Green* incluido en su kit y cloruro de magnesio; la enzima requiere una denaturación inicial del DNA a 95°C por 2 minutos, un tiempo de extensión de 1 minuto por cada kilobase a 72°C; el tiempo de *annealing* es de entre 15 y 60 segundos y la temperatura depende de la composición y largo de los partidores [51].

De manera similar, luego de realizar el *Gibson Assembly* en el vector de expresión pET22b(+), éste último debió ser integrado en un cultivo competente de la cepa *E. coli* BL21(DE3), para luego poder realizar selección por antibiótico, lo cual es permitido gracias a la resistencia a ampicilina que pET22b(+) confiere a las células que resulten ser transformantes [52].

En cuanto a las transformaciones tanto en vector de clonación como de expresión, se esperaba que fuesen realizadas de manera efectiva y eficiente en cepas electrocompetentes mediante electroporación, ya que esto permite una tasa de transformación efectiva del orden de 10^{10} colonias por cada microgramo de DNA [53], en contraste con las 10^6 - 10^9 colonias transformadas por μg de DNA que se alcanzan utilizando células quimiocompetentes [54].

4.1.4. Medición de bioadsorción y eficiencia del abatimiento de arsénico

El flujo que se pretende tratar tiene una concentración de arsénico cercana a los 2 g/L, lo cual equivale a una concentración de 26,7 mM de arseniato (como polianión). Es entonces necesario medir concentraciones de arsénico cercanas a estos valores en el sobrenadante del cultivo, de manera comprobar que las especies arsenicales quedan efectivamente adsorbidas en la superficie celular, es decir, en el *pellet* del cultivo.

Dhar *et al.* (2004) estandarizaron y optimizaron un método colorimétrico rápido de medición de iones arsenito y arseniato con precisión para soluciones con concentraciones entre los 0,67 y 8 μM [55], por lo que, para utilizar este método de medición, sería necesario diluir las soluciones problema hasta cerca de entre 3000 y 4000 veces, ya que 2 g/L de arsénico, que es lo que posee el PLS ya abatido, corresponde a una concentración de arseniato igual a 26,7 mM.

Como el arsénico teóricamente debería quedar adherido a la superficie celular de manera irreversible, la manera simple de cuantificar la cantidad de arsénico que se logre abatir por biosorción sería midiendo la variación de arsénico del sobrenadante en el tiempo normalizado por la biomasa, en distintas condiciones de pH y concentraciones iniciales de sales arseniato. Las variaciones del pH de la suspensión son necesarias para ver el si es que existe un grado de protonación importante en cada pH que pueda alterar la capacidad quelante de las PC sintéticas; se hace necesario además probar con distintas concentraciones iniciales de arseniato para determinar cómo la abundancia de sus iones afecta de la concentración de saturación del adsorbente.

Para evitar la interferencia del medio de cultivo en las mediciones por espectrofotometría, el cultivo se separa de las células, que luego son resuspendidas en un *buffer*, y a esa suspensión se agregan las sales para medir la adsorción de arsénico en el tiempo. A través de un balance de masa, se obtiene la cantidad de arsénico adsorbido por las células, asumiendo que éste no entra de manera considerable dentro de las células:

$$AS_{total} = AS_{sobrenadante} + AS_{adsorbido}$$

$$AS_{ADS} = AS_T - AS_{SN}$$

De esta manera, con distintas concentraciones en el medio, es posible elaborar una isoterma de adsorción, para luego conocer cuál es la termodinámica a la que se asemeja este fenómeno, lo cual se realiza mediante un ajuste de parámetros para estudiar posteriormente la termodinámica de adsorción como una relación de Langmuir o Freundlich, por ejemplo. Además, así también se puede determinar el tiempo de exposición necesario para alcanzar la saturación de las células, lo cual sería utilizado para el dimensionamiento de los equipos a través del conocimiento de tiempos de residencia.

La caracterización de la cinética de adsorción se obtiene de la confección de curvas de concentración de arsénico en el sobrenadante versus tiempos de exposición. Se esperaba que la cantidad de arsénico adsorbido fuese superior en suspensiones de células a pH cercano al fisiológico, ya que es en estas concentraciones de hidronio en las que los péptidos PC se encuentran en el estado de protonación ideal para la quelación de iones arsenicales en plantas, así como también las sales se encuentran en el estado de protonación correspondiente al cual se encuentran durante la quelación de arsenito y arseniato en condiciones naturales.

4.4.4. Estudio de operaciones unitarias y procesos biotecnológicos potencialmente implementables en el proceso AAA de ECL

La tecnología que se seleccione para la producción de las células biosorbentes debe considerar como principal criterio la demanda de generación de tales células debido a la pérdida de viabilidad, elución, saturación irreversible y eficiencia de adsorción de ellas en el proceso de abatimiento alternativo que se planteará. Esta demanda de producción podrá ser cuantificada de manera relativamente precisa una vez que se determine la eficiencia de fijación de las células en el material más idóneo que se seleccione, la vida útil de las células como partículas sorbentes y la cinética de adsorción y desorción de especies arsenicales en la superficie celular.

Un segundo criterio importante está relacionado con la viabilidad económica dada la disponibilidad de recursos para tal producción, considerando como limitante que la única fuente de materia orgánica actualmente disponible para el cultivo organismos quimioorganotrofos correspondería a las aguas negras de la planta, y también teniendo presente que podrían obtenerse distintas tasas de crecimiento al modelar los fermentadores si se estudian reactores de distintos tipos (*batch*, CSTR, PFR) operando en distintos regímenes (*batch*, *fed-batch* y continuo).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Diseño de los vectores de transformación

Luego del análisis de los tipos y características de los *spacers* y fitoquelatinas, se consideró necesario contar con dos largos distintos de cada una de estas especies. Así, se incorporaron entonces dos *spacers*, uno de 7 aminoácidos y otro de 12 (3 por sobre y 2 por debajo de lo requerido según el cálculo especificado en la metodología relativo al tamaño de la EGFP), ricos en glicina y serina, para ver el efecto del largo del espaciador en la capacidad quelante de las PCs. Las secuencias aminoacídicas se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2: Detalle de los espaciadores seleccionados para el diseño de los constructos de expresión de PC.

| ELEMENTO | SECUENCIA AMINOACÍDICA | # RESIDUOS ; # pb |
|----------------------|------------------------|-------------------|
| <i>Spacer 1 (L1)</i> | GSGGGSG | 7; 21 |
| <i>Spacer 2 (L2)</i> | GSGGGSGGGSGG | 12; 36 |

Se utilizaron sólo glicinas y serinas para otorgar movilidad y flexibilidad a los *spacers*, lo cual permitiría el movimiento de la fitoquelatina en el extremo distal del *spacer*, dando así mayor libertad espacial para actuar como agente quelante.

Considerando lo anterior, se utilizaron dos péptidos de distintos largos: una PC de largo 5 ([EC]₅-G, que constituye la PC más larga dentro de las más abundantes encontradas en la naturaleza) y otra de largo 11 ([EC]₁₁-G, que constituye la PC natural más larga hallada); el objetivo de estas dos secuencias sería ver el efecto del largo en la capacidad quelante del hospedero. El detalle de sus secuencias se muestra a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3: Detalle de las PC sintéticas seleccionados para el diseño de los constructos.

| ELEMENTO | SECUENCIA AMINOACÍDICA | # RESIDUOS; # pb |
|----------|-------------------------|------------------|
| PC1 | ECECECECECG | 11; 33 |
| PC2 | ECECECECECECECECECECECG | 23; 69 |

Dado que se tienen dos *spacers* y dos PCs, existen cuatro combinaciones cuya expresión se debía probar experimentalmente de manera independiente en distintas transformantes. A continuación, se ilustra lo anteriormente mencionado (Figura 20).

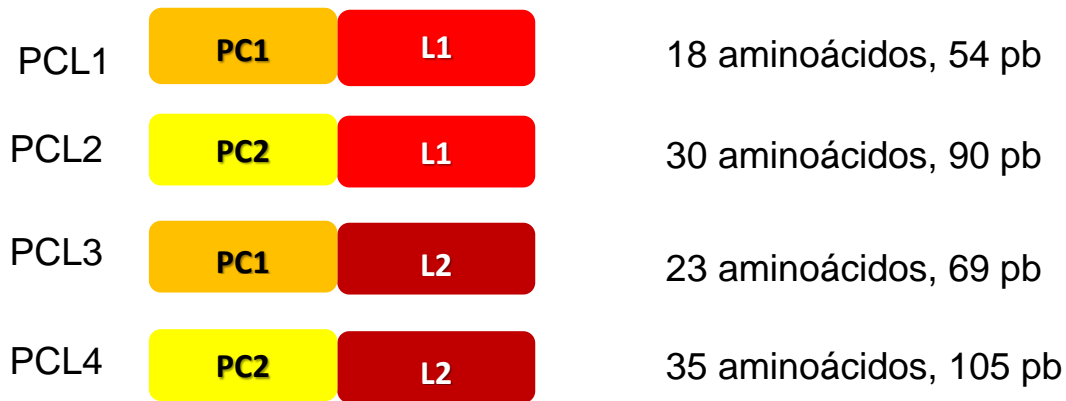


Figura 20: Combinaciones fitoquelatina-spacer que serán probadas en distintos transformantes. Elaboración propia.

Estos cuatro fragmentos denominados PCL1, PCL2, PCL3 y PCL4 respectivamente, serían ensamblados en el vector de manera que quedasen flanqueados por SP-Ag43 y por EGFP, para que así todo lo anteriormente descrito (SP-Ag43, PCL, EGFP y TU-Ag43) quedaran dentro de un mismo marco abierto de lectura, con su origen en la metionina en el extremo amino de SP y su fin con el codón de término en el extremo carboxilo de TU.

La secuencia nucleotídica de estos fragmentos fue determinada mediante la herramienta *Codon Optimization Tool* del proveedor IDT [56], para así optimizar el uso de tRNA específicamente para *Escherichia coli*, considerando en cada caso las secuencias que flanquean a cada fragmento 'PCL'. Es así que se obtuvo el diseño de un sistema de expresión heteróloga consistente en cuatro variantes del vector *plasmid01* (p01), cuya estructura de importancia se muestra a continuación (Figura 21).

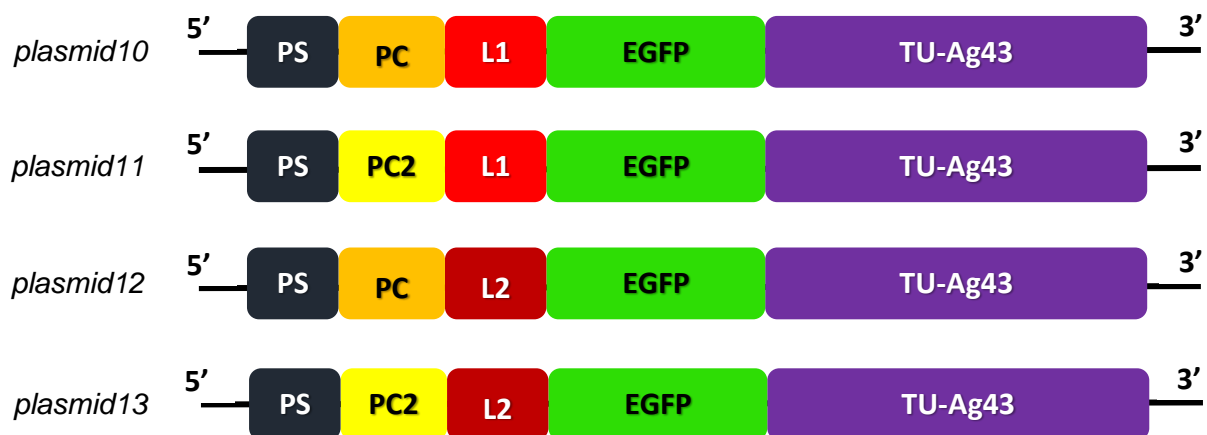


Figura 21: Variantes del vector p01 que incluyen cada una un fragmento PCL distinto, y su denominación (a la izquierda). Elaboración propia.

Los fragmentos PCL fueron construidos mediante PCR recursivo y OE-PCR, como se detalló en la metodología; para esto, fue necesario dividir los fragmentos en 2 partidores con *overlapping* en el caso de PCL1, y en 4 partidores con *overlapping* en el caso de

PCL2, PCL3 y PCL4; fue necesario diseñar un número par de partidores que cubrieran toda la secuencia de los fragmentos PCL incluidas las colas para *Gibson Assembly*, debido a que de otra manera, el sentido de las hebras no permite homología para la realización de OE-PCR posterior al PCR recursivo. Las secuencias de los partidores se muestran en el Anexo D – Partidores para la síntesis e inserción de fragmentos PCL en el vector de expresión.

Para la realización del *Gibson Assembly* y la inserción de los fragmentos PCL en pET22b(+), fue necesario diseñar partidores que linealizaran el *vector backbone* justo en la zona en la que es deseado incorporar los PCL, es decir, justo al término del péptido señal e inicio de la EGFP. Lo anterior se ilustra a continuación en la Figura 22:

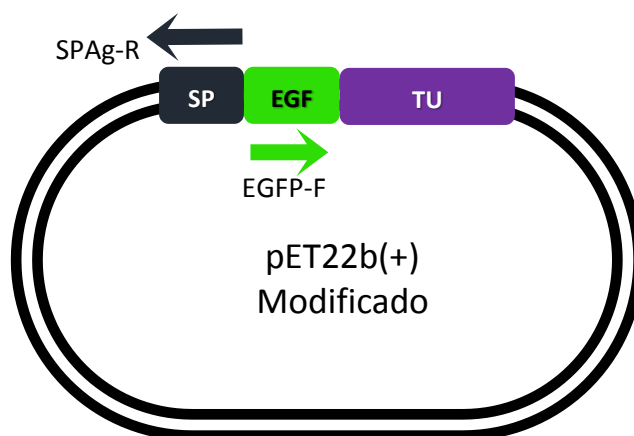


Figura 22: Ubicación de los partidores para la linealización del *vector backbone*. Elaboración propia.

Las secuencias nucleotídicas y sus características para esta linealización se encuentran detalladas en el Anexo D – Partidores para la síntesis e inserción de fragmentos PCL en el vector de expresión. La linealización en principio se realizó utilizando la enzima KOD Hotstart DNA Polymerase, según los protocolos estandarizados [44] y detallados anteriormente. El cóctel de esta PCR se muestra en el Anexo 8.6.

Una vez sintetizados los PCL y linealizado el vector, mediante *Gibson Assembly* se obtendrían los plasmidios p10, p11, p12 y p13, los cuales tienen el *vector backbone* de la Figura 22 y además los fragmentos PCL1, PCL2, PCL3 y PCL4, respectivamente, entre el péptido señal y la EGFP.

La obtención de los plasmidios p06, p07, p08 y p09 sería mediante una PCR convencional, pero flanqueando el marco de lectura de la EGFP hacia afuera, de manera de obtener plasmidios con los fragmentos PCL pero sin la EGFP. Este procedimiento se realiza utilizando partidores diseñados para ello, como se muestra en la Figura 13. De manera análoga, la obtención de los plasmidios p04 y p05 es a partir de los plasmidios p11 y p12, pero esta vez se utilizan partidores que flanquean hacia afuera el segmento PCL (Figura 14); a partir de p04 y p05, y finalmente, flanqueando hacia afuera EGFP utilizando los mismos pares de partidores que para construir p07 y p08, se obtendrían los plasmidios p02 y p03, respectivamente, como se observa en la Figura 15.

El detalle de las secuencias nucleotídicas de todos estos partidores y sus características se muestra en el Anexo E – Partidores para la obtención de los plasmidios p02, p03, p04, p05, p06, p07, p08 y p09. Todos los partidores mencionados poseen colas de homología para la recircularización del plasmidio mediante *Gibson Assembly*.

5.2. Construcción de los vectores de transformación

Los PCR recursivos se realizaron juntando pares de partidores, de manera de generar reacciones en las cuales hibridaron partidores del tipo PCLX-1 con PCLX-2 formando el híbrido PCLX-12, y otras reacciones en las cuales hibridan pares del tipo PCLX-3 con PCLX-4, formando el híbrido PCLX-34, siendo X el valor 2, 3 o 4; en el caso de PCL1, sólo bastó hacer reaccionar el par de partidores PCL1-1 y PCL1-2 para obtener el fragmento PCL1 completo.

La reacción se llevó a cabo utilizando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase y su buffer HF, con una denaturación inicial de 2 minutos a 94°C y 30 ciclos con una denaturación de 15 segundos a 94°C, un *annealing* a la temperatura de melting según los partidores por 35 segundos [42] y una extensión a 72°C por 4 segundos. La formulación del cóctel se muestra en el Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y *Gibson Assembly*. Posteriormente, se visualizaron los resultados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% por 50 minutos a 80V (Figura 36).

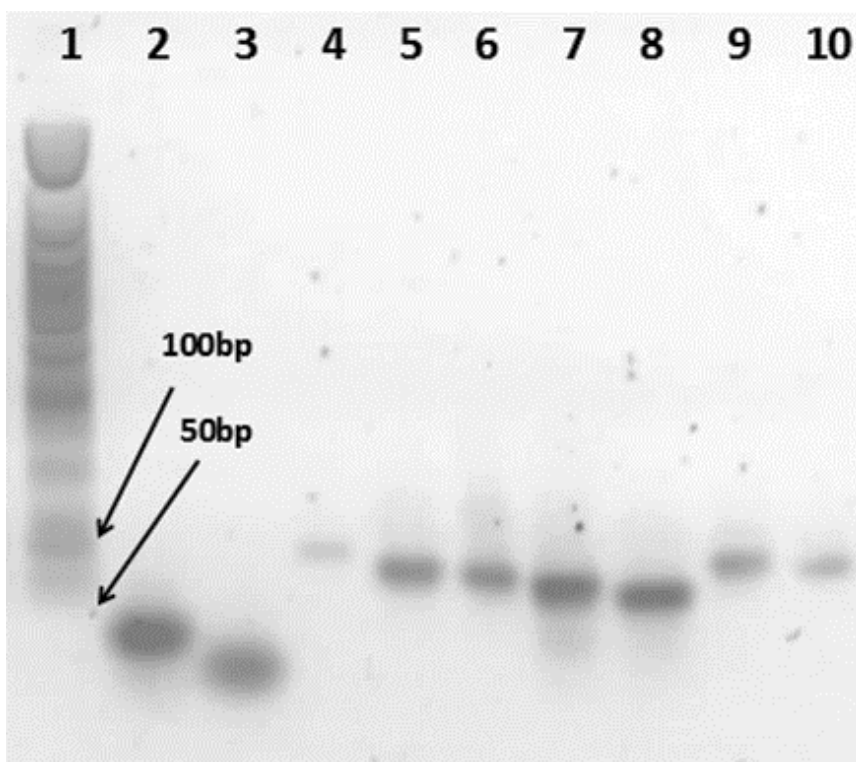


Figura 23: Electroforesis en gel de agarosa para visualización de los productos de PCR recursivo. En orden según los carriles, las muestras son como se denota a continuación: 1: *50bp ladder*; 2: partidor PC1-2 (53b); 3: partidor PCL3-4 (33b); 4: PCL1-12; 5: PCL2-12; 6: PCL2-34; 7: PCL3-12; 8: PCL3-34; 9: PCL4-12; 10: PCL4-34.

Analizando la fotografía de la Figura 23, es posible observar que los productos de PCR recursivo tienen efectivamente un peso molecular mayor al de los partidores PCL1-2 y PCL3-4 utilizados como controles de electroforesis en los carriles 2 y 3, respectivamente. Además, se observa que todos estos productos se encuentran en la zona definida por las bandas 100bp y 50bp del ladder 50pb en el carril 1; es más, se aprecia claramente que el producto obtenido es decreciente en peso entre los carriles 4 y 8, que en los carriles 9 y 10 las muestras son más livianas que el 8, y entre ellas, la muestra 10 es más liviana que la 9.

Todo lo anterior es totalmente consecuente con el peso molecular esperado de los productos de PCR recursivo: 84, 72, 69, 62, 55, 80, y 75 pares de bases para los carriles 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente, siguiendo estas bandas el patrón esperado, por lo que es posible deducir que el producto de PCR obtenido corresponde a lo deseado. Sin embargo, se observa que en la totalidad de las reacciones de PCR se obtuvieron productos inespecíficos de mayor tamaño, y en la síntesis de PCL3-12 y PCL3-34 además se obtuvieron productos inespecíficos de menor tamaño. Una manera de evitar estos productos no deseados hubiese sido aumentar la estrictez de la reacción utilizando formamida, ya que este compuesto forma puentes de hidrógeno con el ssDNA y desestabiliza la formación de híbridos poco favorecidos [57]. Otra forma de disminuir productos inespecíficos en esta PCR hubiese sido disminuir la cantidad de ciclos, aunque es posible que esta última medida hubiese disminuido también la cantidad de producto deseado.

Luego de la electroforesis para la visualización, se realizó una segunda electroforesis de iguales condiciones con todo el volumen de los productos de PCR para la purificación desde gel utilizando el GeneJET Gel Extraction Kit, según el protocolo especificado por el proveedor [58].

Posteriormente, se realizó un OE-PCR con los productos de PCR recursivo, generando en la primera etapa una hibridación entre PCLX-12 y PCX-34 y la elongación del híbrido entre ellos, y en la segunda, una amplificación de este producto, que corresponde a PCLX, utilizando como partidores los oligonucleótidos PCLX-1 y PCLX-4.

La primera reacción se llevó a cabo utilizando la enzima KOD Hotstart DNA Polymerase, mediante una denaturación inicial de 2 minutos a 94°C y 15 ciclos con una denaturación de 15 segundos a 94°C, *annealing* a 43°C por 35 segundos y extensión a 72°C por 5 segundos. La formulación del cóctel se muestra en el Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y *Gibson Assembly*.

La segunda reacción se llevó a cabo utilizando la misma enzima, con un programa que tiene una denaturación inicial de 2 minutos a 94°C y luego 30 ciclos de denaturación por 15 segundos a 94°C, *annealing* a 70°C por 35 segundos y extensión a 72°C por 5 segundos; la formulación del cóctel también se muestra en el Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y *Gibson Assembly*. Los resultados de esta reacción se visualizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 minutos a 80V (Figura 24).

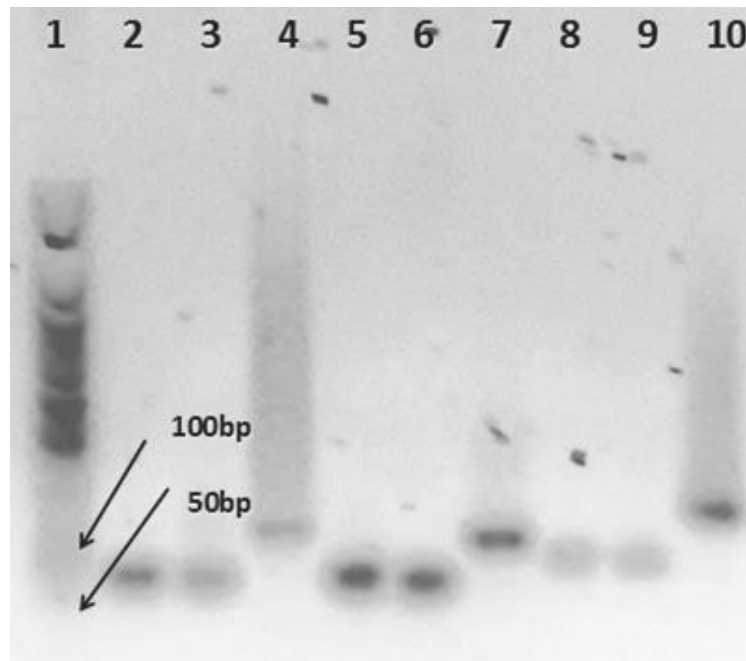


Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa para visualización de los productos de OE-PCR. Las muestras en orden según carriles son como sigue: 1: *50bp ladder*; 2: PCL2-12; 3: PCL2-34; 4: PCL2; 5: PCL3-12; 6: PCL3-34; 7: PCL3; 8: PCL4-12; 9: PCL4-34; 10: PCL4.

Es importante notar que se tiene como control de peso, además del *ladder*, los productos del PCR recursivo en los carriles 2, 3, 5, 6, 8 y 9, y se evidencia claramente su menor peso respecto a los productos de OE-PCR. Esto es consecuente con el hecho de que las bandas 4, 7 y 10 tienen un peso mayor a los 50 pb.

Se observa que el orden creciente de peso de las bandas predominantes de los últimos carriles mencionados es 7, 4 y 10, lo cual era de esperarse si el OE-PCR entregase resultados positivos, ya que, según el diseño, los fragmentos PCL3, PCL2 y PCL4 tienen un largo de 99, 120 y 135 pares de bases. De esto se concluye que el programa de PCR y la formulación de sus cócteles fueron diseñados de tal manera que entregaron los amplicones deseados, aunque con un importante grado de amplificaciones inespecíficas no deseadas.

Respecto a esto último, se observa claramente que las reacciones para la obtención de los fragmentos PCL, especialmente PCL2 y PCL4, generaron una importante pérdida de eficiencia por cuanto gran cantidad de los nucleótidos añadidos y de la polimerasa empleada fueron utilizados para la polimerización de productos no deseados de mayor tamaño; se atribuye esta pérdida de eficiencia y especificidad de amplificación al tiempo de extensión utilizado en los ciclos tanto de la reacción de elongación como en la de amplificación, ya que el proveedor de la enzima sugiere un tiempo de extensión de 10 segundos por cada 1 kb en el caso de fragmentos de menos de 500 pb, lo cual, para fragmentos que rodean los 100 pb como es el caso, entregaría tiempos de extensión cercanos a 1 segundo, por lo que los 4 segundos restantes durante la elongación de cada ciclo no eran necesarios para la obtención del producto deseado, y más aun, si no hubiesen sido considerados durante el diseño del programa, probablemente hubiesen generado productos de PCR mucho más limpios, es decir, con una mayor eficiencia.

Otro motivo fundamental que muy probablemente afectó la especificidad y eficacia de la reacción de elongación en OE-PCR es la temperatura de *annealing* utilizada en esta PCR: los partidores en la etapa de elongación son los mismos fragmentos blanco, con largos que fluctúan entre 55 y 80 pb, por lo que las temperaturas de *melting* son de entre 87,8 y 96,5°C [59]. Es claro que no es posible realizar un *annealing* a estas temperaturas debido a que activa la DNA polimerasa antes de que se alcance el nivel de denaturación necesario. Dado esto, se realizó el *annealing* de cada ciclo a 70°C, lo cual consecuentemente generó una cantidad insuficiente de DNA denaturado y rehibridado, disminuyendo la cantidad de copias de DNA de largo final deseado. Este problema es conocido previamente al diseño de los programas de PCR y es parcialmente afrontado al realizar la segunda etapa (amplificación) del OE-PCR, pero no fue posible solucionarlo directamente, ya que la técnica lo implica.

Es necesario mencionar el OE-PCR se intentó realizar también utilizando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase y las recetas y programas sugeridos por el proveedor [42], pero no se obtuvieron resultados útiles, lo cual se atribuye básicamente a la falta de actividad *hotstart* que sí posee KOD; esta actividad evitaría la actividad polimerasa de la enzima antes de alcanzar el grado de denaturación necesario para tener una alta especificidad en el *annealing*.

Luego de la electroforesis para visualización, se realizó una segunda electroforesis en agarosa al 2% sólo con las muestras PCL2, PCL3 y PCL4, por 40 minutos a 80 V para realizar purificación desde gel. La purificación se realizó utilizando el GeneJET Gel Extraction Kit, según el protocolo especificado por el proveedor [58].

Para la inserción de fragmentos en el vector de clonamiento pBS, el primer paso fue linealizarlo mediante una digestión con la enzima de restricción EcoRV utilizando el mix que se especifica en el Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y *Gibson Assembly*. Se incubó el mix a 37°C por 1 hora y luego se aplicó un shock térmico para inactivación enzimática a 80°C por 20 minutos. El producto de digestión se hizo migrar en un gel de agarosa al 1% a 85 V por 60 minutos (Figura 25).

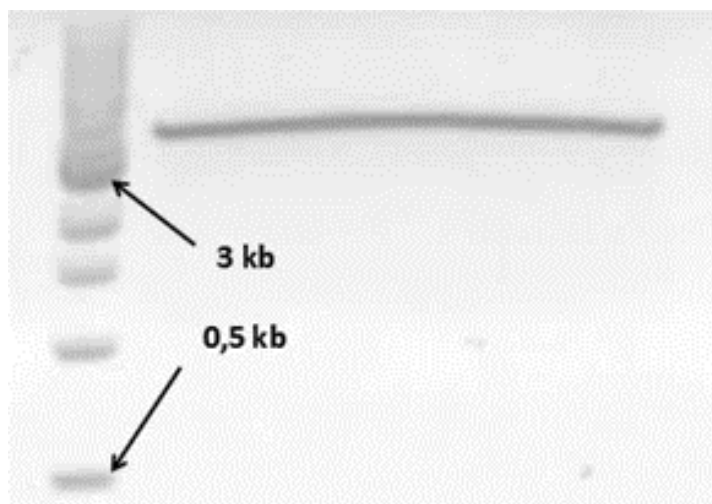


Figura 25: Electroforesis en gel de agarosa para purificación de pBS digerido con EcoRV. El carril izquierdo muestra 1 kb DNA ladder; el carril derecho posee la totalidad de la muestra para purificación.

Se observa de la imagen anterior que la banda obtenida a partir de la digestión se encuentra por sobre los 3000 pb, mientras que se esperaba un producto de 2,8 kb [45]; es posible observar también que las bandas, tanto del marcador de peso molecular como la de la muestra, no se encuentran rectas, posiblemente debido a deformaciones observadas en el gel producidas durante la electroforesis. Es por lo anterior que se concluye que la banda a purificar se encuentra más arriba de lo esperado, pero corresponde a la digestión de pBS, ya que es el único plasmidio presente y el patrón de digestión corresponde al de una digestión en un solo sitio de corte.

La banda mostrada fue cortada y purificada desde gel utilizando también el GeneJET Gel Extraction Kit, según el protocolo especificado por el proveedor [58].

Lo siguiente corresponde a la ligación de los fragmentos PCL en el vector purificado, lo cual se realizó con la enzima T4 ligasa, con la receta especificada en el Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y *Gibson Assembly*. El mix de ligación se incubó a 16°C *overnight* y posteriormente se continuó con el procedimiento de transformación de *E. coli* Top10 electrocompetente.

Para la inserción de los fragmentos PCL en el vector de transformación, fue necesario, tal como se muestra en la Figura 22, linealizar el plasmidio pET22b(+), abriéndolo justo al término de la secuencia codificante para EGFP y al inicio de la de SP-Ag43, utilizando partidores específicos, cuya secuencia se muestra en el Anexo D – Partidores para la síntesis e inserción de fragmentos PCL en el vector de expresión. Esta linealización considera en su diseño original una PCR con la receta que se muestran en el Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y *Gibson Assembly*, con una denaturación inicial de 2 minutos a 94°C y 30 ciclos con denaturación a 94°C por 15 segundos, *annealing* a 62,5°C por 10 segundos y extensión a 72°C por 194 segundos.

Los resultados de esta PCR no fueron satisfactorios por cuanto en la electroforesis posterior no se revelaron bandas del peso molecular esperado (~7,8 kb). Dado esto, se comenzó un proceso de varios PCR exploratorios para determinar las condiciones reales distintas de las de diseño bajo las cuales los partidores hibridan y la polimerasa amplifica correctamente el DNA blanco. En la siguiente tabla se resumen los distintos PCR realizados para determinar las condiciones de amplificación deseada.

Tabla 4: Resumen de PCR exploratorios para la amplificación y purificación del vector backbone pET22b(+).

| N° | MgCl ₂ | VARIACIÓN | BETAÍNA | DMSO | ENZIMA | BUFFER | HOTSTART | TOUCHDOWN | RESULTADO |
|----|-------------------|-------------|---------|------|--------|--------|----------|------------|--------------------|
| 1 | 1,5 mM | - | - | - | KOD | HSB | ✓ | - | Negativo |
| 2 | 1,5 mM | - | - | - | X7 | HF | - | ✓ | Débil |
| 3 | 1,5 mM | - | 0,8 M | - | X7 | HF | - | - | Negativo |
| 4 | 1,5 mM | - | 1,5 M | - | X7 | HF | - | - | Negativo |
| 5 | 1,5 mM | - | 0,8M | - | X7 | HF | - | - | Positivo, 15 µL |
| 6 | 2,5 mM | - | - | - | X7 | HF | - | - | Negativo |
| 7 | 1,5 mM | - | 0,8M | - | X7 | HF | - | - | Negativo |
| 9 | 1,5 mM | - | - | - | X7 | GC | - | +3°C/ciclo | Negativo |
| 10 | 2,5 mM | - | - | - | X7 | GC | - | +3°C/ciclo | Negativo |
| 11 | 1,5 mM | X2 dNTP | - | - | X7 | GC | - | +3°C/ciclo | Negativo |
| 12 | 2,5 mM | X2 dNTP | - | - | X7 | GC | - | +3°C/ciclo | Negativo |
| 13 | 2,5 mM | - | - | 5% | X7 | HF | - | +3°C/ciclo | Negativo |
| 14 | 2,5 mM | - | - | 8% | X7 | HF | - | +3°C/ciclo | Negativo |
| 15 | 2,5 mM | - | - | 5% | X7 | HF | ✓ | +3°C/ciclo | Negativo |
| 16 | 2,5 mM | - | - | 8% | X7 | HF | ✓ | +3°C/ciclo | Negativo |
| 17 | 2,5 mM | X3 templado | - | 5% | X7 | HF | ✓ | +3°C/ciclo | Positivo, 15 µL |
| 18 | 2,5 mM | X3 templado | - | 5% | X7 | HF | ✓ | +3°C/ciclo | Negativo |

Como se muestra en la Tabla 4, en el proceso exploratorio se variaron elementos como concentración de dNTP's, templado, betaína y DMSO. Además, se probó con dos DNA polimerasas distintas y sus respectivos *buffers*, aplicación de *hotstart* previo se a la denaturación inicial, y aplicación de *touchdown* sobre la temperatura de annealing. Se observa que en la iteración N°5 el resultado fue positivo, pero en volumen de 15 µL, y a momento de reproducir el procedimiento en un mayor volumen (iteración N°7) para recuperar el producto deseado desde gel, la PCR no entregó los mismos resultados positivos; lo mismo ocurrió con las iteraciones 17 y 18, donde lo único que tuvieron en común con los intentos 5 y 7 fue la enzima y el *buffer*, lo cual indica que la obtención de resultados positivos no es reproducible. Lo anterior se confirmó realizando electroforesis en agarosa al 2% de los *stocks* de partidores de 5 y 100 µM, la cual reveló que el partidor utilizado para amplificar el plasmidio en el sentido *forward* se encontraba degradado casi en su totalidad (Figura 50).

Se diseñó un nuevo partidor idéntico al degradado, pero con una guanina más en el extremo 3' para continuar con los procedimientos de amplificación de PCR. La estrategia consistió esta vez en amplificar por segmentos las partes que van unidas por *Gibson Assembly* a los fragmentos PCL, de manera de aumentar el rendimiento y disminuir el riesgo de errores al intentar amplificar fragmentos por sobre 7 kb, que era el caso anterior. Es así que la metodología fue modificada para amplificar por una parte el fragmento SP-Ag43 con homología hacia el *vector backbone*, y por otra parte el fragmento EGFP-TU también con homología hacia el plasmidio.

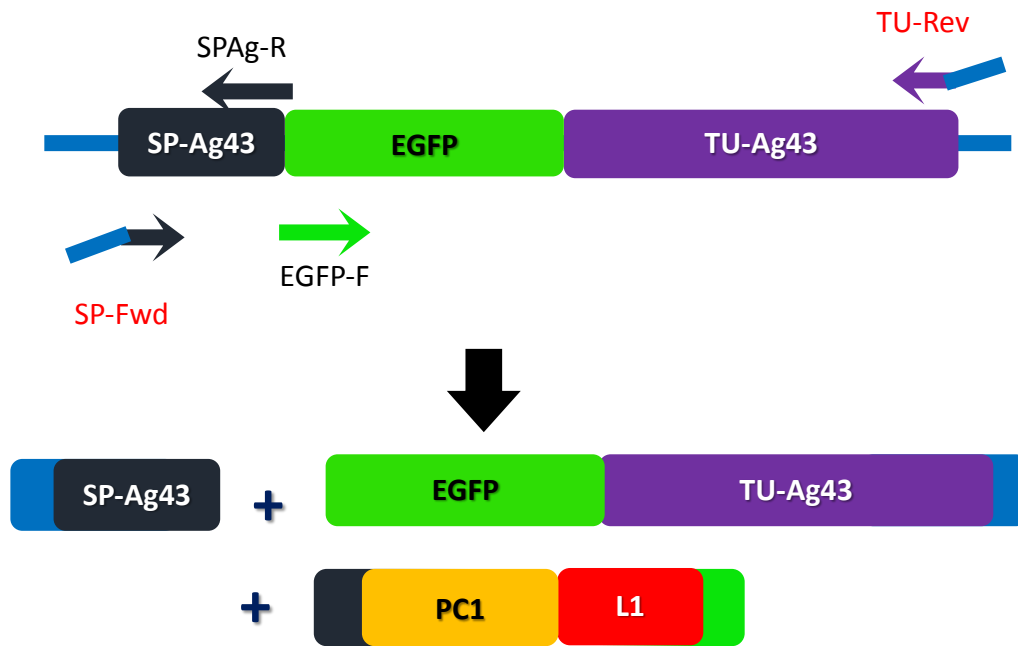


Figura 26: Amplificación por partes de los fragmentos que van unidos por homología a los fragmentos PCL. En azul se muestran las zonas de homología de los fragmentos a amplificar con el *vector backbone* para una posterior ligación por *Gibson Assembly*. Los partidores con texto en rojo fueron diseñados por Lagos (2014) en un trabajo anterior y gentilmente proporcionados por su autor. Elaboración propia.

Luego de determinar este nuevo diseño, se realizaron PCR con los partidores indicados en la Figura 26 para amplificar los fragmentos SP-Ag43 y EGFP-TU. La composición de cada una de las reacciones se detalla en el Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y *Gibson Assembly*.

En el caso de la amplificación de SP-Ag43 se utilizó la enzima X7 DNA Polymerase con una denaturación inicial de 10 minutos a 98°C que permitió realizar *hotstart*, y posteriormente 35 ciclos con una denaturación por 10 segundos a 98°C, *annealing* a 54,5°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 10 segundos. Para la amplificación de EGFP-TU se utilizó la misma enzima, denaturación inicial y cantidad de ciclos, pero con un *annealing* a 60°C por 20 segundos y una extensión a 72°C por 50 segundos. Los resultados de ambas PCR se visualizaron en geles de agarosa mostrados en la Figura 27.

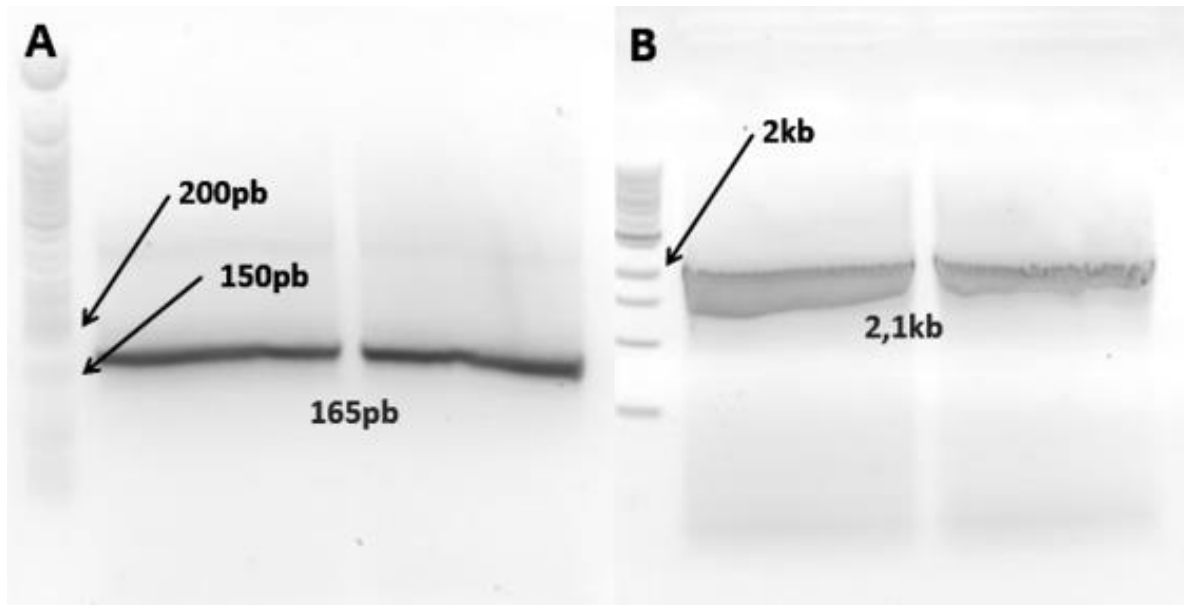


Figura 27: Electroforesis en gel de agarosa para la purificación de amplicones (60 minutos a 80V). En amarillo se muestra el largo esperado del amplicón comparado con el obtenido, y en blanco se muestran las bandas de peso molecular del *ladder*. A: gel 2% para purificación del amplicón SP-Ag43. B: gel 1% para purificación del amplicón EGFP-TU.

Como se aprecia en la Figura 27, los amplicones obtenidos corresponden según su peso molecular a lo esperado según el diseño anteriormente descrito, por lo que se procedió a su purificación desde gel con *E.Z.N.A. Gel Extraction Kit* de OMEGA bio-tek, según el procedimiento proporcionado por el proveedor [60].

Por otra parte, fue necesario obtener el *vector backbone* para la ligación de SP-Ag43, EGFP-TU y las variantes PCL dentro de un plasmidio, lo cual se realizó mediante la extracción de DNA plasmidial desde un cultivo saturado de *E. coli* Top10 con el plasmidio pET22b(+) nativo. El DNA plasmidial fue posteriormente digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *MscI* para la obtención de extremos complementarios a las colas de SP-Ag43 y EGFP-TU, según el procedimiento de Lagos. La digestión se llevó a cabo a 37°C por una hora y luego se realizó una inactivación de las enzimas mediante incubación a 80°C por 20 minutos. La receta de doble digestión se muestra en el Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y *Gibson Assembly*.

El mix de digestión fue cargado en un gel de agarosa y se rescató la banda correspondiente al fragmento deseado (~5,4 kb), para luego ser purificada utilizando el kit OMEGA bio-tek.

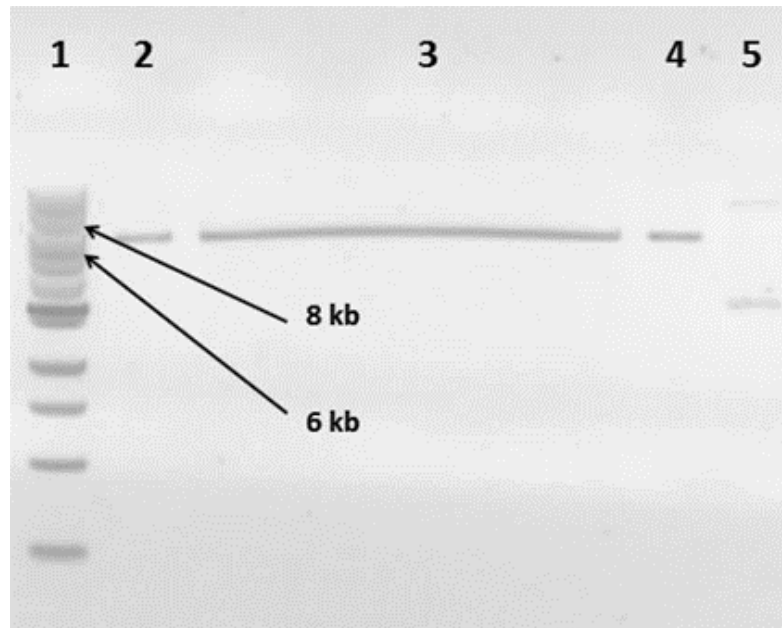


Figura 28: Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 65 minutos a 80V para la purificación de la doble digestión de pET22b(+) nativo. Carril 1: 1 kb *ladder*; carril 2: pET22b(+) digerido con *NdeI*; carril 3: pET22b(+) digerido con *NdeI* y *MscI* (doble digestión); carril 4: pET22b(+) digerido con *MscI*; carril 5: pET22b(+) sin digerir.

Analizando la Figura 28, se observa que los carriles 2, 3 y 4 presentan una única banda nítida; en particular, este resultado en los carriles 2 y 4 permite deducir que la digestión del plasmidio circular con cada una de las enzimas de restricción por separado fue exitosa. En el carril 5 se muestra una banda nítida por debajo de la que se encuentra en los carriles anteriores, y una banda de menor brillo arriba de los mismos; esto corresponde exactamente a lo esperado para un vector no digerido, debido a que la banda superior representa el vector circular cerrado, que posee mayor dificultad para migrar que el vector linealizado, y la banda inferior correspondería al vector circular superenrollado, con mayor facilidad para migrar que el vector lineal.

El fragmento que flanquean los sitios de corte de las enzimas *NdeI* y *MscI* es de 58 pares de bases, por lo que era de esperar que el fragmento de mayor tamaño en la doble digestión (~5,43 kb) se encontrase a la misma altura en el gel que los plasmidios digeridos con sólo una enzima (carriles 2 y 4; ~5,49 kb) dada la mínima diferencia de tamaño y la resolución que permite la agarosa al 0,7%; además, se considera esperable también que la banda correspondiente a los 58 pares de bases restantes no sea posible de observar, ya que es prácticamente despreciable en cuanto a proporción másica, en esta escala de resolución, respecto al fragmento de mayor tamaño.

De manera general, en ninguno de los carriles con DNA digerido se observa un peso que se corresponda con el esperado, cercano a 5,4 kb, apreciándose bandas que varían entre los 6 y 8 kb; esto es relativamente común cuando se intenta separar ácidos nucleicos de alto peso molecular, dado que la migración a través del gel para muestras de varios kilobases no sigue la misma tasa que la de las moléculas marcadoras del *ladder*.

Posteriormente, y ya contando con cuatro fragmentos PCL, además de SP y EGFP-TU, se realizaron ligaciones en serie mediante el método de *Gibson Assembly*: primero se ligó cada fragmento PCL con el marco abierto de SP-Ag43; luego, en una segunda etapa, los productos de las reacciones anteriores se ligaron con el fragmento EGFP-TU; finalmente, los productos de la segunda etapa se ligaron con el vector backbone para circularizar el vector modificado para ser utilizado en una transformación bacteriana. La preparación del mix para ligación por el método de *Gibson Assembly* se detalla en el Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y *Gibson Assembly*. Un diagrama de lo anterior se muestra en la Figura 29.

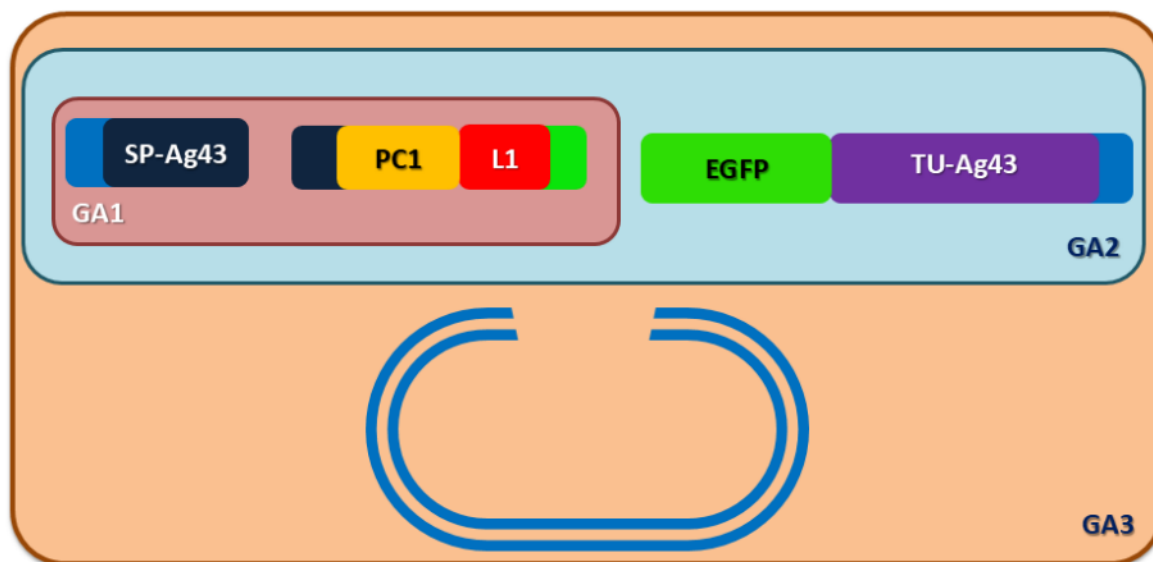


Figura 29: Diagrama que ilustra los procedimientos de *Gibson Assembly* sucesivos. EL primero (GA1) une la secuencia del péptido señal con la de PCL; el segundo (GA2) une GA1 con el fragmento EGFP-TU-Ag43; el tercero une GA2 con el *vector backbone*. Es necesario hacer notar que PCL tiene homología para unirse por *Gibson Assembly* con SP-Ag43 y con EGFP; además, SP-Ag43 y TU-Ag43 tienen homología con el vector backbone para ser incorporados en un plasmidio y recircularizarlo. Elaboración propia.

El primer *Gibson Assembly*, consistente en ligar SP-Ag43 con cada fragmento PCL, se realizó agregando cantidades equimolares de cada fragmento en una alícuota del *master mix* 2X, sumando en total entre 1,03 y 1,28 picomoles de oligonucleótidos. Se incubaron las reacciones a 52,7°C por 30 minutos, y luego se utilizó el volumen completo de cada una de las cuatro reacciones como templado para una amplificación por PCR para aumentar el número de copias de los fragmentos SP-PCL, utilizando los partidores SP-Fwd diseñado por Lagos y PCL1-4, PCL2-4, PCL3-4 y PCL4-4 dependiendo de la variante de PCL utilizada. La PCR se realizó usando Phusion HF DNA Polymerase, con *hotstart* durante los 10 minutos de denaturación inicial a 98°C, y 35 ciclos con denaturación de 10 segundos a 98°C, *annealing* a 70°C por 20 segundos y elongación a 72°C por 10 segundos; el cóctel para esta reacción se detalla en el Anexo 8.6. El producto de PCR se hizo migrar en una electroforesis que se muestra en la Figura 30.

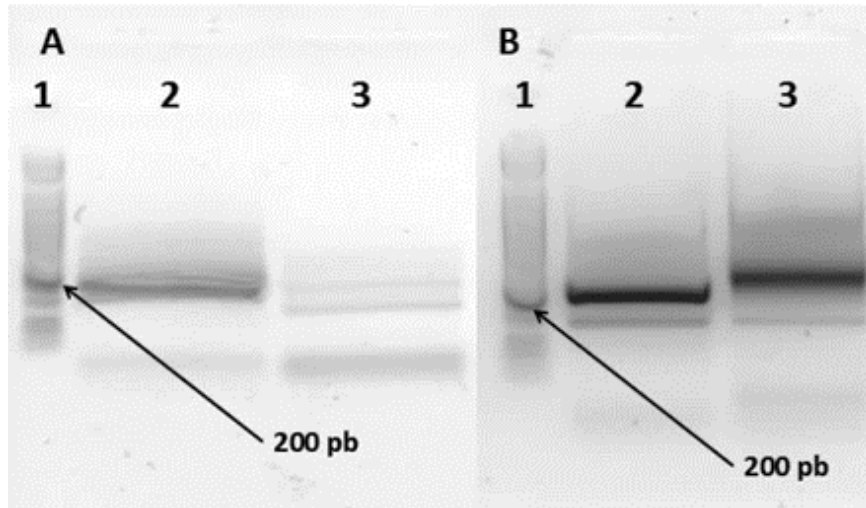


Figura 30: Electroforesis en gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 85 V. En A las muestras son como sigue: 1: 50bp *ladder*; 2: PCL1-SPAg43; 3: PCL2-SPAg43. En B, las muestras son como sigue: 1: PCL3-SPAg43; 3: PCL4-SPAg43.

En la Figura 30 es posible observar que en el gel B, los carriles 2 y 3 poseen cada uno una banda brillante y nítida, que además se encuentra ubicada levemente por sobre a banda de 200 pb del *ladder*, lo cual es concordante con los tamaños esperados (262 y 298 pb, respectivamente). Respecto al gel A, la banda del carril 2 también es marcada y también se ubica cercana a la posición esperada 200 pb, aunque es algo irregular, lo cual pudo haberse debido a la presencia de restos de gel en el hueco del carril; el carril 3 muestra dos bandas muy débiles a la altura esperada, por lo que este producto de *Gibson Assembly* no pudo ser amplificado y rescatado para posteriores procedimientos.

En todos los casos se observan amplificaciones inespecíficas, lo cual es esperable debido a la posible ligación no deseada de oligonucleótidos, que sirvieron como templado para la PCR. Este problema fue solucionado al momento de recortar la banda desde el gel y purificarla con el kit OMEGA bio-tek.

El segundo *Gibson Assembly* involucró la unión de las tres purificaciones anteriormente especificadas, cada una con el fragmento TU-EGFP purificado desde el gel de la Figura 27 (B). La cantidad total de oligonucleótidos en este set de ligación varió entre 0,21 y 0,25 picomoles totales, que fueron colocados en alícuotas de *master mix* e incubados a 53,5°C por 30 minutos. Nuevamente, el producto de esta reacción se utilizó en su totalidad como templado para su amplificación mediante PCR con el uso de los partidores TU-Rev y SP-Fwd y la enzima Phusion HF DNA Polymerase. El programa poseyó *hotstart* en los 10 minutos de denaturación inicial a 98°C, y 35 ciclos con denaturaciones de 10 segundos a 98°C, annealing a 62°C por 20 segundos y elongación por 50 segundos a 72°C. El cóctel se preparó de manera similar al de la PCR cuyos resultados se muestran en la Figura 30. Los resultados de la amplificación se muestran a continuación en la Figura 31.

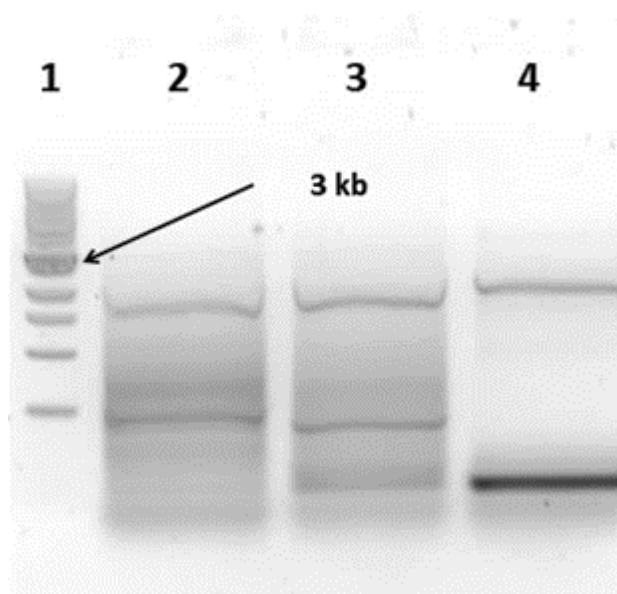


Figura 31: Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 45 minutos a 85V. Carril 1: 1kb *ladder*; 2: TU-EGFP-PCL1-SPAg43; 3: TU-EGFP-PCL3-SPAg43; 4: TU-EGFP-PCL4-SPAg43.

Se aprecia en la Figura 31 que todos los productos de PCR presentaron amplificaciones inespecíficas de bajo peso molecular. Es altamente probable que esta inespecificidad de la actividad polimerasa haya sido causada por la baja temperatura de *annealing* utilizada (62°C) en comparación con las temperaturas de *melting* de los partidores (77,3°C para SP-Fwd y 74,8°C para TU-Rev), que son altas porque en su diseño original poseían colas de homología para *Gibson Assembly* pero que para esta etapa, hibridan completamente con el templado. A pesar de esto, logran apreciarse bandas cercanas a la de 2 kb del *ladder*, que corresponderían al amplicón esperado (entre 2,4 y 2,5 kb), por lo que éstas fueron rescatadas del gel y purificadas con el kit OMEGA bio-tek.

El tercer *Gibson Assembly* correspondió a ligar el producto amplificado del GA2 con el *vector backbone* obtenido por doble digestión (Figura 28). El producto de GA3 se utilizó directamente para la transformación bacteriana mediante electroporación de células electrocompetentes de la cepa *Escherichia coli* BL21(DE3). Es necesario hacer notar que se sospechaba una baja eficiencia de ligación en el GA3, ya que la cantidad de oligonucleótidos presente en cada reacción varió entre 0,039 y 0,058 picomoles, lo cual está muy cerca del mínimo sugerido [47].

Se esperaba que las transformantes p10, p11, p12 y p13 fuesen las que presenten mayor actividad secuestrante de iones arsenicales; luego de ellas, y debido al efecto de la gran cantidad de distintos grupos de la EGFP que pudieran quedar expuestos al medio extracelular, era de esperar que las transformantes p06, p07, p08 y p09 presenten una actividad quelante muy similar pero levemente superior a sus símiles con EGFP (p10 a p13). Las transformantes p04 y p05 deberían haber presentado una adsorción importantemente menor o nula, respecto a sus símiles con el fragmento PC expuesto hacia el exterior de la célula. Las transformantes p02 y p03 tampoco debiesen haber

presentado adsorción, y si así hubiera sido, debería haber sido incluso inferior a la de las transformantes p04 y p05 debido a que éstas sí contienen EGFP. Por último, se esperaba que la transformante de la cual por diseño provenían todas las demás, p01 (SP-EGFP-TU) hubiese sido la que poseyera menor o nula adsorción, debido a que no presenta exposición de estructuras proteicas hacia el exterior de la célula.

Dentro de las transformantes p10, p11, p12 y p13, era de esperar que aquéllas que en el diseño poseen un *spacer* más largo, poseyeran una mayor capacidad quelante debido a la mayor flexibilidad y eventual disminución de impedimento estérico para la quelación; respecto a la relación entre la biosorción y el largo del péptido PC, no es posible determinar un resultado esperado debido a que la literatura no sugiere una afinidad cualitativamente comparativa entre la capacidad quelante de iones arseniato ni arsenito con el largo de la PC.

5.3. Transformación bacteriana y *screening* de *Escherichia coli*

La primera etapa de transformación bacteriana se realizó utilizando células electrocompetentes de *Escherichia coli* cepa Top10. La preparación de estas células competentes se llevó a cabo según el procedimiento especificado en el Anexo G – Protocolo para la preparación de células de *Escherichia coli* electrocompetentes.

La transformación de las alícuotas de células electrocompetentes comienza agregando 5 μ L del mix de ligación (inserto + pBS digerido) e incubando la mezcla por 5 minutos en hielo. Posteriormente se trasvasió entre las placas metálicas de una cubeta y se colocó en el electroporador, aplicando un pulso de 2200 V; luego, la cubeta se enjuagó con caldo LB estéril y se vació, dejando el medio mezclado con las células electroporadas en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, el cual se llevó a incubación a 37°C sin agitación.

Los cultivos de células electroporadas se sembraron en placas de LB agar con 0,5 mM de IPTG para la inducción del operón del vector, 100 μ g/mL de ampicilina para asegurar que las colonias que crecieran fueran transformantes, y 80 μ g/mL de X-gal para evidenciar la actividad de la β -galactosidasa y poder realizar *blue-white selection* y así determinar cuáles de las transformantes eran recombinantes.

Las placas sembradas con las células electroporadas se muestran en la Figura 65 del Anexo H – imágenes de *screening* de transformación. Se sembraron algunas placas con 50 μ L y otras con 100 μ L del cultivo electroporado, con el fin de tener un mejor espectro de *screening* en cuanto a la densidad de unidades formadoras de colonias. Las colonias que se muestran encerradas y numeradas en la Figura 65 corresponden a las que se consideraron recombinantes, según su color blanco o azul más pálido.

Posteriormente, se picaron las colonias seleccionadas, resuspendiendo la picadura en agua destilada estéril y sometiendo la suspensión a un shock térmico a 100°C por 10 minutos para luego tomar alícuotas de la suspensión tratada y usarlas como templado para una PCR. Se utilizó la enzima Go Taq DNA Polymerase sometiendo el cóctel a una

denaturación inicial a 95°C por 1 minuto y luego a 25 ciclos de denaturación a 95°C por 30 segundos, *annealing* a 70°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 6 segundos; adicionalmente en esta reacción se agregó una etapa de extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de esta PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5% por 70 minutos a 100V. El detalle del cóctel de PCR se muestra en el Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y *Gibson Assembly*. Los resultados se presentan en la Figura 32.

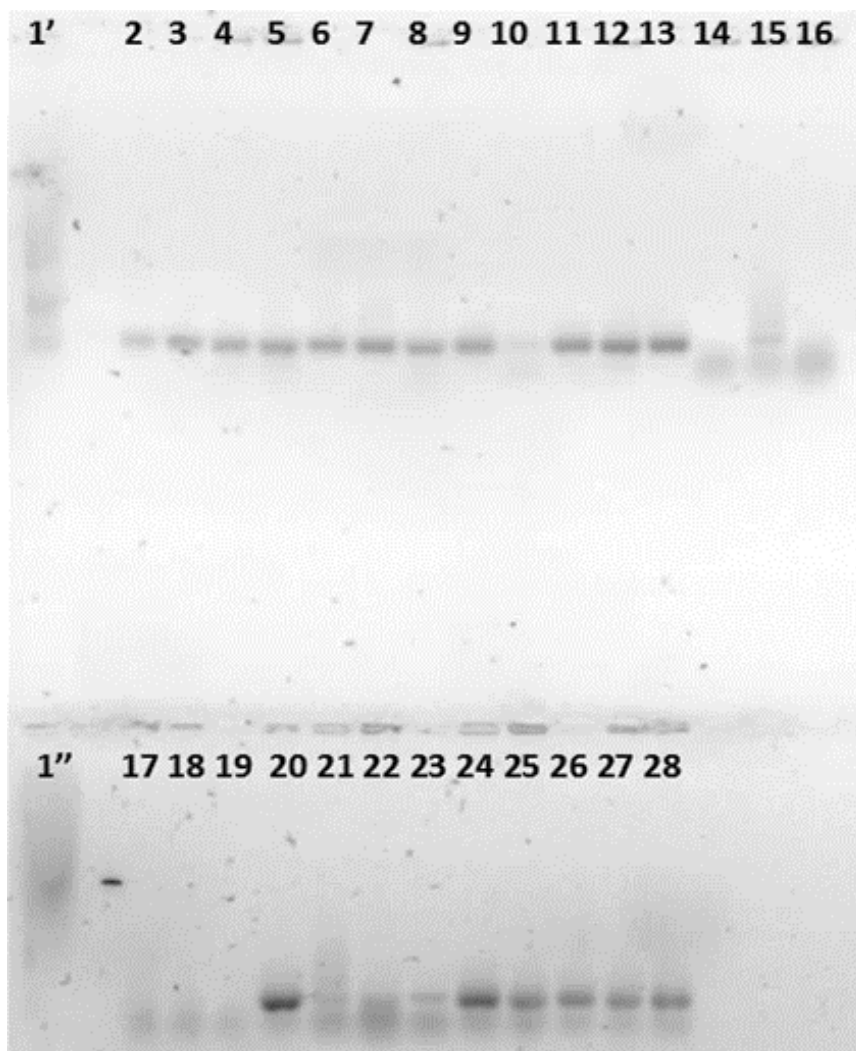


Figura 32: Electroforesis en gel de agarosa para visualización del producto de la PCR de colonias. Los carriles 1' y 1'' contienen 50bp DNA ladder. Los demás carriles contienen las muestras según como se menciona a continuación: 2: PCL1-A1; 3: PCL1-B1; 4: PCL1-B2; 5: PCL1-C1; 6: PCL1-C2; 7: PCL1-C3; 8: PCL2-D1; 9: PCL2-D2; 10: PCL2-E1; 11: PCL2-F1; 12: PCL2-F2; 13: PCL2-F3; 14: PCL3-G1; 15: PCL3-G2; 16: PCL3-G3; 17: PCL3-H1; 18: PCL3-H2; 19: PCL3-H3; 20: PCL3-I1; 21: PCL3-I2; 22: PCL3-J1; 23: PCL3-K1; 24: PCL4-L1; 25: PCL4-L2; 26: PCL4-M1; 27: PCL4-M2; 28: PCL4-M3.

Primero que todo, es necesario hacer notar que a partir de lo que se muestra en la Figura 65, existen colonias no sólo de color azul y blanco, sino que también crecieron colonias de distintos grados intermedios de coloración entre tales colores. Se presume que este gradiente de colores es debido a que la subunidad α de la β -galactosidasa no queda completamente truncada, lo cual genera que la actividad galactosidasa de la enzima no

sea totalmente eliminada, probablemente porque que los insertos y la zona en la que se incorporan al plasmidio (sitio de restricción de EcoRV) no permiten que esta proteína sufra una modificación en su estructura primaria de magnitud suficiente para afectar su sitio activo y/o su conformación tridimensional general.

Es posible notar que todas las transformantes presentaron amplificación por PCR de colonia utilizando partidores para flanquear el inserto correspondiente, a excepción de las transformantes PCL2-E2, que debía incorporar el inserto PCL2, y PCL3-G1, PCL3-G3, PCL3-H1, PCL3-H2 y PCL3-H3, que debían incorporar PCL3 como inserto.

Comparando los resultados de la electroforesis con la del *screening* en placas, es posible notar que las colonias con resultados negativos de PCR no son las de coloración más azulada (o menos blanquizca), sino que resultan ser a primera vista de un color blanco que hace suponer que la transformante es recombinante. De manera similar, tampoco se tiene que las colonias con resultados positivos de PCR sean las de un color más parecido al blanco en comparación con las demás; es más, por ejemplo, la colonia 2 de la placa C (Figura 65, Anexo 8.8) parece ser más azulada que las demás, y aun así entregó resultados positivos (transformante PCL1-C2). Se puede discutir entonces sobre qué tan determinante es el método de *blue-white selection* para la detección de transformantes recombinantes en el caso particular de insertos de largos de 135 pb o inferiores, o al menos insertos de similar naturaleza con inserción en la zona de corte de EcoRV en el MCS.

Lo anterior se confirma con la secuenciación, que revela que sólo las transformantes PCL1-B1, PCL1-B2 y PCL3-I1 son recombinantes con el inserto incorporado de manera íntegra. El resto de las colonias estaban conformadas por células que incorporaron el plasmidio recircularizado sin inserto. El resultado positivo de la PCR y electroforesis corresponde a falsos positivos, probablemente debido a la amplificación inespecífica de secuencias de similar peso al esperado pero presentes en el gDNA, que coincidentemente fueron flanqueadas por los partidores utilizados.

Las picaduras de las colonias cuya secuenciación tuvo los resultados deseados fueron resuspendidas en caldo LB con ampicilina 100 mg/mL y cultivadas *overnight* para su perpetuación.

Dado el resultado anterior, se procedió a una segunda etapa de transformación de células electrocompetentes siguiendo los mismos protocolos ya descritos, pero esta vez sólo para lograr perpetuar células que contuviesen los insertos PCL2 y PCL4.

Las células transformadas en esta segunda ocasión fueron seleccionadas por resistencia a ampicilina y coloración, como se muestra en la Figura 66 del Anexo H – imágenes de *screening* de transformación. Las colonias seleccionadas por su coloración más blanquizca y/o de color azul más pálido fueron picadas y sometidas al procedimiento de PCR de colonias anteriormente descrito.

Los resultados de esta segunda PCR de colonias se revelan a continuación al hacer migrar las muestras en un gel de agarosa al 2% por 50 minutos a 80V (Figura 33).

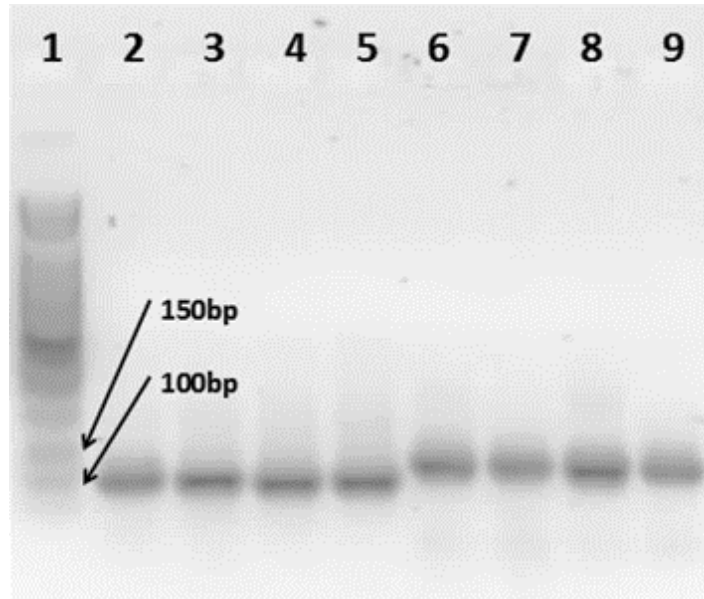


Figura 33: Electroforesis en gel de agarosa para la visualización del PCR de colonias PCL2 y PCL4. En los carriles, las muestras son como sigue: 1: 50 bp ladder; 2: Colonia 2.1 (PCL2); 3: Colonia 2.2 (PCL2); 4: Colonia 2.3 (PCL2); 5: Colonia 2.4 (PCL2); 6: Colonia 4.1 (PCL4); 7: Colonia 4.2 (PCL4); 8: Colonia 4.3 (PCL4); 9: Colonia 4.4 (PCL4).

Se observa que las colonias cuyas picaduras fueron sometidas a PCR de colonias presentaron amplicones presentes entre las bandas del marcador de 100 y 150 pares de bases; además, los amplicones en los carriles 2 a 5, que en teoría contenían el inserto PCL2, son más livianos que los de los carriles 6 a 9, lo cual es consistente con lo esperado (PCL2 es de 120 pb y PCL4 es de 135 pb). Es así que los resultados de esta electroforesis revelan que la inserción y transformación parece haber sido exitosa.

Al mirar las colonias picadas en la Figura 66, se determina que en esta ocasión la selección por color parece haber sido más precisa por cuanto la mayor parte de las colonias seleccionadas son de color blanco, y la minoría son de color azul claro; esto es consistente con las gruesas bandas que se aprecian en la Figura 33 en todos los carriles del gel.

Todas las colonias seleccionadas tuvieron un resultado positivo para el PCR de colonias, por lo que fueron enviadas a secuenciación, la cual, al contrario de lo esperado según los resultados anteriores, reveló que las muestras de DNA plasmidial no contenían ningún inserto, por lo que las bandas de la electroforesis mostrada en la Figura 33 corresponden nuevamente a falsos positivos. De esta manera es posible, considerando los problemas ya discutidos respecto a la primera PCR de colonias realizada, que el método de *blue-white selection* con X-gal en *E. coli* Top10 es por cierto un método de selección poco determinante en el caso de trabajar con insertos de 135 pares de bases o menos, ya que la coloración de las colonias que no son directamente azules parece no revelar en ningún caso la presencia de plasmidio con inserto o relinializado sin inserto.

La transformación de células para expresión del constructo se realizó sobre *Escherichia coli* BL21(DE3) utilizando como vector el producto del GA3. El procedimiento fue idéntico al descrito para la electroporación de *E. coli* Top10 con pBluescript II SK(+).

Los cultivos de células electroporadas fueron centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos y luego fueron resuspendidos en 150 µL del mismo medio en el que se encontraban, para luego sembrar esta resuspensión en placas de Petri con Agar LB y ampicilina 100 µg/mL (50 µL de cultivo en cada placa, 9 placas en total), y se incubaron por 18 horas a 37°C. Los resultados de esta siembra se muestran en la Figura 67 del Anexo H – imágenes de screening de transformación.

Las colonias seleccionadas fueron picadas para luego ser cultivadas en medio líquido con ampicilina para asegurar la incorporación de pET22b(+); de estos cultivos líquidos se extrajo 500 µL para glicerol stock y el resto se utilizó para la extracción de DNA plasmidial.

Finalmente se utilizaron tres transformantes de cada variante del diseño para realizar pruebas de PCR, amplificando distintas combinaciones de los fragmentos que en teoría fueron incorporados por el vector en la bacteria. La siguiente tabla muestra los resultados de estas PCR.

Tabla 5: Resumen de los resultados de amplificación por PCR de distintos fragmentos introducidos en el plasmidio de expresión.

| AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS POR PCR | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------|----------|-----|-------------|------|----|-----------------|
| TRANSFORMANTE | PCL-SP | EGFP-PCL | PCL | TU-EGFP-PCL | EGFP | TU | TOTAL POSITIVOS |
| p10 ₂ | ✓ | | ✓ | | | | 2 |
| p10 ₅ | ✓ | | ✓ | | | | 2 |
| p10 ₈ | ✓ | | ✓ | | | | 2 |
| p12 ₂ | | | | | | | 0 |
| p12 ₅ | | | | | | | 0 |
| p12 ₈ | ✓ | | ✓ | | | | 2 |
| p13 ₂ | | | ✓ | | | | 1 |
| p13 ₅ | ✓ | | ✓ | | ✓ | | 3 |
| p13 ₈ | ✓ | | ✓ | | ✓ | ✓ | 4 |

Dado los resultados mostrados en la Tabla 5, se consideró la secuenciación de cuatro de ellas para confirmar la ausencia o presencia del inserto de manera íntegra: p10₅, p12₈, p13₅ y p13₈. Los resultados de la secuenciación revelaron que, a pesar de que la transformación fue exitosa, el inserto no fue integrado completo en el vector.

Como se muestra en la Figura 34, en el *vector backbone* fueron integrados sólo los extremos del inserto, esto es, la parte terminal de la secuencia del péptido señal al extremo amino, y la parte inicial de la unidad de translocación al extremo carboxilo. Esto no es consistente con los resultados de PCR mostrados en la Tabla 5, ya que, a pesar de que no se integró el fragmento PCL en ninguna de las transformantes, sí se obtuvieron amplicones de peso similar al esperado. Sin embargo, esto sí se condice con los

resultados de PCR de colonias realizados a partir de transformaciones con pBS, que también entregaron falsos positivos; es posible que la amplificación bajo las condiciones de PCR favorezca la formación de híbridos entre los partidores que flanquean los fragmentos PCL, mostrando en los geles bandas nítidas y brillantes de oligonucleótidos de bajo peso molecular, similar al de los fragmentos PCL, que rápidamente permiten inducir erróneamente que la secuencia PCL sí fue exitosamente integrada en el plasmidio.

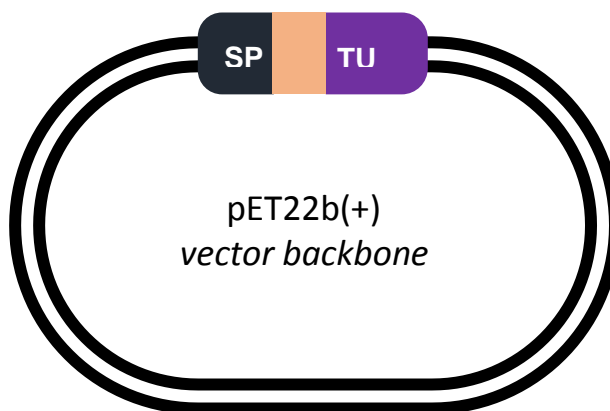


Figura 34: Diagrama de los resultados de secuenciación. La zona en color rosado representa una secuencia no determinada. Elaboración propia.

Por otro lado, a pesar de que la secuencia inicial de TU sí fue integrada en todas las transformantes, no hubo amplificación de ningún fragmento en las PCR cuyo diseño involucraba la amplificación de esa parte del marco de lectura. Los geles para visualización de estas PCR no revelaron bandas por posibles dos motivos: primero, sólo existía una hibridación, sólo el partidor que hibrida al inicio de TU lograba tener homología con el templado, ya que el otro partidor hibridaba con una secuencia que nunca fue integrada; segundo, la temperatura de *melting* del partidor homólogo al inicio de TU es de 74,8°C, por lo que la amplificación se ve termodinámicamente poco favorecida al operar el termociclador a 70°C durante el *annealing* de cada ciclo.

La correcta amplificación e incorporación de las secuencias en pET22b(+), en particular las secuencias PCL, presenta complicaciones debido a su gran contenido GC dado el alto porcentaje de residuos de glicina en la zona del *spacer*, y a la presencia de repeticiones de secuencias cortas en la zona PC debido a que el código genético sólo admite dos codones para el ácido glutámico y dos para la cisteína, impidiendo variar suficientemente las secuencias codificantes para estos péptidos.

Finalmente, se descarta la presencia de contaminantes que pudiesen hibridar indeseadamente con los extremos del *vector backbone* debido a que la ligación de las partes del inserto por *Gibson Assembly* fue un proceso dividido en etapas, ligando sólo de a dos fragmentos, y además cada ligación fue purificada recuperando la banda del gel con kits de extracción. La incorrecta incorporación del inserto al *vector backbone* de pET22b(+) se atribuye a una posible degradación del fragmento a incorporar, lo cual pudo haber generado extremos del inserto que pudieron haber sido ligados en los extremos del vector linealizado, circularizando al final un inserto truncado.

5.4. Bioproceso industrial para el abatimiento de arsénico

5.4.1. Fijación de células en matrices sólidas y adsorción de arsénico

Palmer *et al.* (2007), afirman que el factor dominante del proceso de fijación de células bacterianas a matrices sólidas se ha mantenido elusivo, y hoy se cree que hay involucrados una multitud de factores, incluyendo el acondicionamiento de tal superficie, transporte de masa, carga superficial, hidrofobicidad, rugosidad superficial y la microtopografía de la superficie [61].

El acondicionamiento de una superficie se debe a la acumulación de moléculas orgánicas e inorgánicas, como proteínas, que se adsorben en la superficie formando un film acondicionado. Estas moléculas orgánicas e inorgánicas, junto con los microorganismos, son transportados a la superficie por difusión o en algunos casos por flujo turbulento del líquido. La tasa de transporte y el grado de adsorción son igualmente importantes en este contexto. En particular, la acumulación de moléculas en la interfase sólido-líquido de superficies en contacto con alimentos, lleva a una mayor concentración de nutrientes comparado con la fase fluida. En los sistemas de procesos de alimentos, el alto nivel de nutrientes en la superficie actúa como un film acondicionado [62].

En relación con el transporte de masa convectivo, se ha reportado que en flujos turbulentos, la creación de múltiples remolinos turbulentos pequeños pueden conducir a partículas pequeñas, incluyendo bacterias, hacia las superficies y que a su vez pueden anular la barrera de la energía libre de Gibbs requerida por las bacterias para llegar a estar en contacto con la superficie [61]. Además, se ha reportado que el transporte activo mediado por la actividad de flagelos bacterianos y quimiotaxis, ha sido considerado un importante mecanismo que permite a las bacterias interactuar con una superficie [63]. Por otro lado, Pratt *et al.* (1998) demostraron que la motilidad, y no la quimiotaxis, es crítica para la formación normal de un *biofilm*, de manera que la quimiotaxis es prescindible para la formación de tal estructura; además, la motilidad es importante para la interacción inicial con la superficie y para el movimiento a lo largo de ella [64].

Una vez que las bacterias han sido transportadas a una distancia suficiente para interactuar, las fuerzas involucradas en esta adhesión inicial corresponden a fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas [61]. El siguiente paso crucial en el proceso de adhesión es la fijación irreversible de las células en la superficie, quedando las bacterias capturadas en la superficie por la producción de exopolisacáridos (EPS) y/o ligandos específicos, como pili o fimbrias, que pueden acomplejarse con la superficie [65].

Las células bacterianas generalmente tienen una carga neta negativa en su pared celular a pH neutro [66]. Pero, la magnitud de la carga varía entre especies y es influenciada probablemente por las condiciones de cultivo, su antigüedad, la fuerza iónica y pH. La carga superficial bacteriana está dada por la presencia de grupos carboxilo, fosfato y amino, tanto en forma protonada como disociada, y la carga superficial, entonces, depende del pH del medio [67]. Consecuentemente, el potencial zeta² de la célula

² El potencial zeta se calcula como la movilidad de la célula bacteriana en presencia de un campo eléctrico bajo condiciones determinadas de pH y concentración de sales [61].

bacteriana depende fuertemente de la fuerza iónica del medio en que suspende, y a mayor fuerza iónica, más iones hay disponibles para proteger, y por lo tanto, neutralizar la carga de la superficie. La carga superficial del soporte inerte al cual las bacterias pueden adherirse cumple también un importante rol en la fijación bacteriana [61].

Davies (2000) concluyó que las diferencias en la hidrofobicidad superficial de distintas bacterias es resultado de propiedades conferidas a la superficie celular por moléculas como proteínas y lípidos. Existe evidencia de que la hidrofobicidad de las células puede estar relacionada con estructuras proteicas de la superficie bacteriana [68]. El rol de los lipopolisacáridos (LPS) en la adhesión a superficies sólidas se mantiene confuso, pero la evidencia apunta a que la presencia de LPS en la superficie celular tiende a hacer a la célula más hidrofílica en su naturaleza, y que la pérdida de LPS resulta en que la célula tiene carácter superficial más hidrofóbico [61].

Respecto a la rugosidad superficial y microtopografía del sólido sorbente, Verran *et al.* (2006) concluyeron que las superficies con ralladuras y picaduras de tamaño similar a células microbianas retienen mayor número de células que las superficies con irregularidades (poros) mucho más grandes que las células microbianas [69].

Teniendo en consideración todo lo anterior, y con el fin de determinar las características físicas, químicas y fisicoquímicas de un material que retenga a las bacterias por adsorción (quimisorción o fisorción), se hace necesario conocer en detalle las características particulares de *Escherichia coli* en cuanto a la motilidad otorgada por su morfología, nivel de producción de EPS, grado de hidrofobicidad de su pared y carga superficial (potencial zeta) en las condiciones del PLS. Además, es necesario tener nociones de las propiedades físicas del PLS como viscosidad y densidad (a temperatura de operación) para conocer cómo sería el transporte de masa de especies acondicionadoras de la superficie seleccionada y de las células desde el seno del fluido hasta tal superficie.

En cuanto al fenómeno fisicoquímico de adsorción como tal, es sabido que su velocidad es controlada por las velocidades de tres procesos básicos: (1) la velocidad del movimiento del adsorbato en el film líquido en la superficie de la partícula adsorbente; (2) velocidad de difusión intrapartícula; (3) la velocidad de adsorción en la superficie del adsorbente. Usualmente el tercer proceso es muy rápido, por lo que la velocidad de adsorción será dependiente de los dos primeros procesos difusivos [70].

Gilbert *et al.* (1991) trabajaron bajo la evidencia reportada anteriormente relativa a que el ambiente, la tasa y etapa de crecimiento de bacterias en sistemas cerrados influye profundamente sobre sus mecanismos regulatorios que determinan las propiedades superficiales de las células. Estimaron la hidrofobicidad de la superficie de *Escherichia coli* ATCC 8739 a través del porcentaje de retención en la columna de octil sefarosa relativo al número eluido en una columna control de sefarosa (cromatografía de interacción hidrofóbica, *HIC*). La carga superficial se determinó a través de la movilidad en electroforesis, aplicando 60V y midiendo las distancias recorridas por células individuales bajo ese campo eléctrico [71].

A medida que los cultivos alcanzaban el estado estacionario, la hidrofobicidad de la superficie aumentó marcadamente a un valor que se mantuvo a lo largo de la fase estacionaria hasta 16 horas luego de inocular el cultivo. Simultáneamente, la negatividad superficial disminuyó. Los cambios fueron rápidos y ocurrieron dentro de las 2 primeras horas de la fase estacionaria. Luego de eso, las disminuciones en la hidrofobicidad superficial y el carácter negativo de la superficie celular continuaron a una tasa mucho menor. [71]. Lo anteriormente descrito se muestra de manera más esquemática en la Figura 35:

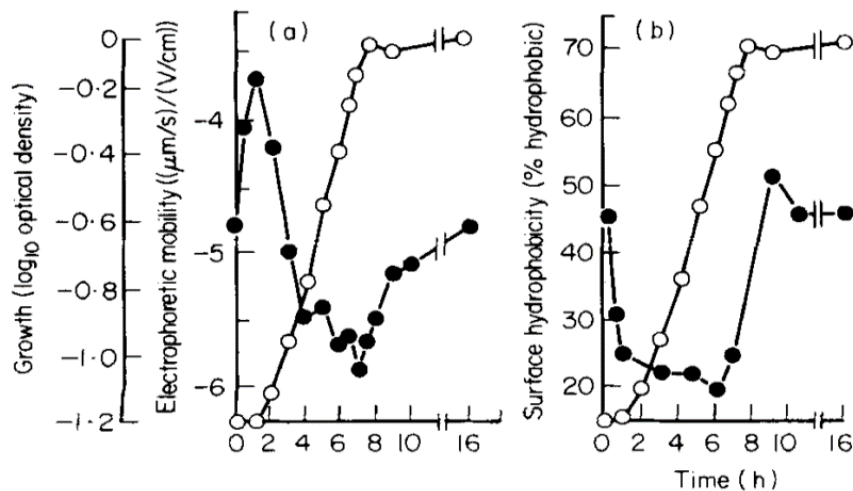


Figura 35: Variación de la motilidad electroforética (a) y de la hidrofobicidad superficial (b) respecto al tiempo de cultivo (en puntos blancos). Se observa que la movilidad disminuye al principio de la fase estacionaria y luego comienza a aumentar, mientras que la hidrofobicidad aumenta al inicio de la misma etapa y luego disminuye para mantenerse constante [71].

Se determinó que *Escherichia coli* es bastante más hidrofílica que algunas bacterias Gram-positivas, particularmente que *Staphylococcus epidermis*, bajo todas las condiciones estudiadas. Además, se corroboró que la movilidad electroforética de las células se ve afectada no sólo por el potencial de superficie, tamaño y forma celular, sino que también por la caída de voltaje, fuerza iónica, pH, temperatura y viscosidad del medio [71].

Para determinar el tipo de sólido que es adecuado para fijar estas bacterias, y considerando primero su carga superficial en el estado estacionario, es claro que se requiere de una superficie cargada positivamente para que exista una atracción electrostática entre tal adsorbente y la célula bacteriana; por otra parte, dado que la hidrofobicidad superficial es cercana al 50% en la fase estacionaria, este parámetro no es determinante por cuanto la hidrofobicidad de la superficie de la célula es similar a su hidrofiliidad.

El análisis anterior está basado en la fase estacionaria, ya que para la etapa de crecimiento exponencial, el máximo de carga superficial es durante la primera hora de cultivo (y luego hay una baja muy marcada), lo cual implica tener una densidad óptica muy baja, y se necesitarían grandes volúmenes de cultivo para obtener una cantidad de biomasa considerable; además, durante la misma etapa, la hidrofobicidad decrece pero

de manera muy sutil, por lo que tampoco es una buena alternativa considerar tiempos muy cortos de cultivo si se sabe que posteriormente tal hidrofobicidad aumentará y se mantendrá estable cerca del 50%.

En este mismo estudio, una examinación de los cultivos por microscopía electrónica mostró la proporción de células que llevan fimbrias tipo 1. Esta proporción se mantuvo relativamente constante (15-20%) durante la fase de crecimiento exponencial, pero aumentó (35-40%) en la etapa estacionaria temprana [71]. Esto refuerza la idea de que la adsorción de las células se ve favorecida de manera general si ésta se hace luego del inicio de la fase estacionaria.

Además, Lytle *et al.* (1999) estudiaron la movilidad electroforética de distintas cepas de *E. coli*, y concluyeron que las células alcanzan el punto isoeléctrico siempre por debajo de pH 4,3 [72], por lo que, bajo las condiciones de operación del proceso (pH=1,4), la carga superficial del material adsorbente no debería ser un factor verdaderamente influyente en el fenómeno de adsorción bacteriana.

Respecto al fenómeno de adsorción en general, éste se lleva a cabo en tres etapas: macrotransporte, microtransporte y sorción. El macrotransporte involucra el movimiento del adsorbato a través del agua hasta la interfase líquido-sólido por advección y difusión. El microtransporte involucra la difusión del adsorbato a través del sistema de macroporos del sólido adsorbente. Aunque la adsorción también ocurre en la superficie del sólido sorbente y los macroporos y mesoporos, la superficie de esta zona de la mayoría de los sólidos es extremadamente pequeña comparada con la superficie de los microporos, tanto así que la cantidad de materia adsorbida ahí es considerada despreciable [30].

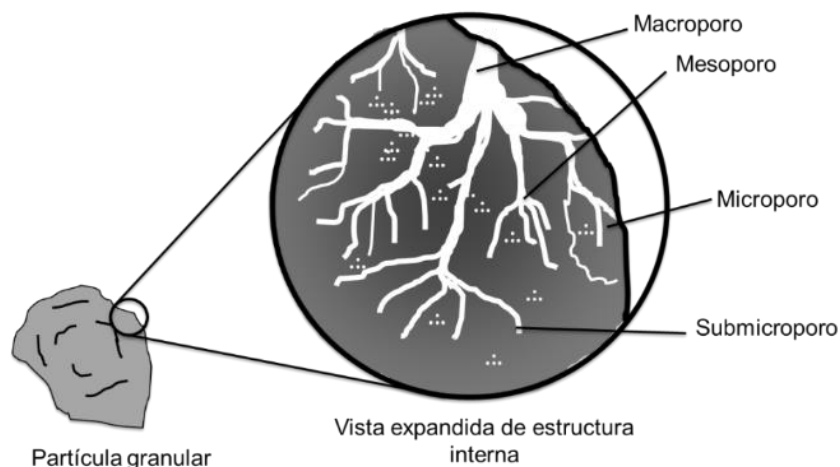


Figura 36: Sitios de adsorción macroporo, mesoporo, microporo y submicroporo en un sólido. Adaptado de Metcalf y Eddy ([30]).

Dos características importantes del sólido adsorbente son su extremadamente alta razón entre área superficial y volumen, y su afinidad preferencial por ciertos constituyentes en la fase líquida. [30] Como se mencionó anteriormente, es necesario que los poros del material tengan un tamaño similar al de una célula bacteriana para favorecer su fijación sobre el sólido (Verran *et al.*, 2006). En este caso, sería conveniente considerar

materiales particulados cuyos poros tengan un diámetro cercano y no menor a 2 μm , dado que ése es el largo promedio del bacilo *Escherichia coli* [73].

Considerando todo el análisis bibliográfico anterior, los factores que determinarán una satisfactoria adsorción de células a un sólido sorbente se ven reducidos únicamente al acondicionamiento de la superficie, el transporte de masa y el tamaño y abundancia de poros del material adsorbente.

Se han reportado en la literatura trabajos relacionados con la fijación de *Escherichia coli* en materiales particulados de bajo costo de adquisición, estabilidad química y eficiencia de retención de células adheridas.

Wang *et al.* (2014) estudiaron la cinética de adsorción y desorción de *E. coli* en su fase logarítmica de crecimiento en partículas de cuarzo de distinta granulometría y lograron obtener las isothermas de adsorción para cada caso; con esto, determinaron que mientras menor es el tamaño de partícula, mayor es la capacidad de adsorción y menores son los tiempos requeridos para alcanzar el equilibrio, siendo todos éstos menores a 60 minutos cuando la concentración inicial de células en suspensión es de 10^9 CFU/mL; el cuarzo logró alcanzar más del 95% de retención de células para el caso de las partículas más finas, y la desorción de las mismas con agua pura no supera el 3,6%, lo cual se explicaría con la presencia de sorción irreversible por la aparición de uniones específicas y reacciones químicas entre los grupos de las superficies mineral y bacteriana [70].

Wang *et al.* (2014) concluyeron que el modelo con mayores coeficientes de correlación con datos reales de la cinética de adsorción, y que, por lo tanto, el que mejor se ajusta a tal cinética de interacción *E. coli* – cuarzo, es la ecuación de velocidad de pseudo segundo orden (PSORE, *pseudo-second order rate equation*). En cuanto al equilibrio fisicoquímico de adsorción, luego de comparar los modelos de Langmuir, Freundlich, Henry y Temkin, se concluyó que la ecuación de Henry es la más apropiada para describir la isoterma de adsorción de *E. coli* en este material ($R^2 \geq 0,96$):

Ecuación 1: Isoterma de Henry

$$q_{eq} = k_H \cdot c_{eq}$$

Donde y_e es la cantidad adsorbida de bacterias en la superficie del cuarzo medida en CFU/g, x_e es la concentración en equilibrio de bacterias en suspensión medida en CFU/mL y k_H es el coeficiente de distribución. El valor de k_H es dependiente del tamaño de partícula y de si el proceso descrito es adsorción o desorción [70]. Adicionalmente, encontraron una correlación entre el valor k_H y el diámetro promedio de partícula:

Ecuación 2: Correlación entre la constante de Henry y el diámetro de partícula

$$k_H = -0,15d + 49,21$$

Donde d es el diámetro promedio de partícula expresado en μm ; la relación lineal anterior entrega un coeficiente de correlación $R^2=0,9547$, lo cual indica que es posible extrapolarlo para distintos diámetros (20-350 μm) con relativa precisión, siempre que el adsorbente sea cuarzo [70].

El cuarzo, químicamente dióxido de silicio, presenta una estabilidad química deseable como función del pH y del potencial de reducción (Figura 51, Anexo A – Imágenes); particularmente, es sabido que el silicio se mantiene estable en su forma SiO_2 a pH 1,4 y con un $\text{ORP}=414$ mV, que son las condiciones de los flujos en el punto de incorporación de la operación bajo estudio. Es más, la alta fuerza iónica del medio conlleva a una mejora en la adhesión de bacterias cargadas negativamente en perlas de sílice, cuarzo y arenas, debido a una disminución de la barrera energética de la adsorción reversible [74].

Además, el cuarzo en general no es atacado por ácidos; la principal excepción es el ácido fluorhídrico, que descompone el cuarzo para formar fluoruro de silicio y ácido hidrofluorosilícico. El SiO_2 también es atacado por sustancias alcalinas; la velocidad de reacción depende del tipo de cristal y su tamaño: el cuarzo cristalino se disuelve muy lentamente en soluciones acuosas calientes, mientras que cuarzo amorfo se disuelve fácilmente a temperatura ambiente [75].

Dado lo anterior, el cuarzo particulado se convierte en una muy buena alternativa para su uso como material bioadsorbente para ser incorporado al proceso, principalmente por su afinidad e interacción con la biomasa y por su estabilidad química. La eventual dificultad surge al momento de intentar concebir un mecanismo para desorber el arsénico de las partículas: no es posible desorber las células del cuarzo por métodos químicos, ya que el uso de ácidos no afecta las propiedades del material, y el uso de bases lo disuelve. La manera de realizar la recuperación del adsorbente consistiría entonces en la desorción de sólo las especies arsenicales de la superficie celular.

En otro estudio, Hooshyari (2017) estudió cuatro materiales distintos que son productos secundarios de otros procesos, para la remoción de *E. coli* desde agua de lluvia: astillas de acero, escoria de acero de hornos de arco eléctrico, caliza y zeolitas [76]. Se utilizó el modelo de Freundlich para ajustar los datos experimentales obtenidos. Nuevamente, a menor tamaño de partícula, mayor es la capacidad y eficiencia de adsorción de células bacterianas en la superficie de todos los materiales en estudio [76].

A pesar de que las eficiencias de remoción de bacterias con astillas de acero, escoria de acero y caliza resultaron ser las mayores (100, 99,5 y 86,5% respectivamente [76]), no es posible considerar estos materiales como potenciales soportes de sorción de biomasa: el potencial redox de los flujos del proceso AAA es demasiado oxidante para el acero (oxidaría el Fe^0 a Fe^{+2}) y el pH está fuera de los rangos de pasivación y protección [77], mientras que para la caliza, su alta reactividad con ácidos y el bajo pH causaría inevitablemente su solubilización. En cuanto a las zeolitas, no se reporta en la literatura un estudio directo de la estabilidad ácido-base y redox, dado que la composición – y por tanto, los tipos de enlace y la cristalografía de este mineral – es muy variable dependiendo del tipo de roca, procedencia y en general del proceso geológico para su origen.

Con lo anterior, este material resulta no ser un potencial soporte para la adsorción de biomasa, debido a la incertidumbre sobre su estabilidad termodinámica y el desconocimiento de su cinética de lixiviación bajo las condiciones del proceso AAA. No obstante, es posible prever que la adsorción de células bacterianas sobre zeolitas tendrá una menor concentración de saturación en comparación con el cuarzo, ya que se ha

reportado que en equilibrio termodinámico, el cuarzo adsorbe hasta $1,9 \times 10^9$ CFU por gramo de adsorbente con el tamaño de partícula menos favorable [70], mientras que las zeolitas sólo adsorben hasta $4,8 \times 10^4$ CFU por gramo de adsorbente con el tamaño de partícula más pequeño [76], en ambos casos considerando una la concentración de equilibrio en el líquido de 10^9 CFU/mL. Además, el pH en el cual se realizaron las pruebas con zeolitas era cercano a 8, lo cual permite presumir que un pH inferior a 2 entregaría valores que no se ajustan con los parámetros ni/o con el modelo entregados.

En cuanto a la adsorción de arsénico, y debido a que no ha sido posible caracterizar la fisicoquímica de fijación de arsénico en células bacterianas que expresan fitoquelatinas, se determinó mediante búsqueda bibliográfica la cinética y la isoterma de un proceso analogable al que se intentó caracterizar mediante expresión heteróloga.

Merrifield *et al.* (2004) caracterizaron el potencial adsorbente sobre mercurio de perlas de quitosán con injertos de grupos tiol, donde las fueron injertadas cisteínas para incorporar grupos tiol a la superficie y así mejorar su capacidad adsorbente a distintos pH. Se desarrolló un modelo cinético de adsorción de mercurio de difusión radial en el poro sobre una perla esférica con adsorción no lineal [78]. Además, se determinó que la fijación de iones Hg^{2+} se puede ajustar a la isoterma de Freundlich:

Ecuación 3: isoterma de Freundlich para la fijación de Hg^{2+} en quitosán cubierto en cisteínas [78].

$$y_{eq} = K_F \cdot x_{eq}^m$$

Donde y_{eq} es la concentración de mercurio en equilibrio sobre el sólido en mmol/g, x_{eq} es la concentración en equilibrio en la fase acuosa en mM, K_F es la constante de proporcionalidad en $[(\text{mmol/g})-(\text{L/mmol})^m]$ y m es el coeficiente de adsorción adimensional de Freundlich. El valor reportado para K_F es 1,85 y para m es 0,207 [78].

5.4.2. Determinación y diseño de procesos para fijación de arsénico

5.4.2.1. Abatimiento en columnas empacadas

Enfocando lo anterior hacia el diseño de una operación unitaria, cabe mencionar que el intercambio iónico podría concebirse como una operación de reacción que ocurre en un reactor de lecho empacado; de manera similar, un filtro percolador podría concebirse como un equipo de utilidad muy parecida pero que no considera altas presiones, sino mayores áreas de intercambio. Este tipo de equipos son rellenados con algún tipo de material para empacar, como roca, escoria, cerámica o, más comúnmente hoy, plástico.

De esta forma y usando este tipo de diseño ya probado, se podría diseñar un reactor de lecho empacado tipo columna en el cual el relleno tenga adheridas las bacterias modificadas, capaces de adsorber el arsénico del flujo a remediar. Particularmente, es directo pensar que, dados los grandes flujos de la planta, se requerirían columnas de gran diámetro, lo cual fácilmente podría generar el colapso de las partículas y/o taponamiento del lecho si éste se encuentra presurizado, y, más aun, la presión necesaria para equipos de intercambio iónico generaría inevitablemente gastos considerables en energía mecánica a la escala del proceso AAA.

Por lo anterior, se determina que es más *ad hoc* y viable para el proceso existente, la incorporación de un filtro percolador. El flujo de alimentación normalmente se incorpora al equipo en la parte superior del empacado a través de brazos distribuidores que se extienden a lo largo del diámetro interno del filtro percolador y tienen variadas aberturas para entregar una tasa uniforme de aplicación por unidad de área. Los brazos distribuidores son rotados por la fuerza del agua que sale por las aberturas, o por el uso de acción eléctrica [30]. Dentro del filtro percolador, se desarrolla una capa de limo que varía entre 0,1 y 0,2 mm de espesor, que estaría, en este caso, formado por bacterias adheridas. Cuando las células bacterianas pierden su habilidad de mantenerse adheridas, el líquido lava la capa de limo, fenómeno denominado *sloughing*, y es principalmente una función de la carga hidráulica (y orgánica en el caso de tratamiento de aguas residuales) sobre el filtro. La carga hidráulica da cuenta de las velocidades de corte, por lo que el *sloughing* puede ser controlado usando un distribuidor de agua con acción eléctrica para variar la velocidad rotacional [30].

Las desventajas de este tipo de filtro se basan en que puede constituir una mayor fuente de olores y menor calidad del efluente (enfocado en usos posteriores) [30]. En el caso del proceso AAA, los flujos de entrada ni de salida constituyen una fuente considerable de olores (atribuidas más a flujos de alta carga orgánica, lo cual no es el caso en este trabajo) y tampoco es necesario conseguir que el efluente de este filtro obtenga una mayor calidad (además de su menor concentración de arsénico), por lo que las desventajas en el uso de este tipo de equipo no aplican en el caso de ser implementado en la planta de ECL.

En cuanto al lecho empacado del filtro, el ideal corresponde a un material que tenga alta resistencia y área de superficie por unidad de volumen, y que sea de bajo costo, alta durabilidad y alta porosidad para minimizar la obstrucción. Los materiales típicos utilizados corresponden a roca de río, plástico y madera de secoya [30]. El filtro para este proceso se dimensionó utilizando como relleno partículas de cuarzo del diámetro más grueso estudiado por Wang *et al.*, correspondiente a 351 μm .

Howland (1958) propuso que, para este tipo de filtros, el tiempo de contacto del líquido con el biofilm es proporcional a la profundidad del filtro e inversamente proporcional al flux aplicado como se muestra a continuación:

Ecuación 4: Tiempo de residencia en un filtro percolador.

$$t = \frac{C \cdot H}{q^n}$$

Donde n corresponde a la constante hidráulica (adimensional, igual a 0,67 para rellenos de canales plásticos) propia del material del lecho, y C es la constante del lecho empacado. De acuerdo a la ecuación anterior, a medida que aumenta el flux de entrada al filtro, el tiempo de residencia no disminuye en directa proporción al flujo, debido a que el espesor del film del líquido aumenta [30].

Por otra parte, la pérdida de carga de lechos empacados puede ser estimada según la correlación de Ergun [79]:

Ecuación 5: Caída de presión por fricción en lechos empacados.

$$\frac{\Delta P_{fr}}{H} = 150 \frac{(1 - \varepsilon)^2}{\varepsilon^3} \frac{\mu \cdot u_0}{(\Phi_S \cdot d_p)^2} + 1,75 \frac{(1 - \varepsilon) \rho_F \cdot u_0^2}{\varepsilon^3 \Phi_S \cdot d_p}$$

El rango de flux que puede operar un filtro percolador depende del tipo de relleno; sabiendo el valor del flux y del flujo dado por la planta, se determina el área requerida para tratar todo el flujo, y con eso el diámetro del filtro:

Ecuación 6: Relación entre el área del filtro y el flux de alimentación.

$$q = \frac{Q}{A_F}$$

Donde Q es el flujo y A el área total del filtro percolador. Realizando un balance de energía del fluido utilizando el modelo de Bernoulli, se obtiene un polinomio para la altura en función de valores conocidos y del tiempo de residencia, el cual es determinado analogando la adsorción de ácido arsénico³ en las fitoquelatinas con la adsorción de mercurio en una superficie recubierta con cisteínas; este supuesto se basa en que el fenómeno de fijación de un metaloide, tanto en PC como en cisteína, se lleva a cabo a partir de la formación de un complejo llamado tiolato, compuesto por el grupo tiol con algún metal de transición (o elemento anfótero) suaves y de alta polarizabilidad [78].

Se consideró la cinética y la isoterma de adsorción en condiciones más ácidas y de menor agitación, estudiadas por Merrifield *et al.* (2004). A partir de los datos experimentales, se considera que la saturación del adsorbente se obtiene cerca de las 7 horas de exposición, como se muestra a continuación:

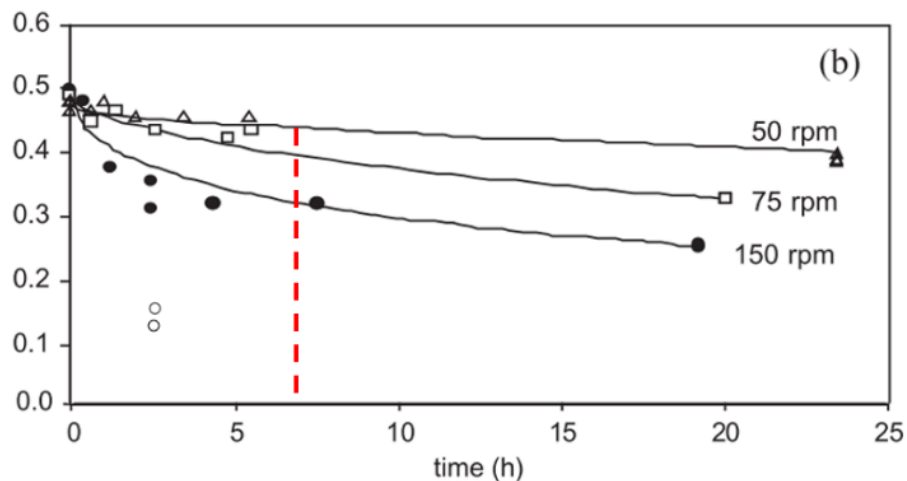


Figura 37: Cinética de captación de Hg^{2+} en perlas de quitosán recubierto con cisteínas. La concentración de adsorbente fue de 0,19 g/L y el pH igual a 4,0 [78].

Dado lo anterior, la altura estimada del filtro es de 3,3 m, como se muestra en el Anexo 8.9.1. A pesar de que la altura del filtro dimensionado está fuera del rango común dentro

³ El ácido arsénico (H_3AsO_4) es la especie que se encuentra en proporción significativamente mayor a pH inferior a 2, tal como muestra la Figura 53.

del que se mueven para filtros percoladores (entre 0,9 y 2,5 m [30]), el valor obtenido es sólo cerca del 30% mayor al máximo encontrado regularmente, y era de esperar que dada la dificultad actual para inmovilizar el arsénico, los tiempos de residencia, que determinan el largo del filtro, fuesen de varias horas. Con este valor, y sensibilizando el valor de los parámetros de la Ecuación 4, se obtiene una superficie de valores para el flux, como se muestra en el gráfico de la siguiente figura.

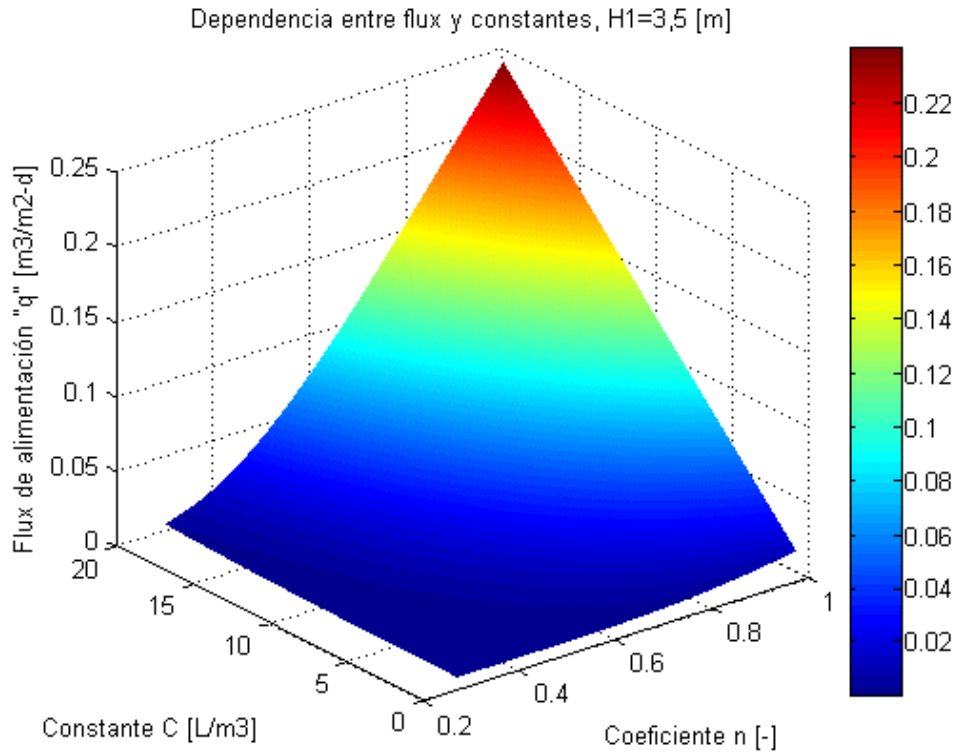


Figura 38: Dependencia del flux de alimentación con respecto a las constantes de la ecuación de diseño del filtro percolador. La altura se mantuvo fija igual a 3,5 m. Simulación realizada en MATLAB.

Se obtuvo a partir de la simulación que generó la Figura 38 el rango en el cual se mueve el valor del flux, y se tiene que mediante el modelo propuesto, tal flux es siempre menor a $0,24 \text{ m}^3/\text{m}^2\text{-d}$, por lo que es viable operar el filtro con el relleno propuesto sin que éste se inunde: la literatura sugiere que los filtros percoladores de menor capacidad hidráulica no deben sobrepasar el valor de $1 \text{ m}^3/\text{m}^2\text{-d}$ [30].

Considerando entonces el mayor valor del flux obtenido, los valores de las constantes ajustadas corresponden a lo que sigue:

$$C^* = 20 \left[\frac{L}{m^3} \right]$$

$$n^* = 1$$

$$q^* = 0,24 \left[\frac{m^3}{m^2 \cdot d} \right] = 2,78 \times 10^{-6} \left[\frac{m^3}{m^2 \cdot s} \right]$$

El área se obtuvo entonces de la Ecuación 6, utilizando el valor del flux recién reportado:

$$A_F = 10155 \text{ [m}^2\text{]}$$

Lo cual equivale a un filtro de un diámetro de 114 m; claramente no es posible tener un solo filtro de tal diámetro, pero el área se puede distribuir en varios filtros operando en paralelo, de manera de distribuir el flujo a tratar en varios equipos idénticos. Con las dimensiones del filtro ya determinadas, se calculó luego la cantidad total de biomasa que se puede adsorber en el lecho, lo cual se detalla en el Anexo 8.9.1 – Dimensionamiento de filtros percoladores.

Dada la relación algebraica entre n filtros de radio r cuya suma de áreas es igual a A_F , se determinó que un solo filtro de 114 m de diámetro es equivalente, en capacidad y en demanda de biomasa, a operar 5 filtros de 52 metros de diámetro operando simultáneamente en paralelo, lo cual está dentro de las dimensiones válidas reportadas para filtros percoladores rellenos con piedras (hasta 61 de diámetro [80]). La demostración de esta equivalencia se muestra en el Anexo 8.9.1.

Tomando un margen de seguridad del 20% en caso de haber fluctuaciones de los flujos, la operación de adsorción en columnas consta del funcionamiento en paralelo de 6 filtros percoladores de 52 metros de diámetro cada uno. Para generar una holgura asociada a tiempos de lavado y acondicionamiento de los rellenos, la operación completa debe considerar la existencia de 7 filtros idénticos de 52 metros de diámetro cada uno.

La idealidad de la adsorción de biomasa en el soporte de cuarzo consiste en el recubrimiento del 100% de la superficie específica de cada filtro; sin embargo, se estudió la variación de la eficiencia de retención de arsénico dependiente del porcentaje de recubrimiento de las partículas de cuarzo.

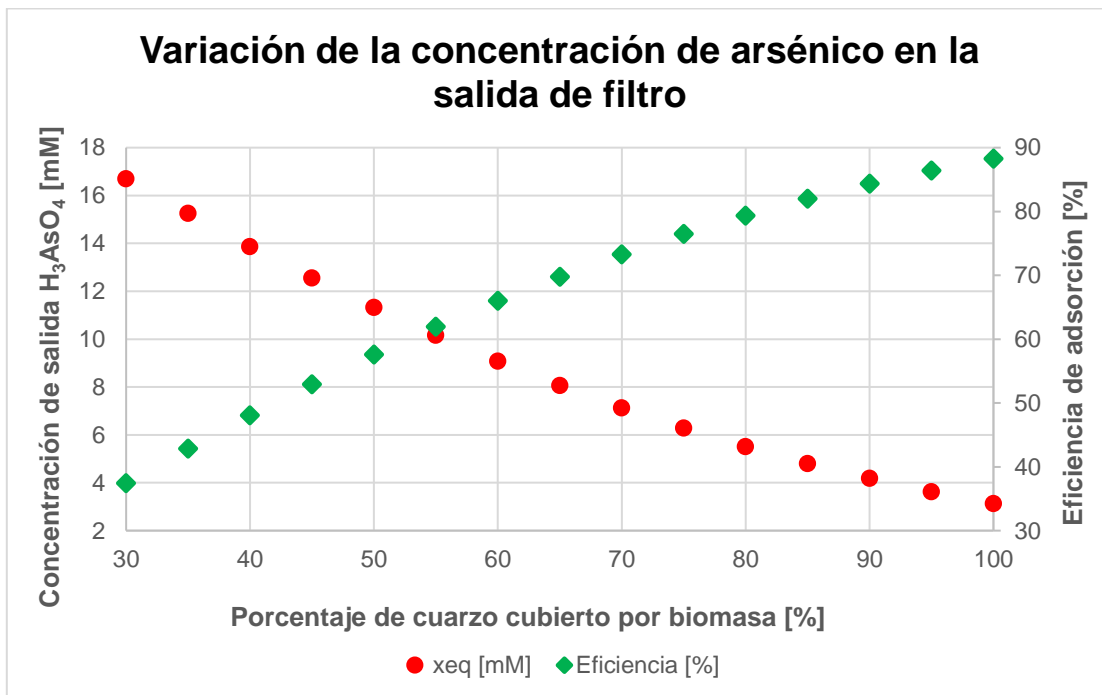


Figura 39: Dependencia de la capacidad de abatimiento de arsénico del filtro con el porcentaje de recubrimiento del relleno con biomasa. Los datos exactos se reportan en la Tabla 10 del Anexo 8.9.1.

Como era de esperar, la concentración de arsénico a la salida disminuye conforme aumenta la proporción de superficie de sólidos del filtro cubierta por biomasa; esto es equivalente a afirmar que la cantidad de arsénico retenido aumenta a medida que se incrementa el porcentaje de recubrimiento biológico del cuarzo. Lo anterior se debe evidentemente al aumento de la superficie de contacto que efectivamente permite la transferencia de masa mediante el fenómeno de adsorción. Consecuentemente, la eficiencia también aumenta a medida que crece la superficie cubierta con bacterias, y tal eficiencia abarca valores de entre 37 y 88% de retención, lo cual está dentro de lo esperado considerando que el proceso AAA general logra abatir el 88% del arsénico, siendo la un supuesto razonable esperar que el rendimiento de la etapa biotecnológica no supere tal rendimiento debido a las barreras termodinámicas de la adsorción.

En cuanto a la producción de la biomasa, el diseño del equipo de fermentación apuntó a la producción de la mayor demanda de material biológico, es decir, a producir la cantidad suficiente de células bacterianas para cubrir la totalidad del área interna total de un filtro. Dado esto, se requiere que el lecho alcance una concentración de $4,21 \times 10^9$ UFC por cada gramo de relleno, y según la isoterma de Henry planteada por Wang *et al.* (2014), la concentración correspondiente en equilibrio de células en suspensión es de $2,21 \times 10^9$ CFU por cada mililitro de suspensión. Realizando un balance de masa, e imponiendo un flujo de cultivo hidráulicamente adecuado para el filtro, se obtiene que la concentración celular de alimentación para el acondicionamiento⁴ de cada columna es de 2×10^{11} CFU/mL, lo cual es imposible de lograr si el flujo para el acondicionamiento del relleno proviene directamente de un fermentador.

La discusión anterior permite deducir la necesidad de contar con un equipo auxiliar de concentración de biomasa. El objetivo sería generar un flujo de concentración celular lo suficientemente alta como para lograr el equilibrio fisicoquímico deseado mediante adsorción en el interior del filtro. Como se asume que las características morfológicas y químicas de las bacterias son adecuadas para una correcta adsorción, lo ideal sería no alterar tales condiciones mediante la incorporación de agentes químicos o de operaciones que generen demasiado estrés mecánico, ya que cualquiera de estos dos caminos podría interferir en la integridad y propiedades de la superficie celular.

No obstante, es necesario considerar que la selección de equipos de separación se basa ampliamente en el tamaño de las partículas en el fluido. Otras consideraciones como densidad, viscosidad, concentración de partículas, y magnitud de flujo también se consideran en la selección del proceso, igual que el precio de la partícula, del fluido y la eficiencia y costo de la captura de la partícula en el proceso, pero son criterios secundarios [81].

Dado lo anterior, y considerando un tamaño de partícula cercano a los 2 μm , las operaciones que pueden ser aplicables para la separación de partículas del orden de micras desde medio líquido son realizadas a través de equipos de sedimentación centrífuga, dentro de los cuales los ciclones son los más ampliamente usados para la

⁴ Etapa en la cual el relleno del filtro percolador es preparado para el abatimiento de arsénico, mediante la adsorción de biomasa en las partículas que lo componen.

separación eficiente de partículas por sobre 5 μm de diámetro, por lo que no sería aplicable para separar células. Las centrífugas pueden aumentar enormemente la velocidad de sedimentación, especialmente cuando las partículas son muy pequeñas ($<10 \mu\text{m}$); dentro de estos equipos, las centrífugas de discos presentan la ventaja operacional de poder ser diseñadas con una boquilla para la remoción continua de concentrado [81, 82]. Además, este tipo de centrífugas opera en un rango de tamaño de partícula entre los 0,5 y 200 μm y es ideal para las bioseparaciones [81]. El diseño de estos equipos se rige por la siguiente relación:

Ecuación 7: Ecuación de diseño de una centrífuga de discos.

$$Q = \frac{g \cdot d_p^2}{18\mu} (\rho_p - \rho_f) \left[\frac{2\pi n \Omega^2}{3g} (R_0^3 - R_1^3) \cdot \text{ctg}\theta \right]$$

Donde:

$$v_g = \frac{g \cdot d_p^2}{18\mu} (\rho_p - \rho_f)$$

$$\Sigma = \frac{2\pi n \Omega^2}{3g} (R_0^3 - R_1^3) \cdot \text{ctg}\theta$$

Quedando:

$$Q = v_g \cdot \Sigma$$

Con lo mencionado en el párrafo anterior, el proceso se diseñó integrando una centrífuga de discos a la salida del biorreactor para concentrar el flujo de acondicionamiento de la columna. El dimensionamiento de la centrífuga de discos con boquilla entregó como resultado un equipo con un diámetro externo de 1,25 m, un factor Σ de $1,44 \times 10^6 \text{ m}^2$ y un consumo de potencia de 40 MW cuando opera con una velocidad angular de 3200 rpm determinada a partir de la ponderación de la máxima velocidad de centrífugas de discos de mayor tamaño [83, 84] para obtener un margen de seguridad del 20%, poseyendo 150 discos (máximo recomendado para el diseño [81]), con un ángulo de cono de 43° , correspondiente al promedio del rango sugerido [83, 84] (Anexo 8.9.2).

Naturalmente, las dimensiones y parámetros característicos de diseño resultantes del dimensionamiento de este equipo de separación sólido-líquido se encuentran por sobre los valores que están ya tabulados para centrífugas de discos con boquilla para recuperación continua de lodo. El área específica del equipo es cerca de 15 veces superior a los mayores valores de Σ reportados [83], y los requerimientos de flujo son cerca de la misma cantidad de veces superior a lo que satisfacen centrífugas de discos clasificadas tradicionalmente como de alta capacidad; lo anterior, sumado al hecho de que Σ es proporcional al flujo, y a que el parámetro de proporcionalidad entre ambos es un valor que depende sólo de la partícula, explican la concordancia entre la superioridad en órdenes de magnitud tanto del flujo de operación impuesto y el área específica obtenida mediante dimensionamiento.

El tamaño de los discos de la centrífuga fue determinado semicuantitativamente mediante la utilización de múltiplos de la aceleración de gravedad, comunes para centrífugas de la geometría seleccionada. El radio obtenido es cerca del doble del de los discos de mayor envergadura registrados en la literatura [83]. La estrategia de dimensionamiento empleada es en esencia un método grueso de escalamiento que estima un valor numérico que dependiente exclusivamente de parámetros propios de la partícula, por lo que se presume que, a pesar de ser una metodología que entrega resultados poco precisos, éstos aseguran la separación de los sólidos prescindiendo de parámetros operacionales, y a la vez que entregan dimensiones características del equipo, en este caso, el radio externo. Dado esto, se asume que mientras la velocidad angular utilizada sea relativamente adecuada en su magnitud, la estimación del valor del radio resulta ser pertinente.

De las discusiones anteriores se desprende la consistencia de los resultados obtenidos con la potencia, ya que ésta varía cuadráticamente con la velocidad angular y el radio externo del disco, y linealmente con el caudal de alimentación.

Para la generación de la biomasa sorbente, se requiere de un biorreactor que sea capaz de suplir tal demanda. Se dimensionó entonces un fermentador continuo de estanque agitado, ya que con este tipo de reactores se pueden producir grandes cantidades de producto, incrementando la productividad por unidad de volumen, y además se disminuye el tiempo de producción [85]. Los parámetros cinéticos de una *Escherichia coli* recombinante genérica, necesarios para el dimensionamiento del fermentador, se muestran a continuación.

Tabla 6: Parámetros cinéticos del crecimiento de *Escherichia coli* recombinante genérica.

| PARÁMETRO | UNIDAD | VALOR | REFERENCIA | COMENTARIO |
|---|---|-------|------------|--------------------------------|
| Constante de Monod de saturación por sustrato, K_S | $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ | 33 | [86] | Cepa ML30, 37°C en quimiostato |
| Velocidad máxima específica de crecimiento, μ_{MAX} | $\left[\frac{1}{h}\right]$ | 0,76 | [86] | Cepa ML30, 37°C en quimiostato |
| Rendimiento de biomasa respecto al sustrato, $Y_{X/S}$ | $\left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ sustrato}}\right]$ | 0,36 | [87] | Promedio del rango reportado |

Usando los valores reportados en la Tabla 6, y utilizando las condiciones de optimalidad para maximizar la productividad del biorreactor, a través de balances de masa total y de biomasa se obtuvo que para la producción de un flujo de 0,23 [m³/h] de cultivo con una concentración celular de 6 g/L, es necesario tener un biorreactor de 24,7 m de alto con un diámetro de 8,3 m, que alcanza una productividad de 4,55 [g/L-h].

Dada la alta demanda que tiene cada una de las columnas, no resulta irrazonable concebir para este proceso un biorreactor con un volumen total de estanque de cerca de 1300 [m³], debido a los grandes flujos de PLS abatido que manipula ECL en la planta del proceso AAA, y también debido a la alta cantidad de biomasa que los filtros requieren según diseño para alcanzar el equilibrio fisicoquímico y fijar el arsénico en sus lechos.

Es importante mencionar que, debido a que la quelación mediante enlaces tiolato es virtualmente irreversible debido a la formación de enlaces de carácter covalente entre el adsorbente y el adsorbato [78], la desorción de arsénico resulta dificultosa, por lo que se propone que la recuperación de las columnas empacadas sea mediante la desorción de las células cargadas, lo cual es totalmente viable según la capacidad productiva del equipo de producción de biomasa dimensionado.

La magnitud del volumen del biorreactor representa un fuerte respaldo a la división del área total requerida para el abatimiento del PLS en varios filtros percoladores idénticos, ya que esta división implica directamente una disminución de las dimensiones del reactor, por cuanto el diseño considera el acondicionamiento de sólo una columna a la vez. Además, esto trae consigo la ventaja operacional de que es posible acondicionar un filtro mientras simultáneamente al menos otros 5 filtros se encuentran en operación. En efecto, como el acondicionamiento de los filtros permite preparar sólo un filtro a la vez, tomando un tiempo mínimo de 7 horas, durante el período de *start up* del proceso diseñado no sería posible operar a máxima capacidad, y por tanto tampoco disminuir la carga arsenical de todo el PLS proveniente del proceso AAA.

Se determinó mediante balances de energía que el calor que debe suministrarse a través de un intercambiador de calor para la mantención de la temperatura es equivalente a la diferencia entre las pérdidas de calor del equipo y el calor de fermentación generado en su interior (cálculos en el Anexo 8.9.3). Evidentemente, las pérdidas de calor mediante estimaciones generarían un considerable error, ya que, a pesar de que el calor de fermentación puede ser estimado de manera bastante precisa mediante correlaciones y datos ya conocidos y tabulados, las pérdidas de calor son muy dependientes de las características térmicas de los materiales de construcción del reactor y sus accesorios de aislamiento térmico, si es que se consideraren.

Ecuación 8: Balance de energía final del biorreactor.

$$\dot{Q}_{IC} = \dot{Q}_P - \dot{Q}_F$$

Es por lo anterior que se considera poco concluyente estimar el calor que debe suministrarse mediante un intercambiador de calor, aunque sí se sugiere, dada la escala de trabajo, utilizar una estrategia de intercambio basada en un equipo externo de transferencia (intercambiador de carcasa y tubos, o de placas) o bien un serpentín interno [85]. Se considera altamente conveniente diseñar un *matching* de calor, utilizando el calor de enfriamiento del fluido recién esterilizado para la mantención de la temperatura al interior del reactor.

La demanda de oxígeno generada por el cultivo se calculó mediante correlaciones entre el rendimiento del crecimiento de biomasa, la velocidad de crecimiento de la misma y su concentración, obteniéndose un valor de 12,8 [g/L-h], lo cual es casi cuatro veces el máximo esperado (lo común es entre 1,6 y 3,2 g/L-h [85]), generando así un flujo de aire de 10,9 [m³/s] y una eficiencia de transferencia de oxígeno del 5,2% usando una tasa específica de aireación (*VVM*) de 0,5 m³/m³-s.

La eficiencia de transferencia de oxígeno se encuentra dentro de los rangos esperados [85], ya que, a pesar de que la demanda de oxígeno es muy alta, es suplida satisfactoriamente por un flujo de aire lo suficientemente caudaloso como para generar una presión parcial de oxígeno elevada en el seno de la fase gaseosa, y por ende, una buena concentración de oxígeno disuelto en la fase líquida.

La inusualmente alta demanda de oxígeno estaría generada por dos factores: la gran demanda de producción de biomasa dada por los requerimientos del proceso, y la alta velocidad específica de crecimiento, al tratarse de un microorganismo bacteriano de muy rápida división en comparación con otros similares.

Respecto a la potencia requerida para la agitación, se realizó un análisis de sensibilidad para distintas razones entre el diámetro del *impeller* y del estanque, y también para distintos valores de *VVM* (Figura 40). De manera general, es posible mencionar que la potencia requerida para alcanzar una correcta agitación mediante una velocidad de 50 rpm en régimen turbulento es del orden de entre 0,23 y 21 MW, lo cual también es consistente con las dimensiones del biorreactor, ya que, dependiendo de la razón entre los diámetros del *impeller* y el estanque, el *impeller* puede alcanzar diámetros de hasta casi 5,8 m.

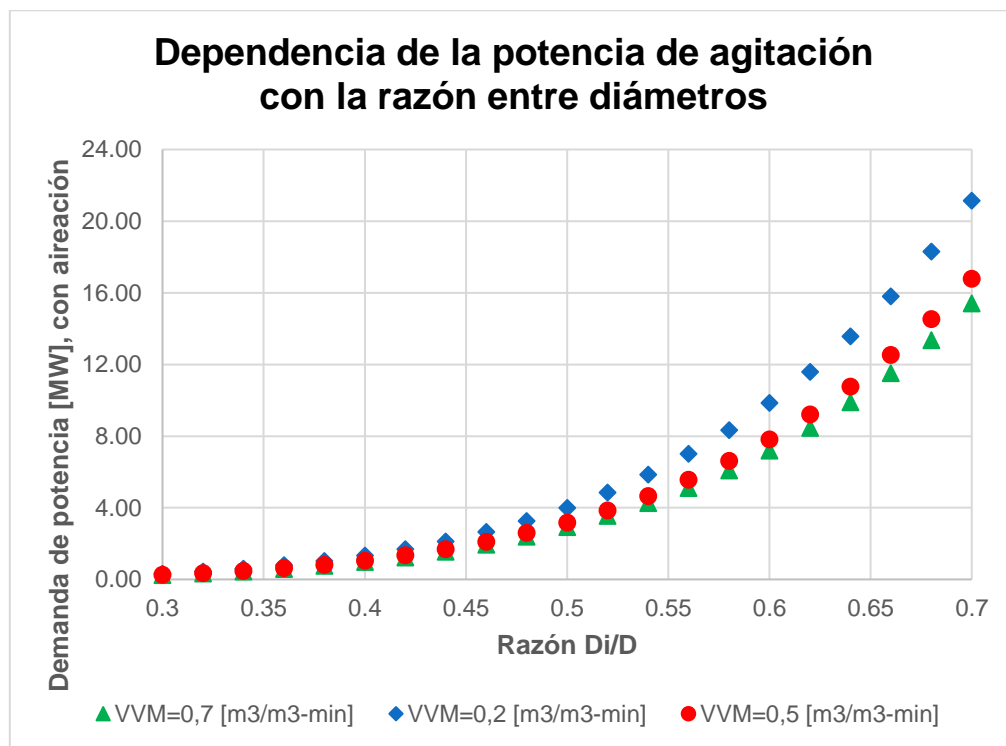


Figura 40: Variación de la potencia consumida por agitación como función de la razón entre el diámetro de *impeller* y del estanque, para distintos valores de *VVM*. Los cálculos son válidos para *impellers* de tipo turbina de aletas planas.

A partir de la Figura 40 se puede deducir que, a pesar de haber abarcado todo el rango de valores de la tasa específica de aireación para biorreactores industriales, no se

observa una variación realmente considerable de la potencia consumida por agitación, a una razón Di/D fija. Por otra parte, se observa que los mayores valores de potencia consumida por agitación se alcanzan a razones Di/D cercanas al límite superior recomendado (0,7 [85]), y que además son hasta dos órdenes de magnitud mayores que las potencias obtenidas cuando la razón Di/D se acerca al mínimo recomendado (0,3 [85]); es directo concebir que mientras mayor es la razón Di/D , el tamaño del *impeller* es mayor, por lo que la energía mecánica requerida para movilizar las aspas de la turbina aumenta considerablemente, y en efecto, la potencia tiene una fuerte dependencia con el diámetro del *impeller*, siendo ésta fundada en el exponente 5 sobre tal diámetro.

Considerando lo anterior, se deduce que una manera de reducir los gastos de operación del reactor en cuanto a la agitación en la etapa de ingeniería de detalle es utilizar la mayor tasa específica de aireación, ya que la potencia es poco sensible a este parámetro, y además utilizar *impellers* cortos, es decir, donde la relación Di/D es cercana a 0,3, ya que esta variable sí afecta fuertemente el gasto energético por agitación. En otras palabras, la homogenización y mezclado del caldo dentro del reactor puede ver disminuido su gasto energético si se utilizan agitadores de diámetro corto respecto al del estanque, y altos flujos de aire, lo cual además de generar la advección, mejora la difusión del oxígeno desde la fase gaseosa a la líquida.

Los resultados de cálculos relacionados con la conversión de distintas unidades de biomasa se han realizado tomando como supuesto que una unidad formadora de colonia es equivalente a una célula en un cultivo líquido, lo cual no es necesariamente cierto debido a que las células en suspensión dentro de un caldo de cultivo pueden ser viables o no; el supuesto se sustenta en que regularmente, la etapa de crecimiento en la que se encuentra el cultivo a utilizar es previa a la fase estacionaria, por lo que la muerte celular es mucho más lenta que la división, y las células no viables son eliminadas del reactor en el cual se genera la biomasa.

Otro supuesto importante a la hora de convertir las unidades de biomasa es el tamaño uniforme de las células, ya que éste varía mucho entre un individuo y otro, dependiendo de la fase de crecimiento en la cual se encuentre cada microorganismo particular. Es así que, a pesar de que los supuestos intentan simplificar los cálculos y al mismo tiempo no alejar demasiado los resultados de la realidad, es muy posible que existan imprecisiones considerables entre los resultados teóricos obtenidos y los eventuales resultados experimentales que se obtendrían si estuvieran dentro de los alcances de este trabajo.

Finalmente, es importante recalcar que los parámetros cinéticos utilizados para el dimensionamiento del biorreactor son para cepas genéricas de la especie que se propone producir, ya que no es posible, sin tener los resultados de transformación esperados, obtener parámetros cinéticos más reales y precisos provenientes de ensayos de cultivos continuos de la cepa recombinante diseñada en este trabajo. Es por esto que los resultados del dimensionamiento del equipo de producción de biomasa son una mera aproximación de lo que se obtendría si se contara con datos más idóneos para tal dimensionamiento, manteniendo los resultados obtenidos dentro de la etapa de ingeniería básica. Un diagrama de flujos del proceso recién propuesto se encuentra en el Anexo 8.1 (Figura 63).

5.4.2.2. Abatimiento en estanque agitado

El abatimiento de especies arsenicales río abajo del proceso AAA en estanques agitados se concibió como una operación de transferencia de masa llevada a cabo en una suspensión compuesta por el flujo a remediar y el mismo tipo de partículas que para el abatimiento en columnas, dadas sus buenas y conocidas propiedades físicas y químicas ya expuestas anteriormente.

Los cálculos relativos al consumo energético del funcionamiento de un estanque agitado se realizaron para obtener una suspensión completa, definida como la cual en la que todas las partículas están suspendidas fuera del fondo del estanque o bien no permanecen sobre el fondo por más de 2 segundos. Al alcanzarse esta condición, puede que exista una región de líquido claro cerca de la parte superior del estanque [84]. La operación de una suspensión uniforme supone velocidades del agitador considerablemente superiores, y el coeficiente de transferencia de materia no aumenta mucho más al aumentar la velocidad de giro del agitador [84], por lo cual el diseño para la obtención de una suspensión uniforme fue descartado.

El flujo de sólido se determinó realizando un balance de masa de adsorbato en el estanque tomando como condición de salida una concentración de arsénico de 0,5 g/L, que es 100 veces la concentración máxima admitida para la eliminación de residuos con arsénico, según el DS N°148 del Reglamento Sanitario de Residuos Peligrosos [4]. Se determinó que el flujo de sólidos para alcanzar tal concentración de salida es de 76 kg/s, generando un volumen de estanque de 2250 m³. Es necesario tener en cuenta que si se opera una suspensión de partículas en reactores relativamente largos (altura mayor al diámetro), la distribución de partículas dentro del seno del fluido no será cercana a la completitud, generando una gruesa banda de líquido claro en la zona superior del estanque. Es por esto que se decidió dimensionar un estanque donde la altura es igual al diámetro, tomando éstos un valor de 14,2 m.

La velocidad crítica del agitador para mantener una suspensión completa viene dada por la ecuación adimensional de Zwietering [88]:

$$N'_c \cdot D_i^{0,85} = S \cdot \nu^{0,1} \cdot d_p^{0,2} \cdot \left(g \frac{\Delta\rho}{\rho} \right)^{0,45} \cdot B^{0,13}$$

Donde N'_c es la velocidad crítica del agitador en Hz, ν es la viscosidad cinemática del fluido en m²/s, g es la constante de aceleración gravitacional en m/s², B es 100 veces la razón entre el peso del sólido y el del líquido, y S es una constante adimensional. El tipo de agitador que se seleccionó corresponde a una turbina estándar de palas planas, ya que probablemente tiene la misma velocidad crítica aproximada del agitador que otros rodets, pero consume solamente un cuarto de potencia que la potencia estándar. Además, todos los rodets son más eficaces para mantener suspensión completa cuando se colocan más cerca del fondo del estanque [84]. Los valores de S dependen justamente del tipo de rodete que se considere para el diseño, y algunas proporciones entre sus longitudes características.

Con las dimensiones del estanque y la correlación de Zwietering se determinaron las velocidades críticas de agitación para los *impellers*, que fueron 0,33, 0,85 y 1,66 rps para razones de diámetro *impeller* sobre diámetro del estanque de 2, 3 y 4, respectivamente. Así, se pudo determinar la potencia necesaria para realizar el trabajo mecánico de la agitación del estanque, como se muestra en el gráfico de la siguiente figura.

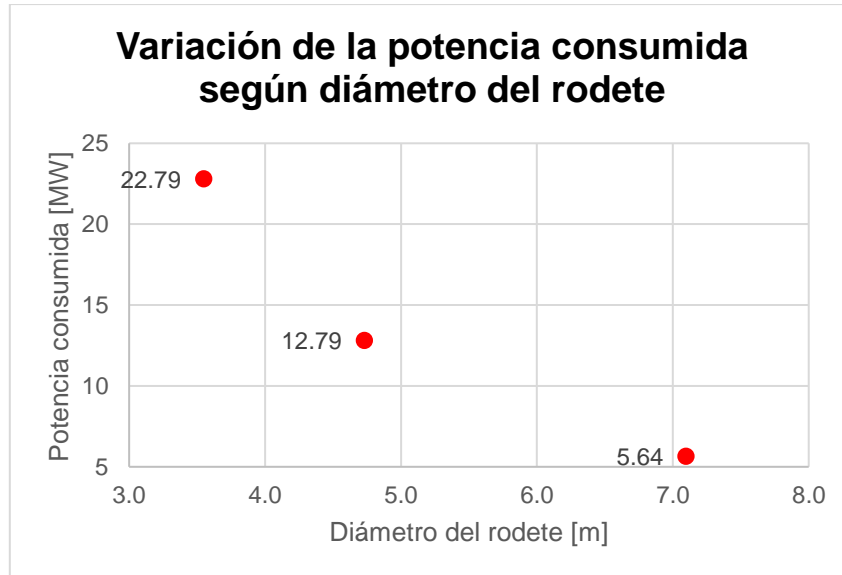


Figura 41: Variación de la potencia necesaria para la agitación según el diámetro calculado del *impeller* para valores tabulados de la razón D_E/D_i y de N_P .

De la Figura 41 se desprende que a medida que aumenta el diámetro del *impeller* (y equivalentemente, a medida que disminuye la razón D_E/D_i), disminuye la potencia necesaria para alcanzar la velocidad crítica de agitación. Es de gran importancia entonces el análisis de la influencia del diámetro y de la velocidad en la potencia consumida: la potencia es decreciente con el diámetro del rodete, pero crece con la velocidad crítica de agitación, lo cual permite deducir que el factor que tiene mayor preponderancia en el cálculo de la potencia es la velocidad de agitación por sobre el diámetro del *impeller*; además, los valores de velocidad de giro obtenidos permiten concluir que para *impellers* más cortos, la velocidad de giro mínima necesaria para mantener una suspensión completa es mayor. Es importante recalcar que la Figura 41 muestra la potencia calculada a partir de una velocidad de agitación mínima, por lo que muy probablemente, los valores de potencia consumida in situ sean mayores debido a la necesidad de poder procesar adecuadamente el flujo en caso de aumentos fluctuantes en su magnitud.

Con esto, es posible determinar que lo más conveniente para asegurar la transferencia de masa en el estanque de abatimiento por adsorción es utilizar el *impeller* más largo, es decir, el que genera la menor razón D_E/D_i debido a que requiere menor velocidad de giro para asegurar una suspensión completa y, por lo tanto, consume menos energía por unidad de tiempo.

Los cálculos para la determinación de la adsorción suponen que la transferencia de masa de partículas suspendidas es mejor que la existente en partículas formando parte de un

lecho compacto, por lo que se espera no sea muy alejado de la realidad obtener porcentajes de recubrimiento de partículas con biomasa cercanos al 100%. Un supuesto importante para determinar la demanda de biomasa fue asumir que superficie de cada partícula es similar a la de una esfera del mismo diámetro; este supuesto se basa en que las partículas, al ser irregulares, tienen una superficie que es muy variable entre una y otra, aunque sean del mismo tamaño promedio, y que la superficie promedio ponderada de las partículas suspendidas se parece en magnitud a la superficie de una esfera del mismo tamaño.

Para obtener aproximaciones de los valores de adsorción en el caso no ideal en el que la fijación de biomasa en las partículas no alcance para cubrir el 100% de la superficie disponible, se simularon resultados variando el porcentaje de recubrimiento de las partículas entre el 30 y el 100% de la superficie total disponible. Como se observa en la Figura 42, la concentración de ácido arsénico a la salida del estanque y, por lo mismo, la eficiencia de abatimiento, varían de manera muy similar al caso del abatimiento en columnas, lo cual es consistente, ya que la cinética y condiciones de equilibrio consideradas para la adsorción son las mismas en ambos casos, y dependen únicamente de la fisicoquímica superficial de las células bacterianas, siendo los factores que determinan las condiciones de borde los parámetros iniciales y finales impuestos para el dimensionamiento, esto es, la superficie de transferencia de masa para los filtros, y la concentración de H_3AsO_4 a la salida en el caso del estanque .

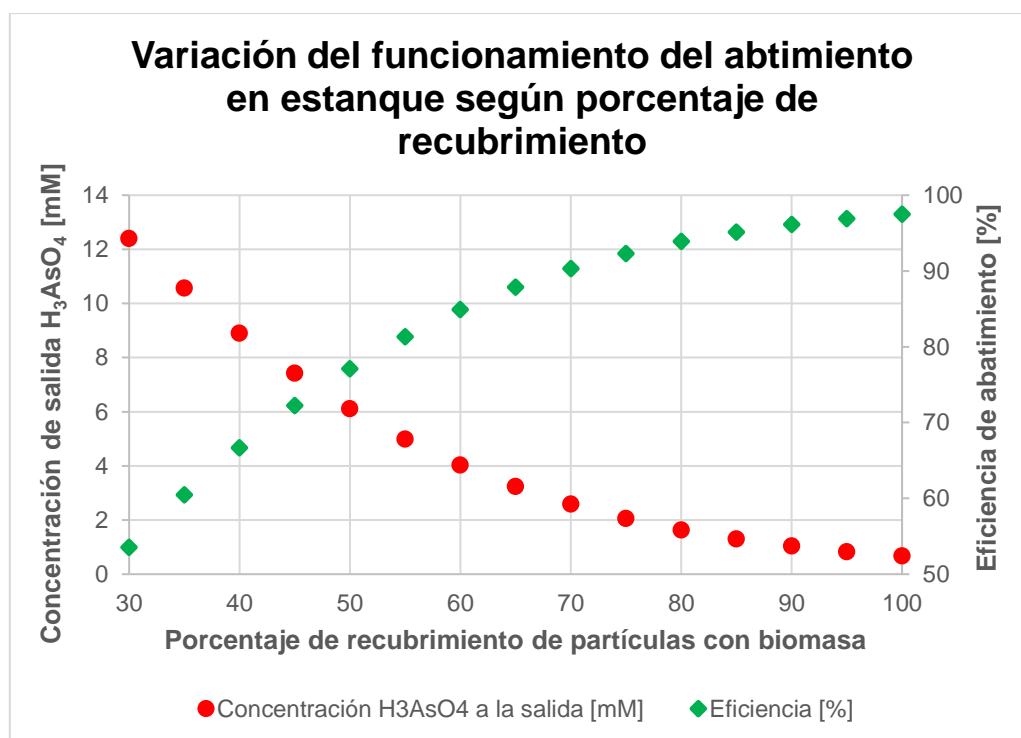


Figura 42: Simulación de los resultados de funcionamiento del estanque de adsorción considerando distintos grados de recubrimiento de las partículas con biomasa.

Las partículas son teóricamente capaces de adsorber arsénico respondiendo a la tendencia mostrada en la Figura 42 sólo si se encuentran adecuadamente recubiertas

por biomasa, lo cual es factible de llevar a cabo en un estanque destinado al acondicionamiento de partículas ubicado aguas arriba del estanque de abatimiento. Este equipo es también contenedor de una suspensión, cuyo comportamiento es también el de una suspensión completa de partículas de cuarzo por los motivos expuestos anteriormente respecto al estanque de abatimiento. El flujo de partículas y de biomasa fue determinado mediante balances de masa total y de adsorbato (bacterias). Los flujos volumétricos de sólido y de caldo con biomasa determinaron la obtención de un volumen de estanque de 215 m³ utilizando como tiempo de residencia 2 horas, el cual asegura alcanzar el equilibrio de adsorción cuya isoterma describe Wang *et al.* (2014); de la misma manera que para el estanque de abatimiento, se dimensionó el estanque acondicionador asignando a la altura el mismo valor del diámetro, que resultó ser 6,5 m.

La potencia del agitador para mantener una suspensión completa se calculó también empleando la correlación de Zwietering, que entregó una velocidad crítica de agitación de 46 rpm; las razones entre las dimensiones del rodete de palas planas imponen también para este cálculo un número de potencia igual a 6,2 y un diámetro de *impeller* equivalente a la mitad del diámetro del estanque; con estas restricciones y bajo estas condiciones de operación, la potencia consumida por agitación es 2,5 MW.

En cuanto al equipo de producción de biomasa ubicado río arriba del estanque acondicionador, los balances de materia basados en la adsorción bacteriana en cuarzo y su demanda dada por la fijación de arsénico sobre biomasa determinaron la necesidad de contar con un biorreactor de 197 m³, de 4,4 m de diámetro y 13,1 m de altura. Para el crecimiento con glucosa y un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) de 250 1/h, se determinó una demanda de oxígeno de 12,8 g/L-h, que nuevamente es cerca de tres veces mayor al máximo reportado para quimiostatos, lo cual se puede atribuir a la alta velocidad específica de crecimiento de la población microbiana en el interior del reactor, y a la elevada demanda de producción de biomasa.

Utilizando tres tasas específicas de aireación (0,2, 0,5 y 0,7 [m³/m³-min]), se determinó un flujo de aire que varía entre 0,66 y 2,3 m³/s, generando una eficiencia de transferencia de oxígeno que varía entre el 12,9 y 3,7%, estando siempre dentro del rango esperado, y siendo mayor para los menores flujos de aire, ya que la mejor eficiencia se alcanza cuando la demanda de oxígeno es satisfecha con el menor flujo de aire.

La potencia consumida al utilizar agitadores de turbina con una velocidad de giro de 50 rpm se determinó para distintas razones D_i/D y para tres valores distintos de VVM. Los resultados se observan en la Figura 43.

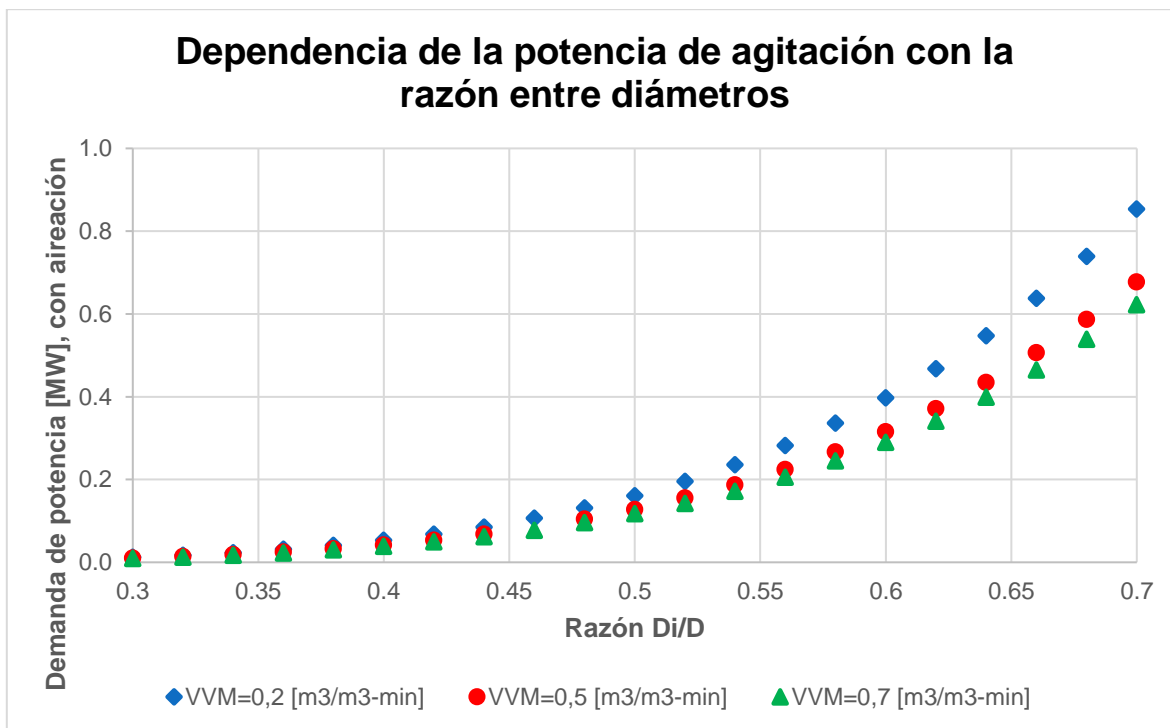


Figura 43: Potencia consumida como función de la razón entre el diámetro del *impeller* y el diámetro del estanque. Se muestran curvas para los valores de VVM iguales a 0,2, 0,5 y 0,7 m³/m³-min.

Igual que en el diseño del proceso de filtros percoladores, el gasto energético de agitación de los reactores responde más sensiblemente al diámetro del *impeller* que a la tasa de aireación. De esta relación se desprende la conveniencia de utilizar menores diámetros de rodete y suministrar la agitación mediante mayores tasas de aireación que generen turbulencia y mejoren la transferencia de masa en el seno del fluido. Al utilizar mayores tasas de aireación no sólo se mejora la transferencia de masa, sino que, al disminuir la densidad y viscosidad de la mezcla del caldo, disminuye el consumo de energía por unidad de tiempo, como se muestra en la curva verde de la Figura 43. Un diagrama de flujos del proceso recién propuesto se encuentra en el Anexo 8.1 (Figura 64).

5.5.3. Evaluación y comparación entre los procesos diseñados

5.5.3.1. Determinación de parámetros de comparación

Con el dimensionamiento de los equipos seleccionados para cada proceso de abatimiento de arsénico, interesa determinar cuál presenta ventajas sobre el otro en términos de la factibilidad de su implementación. De igual importancia que lo anterior, es primordial, a modo de conclusión de este trabajo, determinar las condiciones fisicoquímicas superficiales del microorganismo recombinante que permiten la viabilidad de implementación del proceso que resulte seleccionado de entre los dos diseñados.

Dado lo anterior, es importante conocer la distribución de la demanda energética dentro de los procesos, con el fin de determinar cuál es la etapa crítica en cada uno de ellos en términos del consumo de energía por unidad de tiempo. Para ello, se fijaron condiciones que determinan el consumo energético de los equipos que contienen estanques agitados,

basadas en la relación entre el diámetro del estanque y el diámetro del agitador. En el caso del reactor, se utilizó una razón D_i/D de 0,6, para el estanque de abatimiento se utilizó el valor 0,25 y para el estanque acondicionador se usó el valor 0,5; estos valores fueron escogidos debido a que visualmente representan de mejor manera la proporción entre las potencias consumidas por cada equipo de los procesos. Este análisis se resume en la Figura 44.

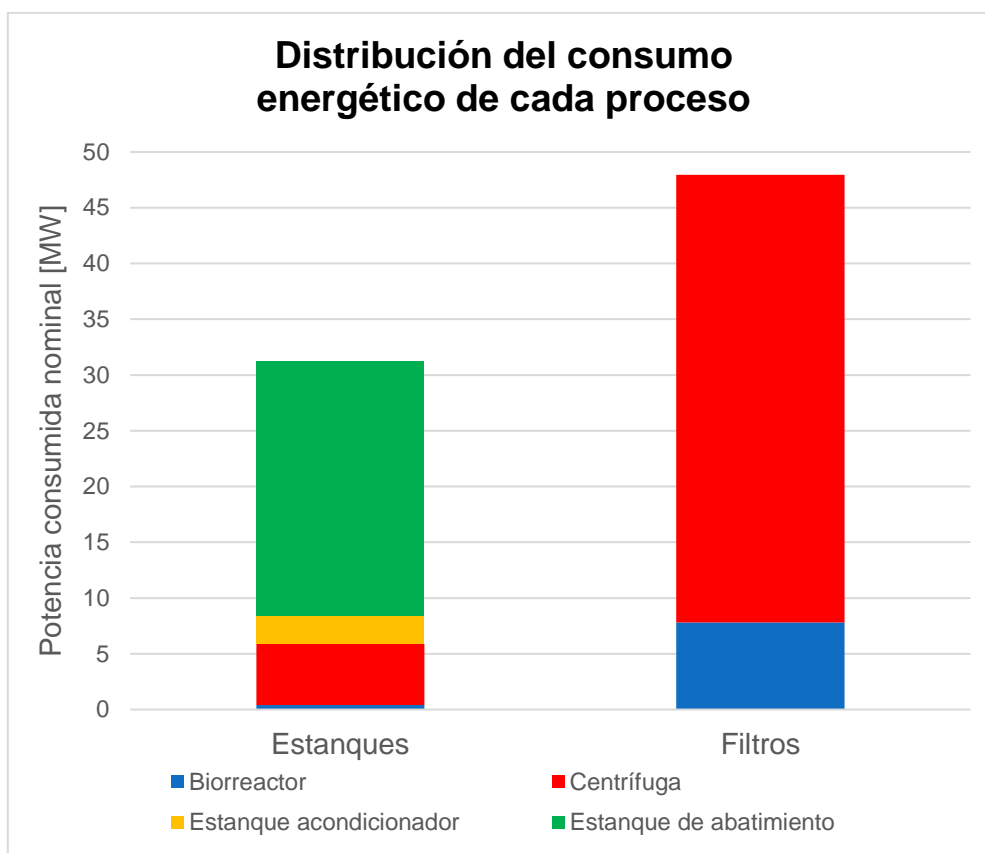


Figura 44: Distribución de la demanda de potencia de cada equipo, según el proceso diseñado en el cual están insertos.

Se observa que el abatimiento de arsénico en estanques es la operación unitaria que demanda más energía para el proceso de abatimiento en estanques agitados, mientras que, en el caso del proceso de abatimiento en filtros, la centrifugación resulta ser la etapa de mayor demanda energética. Es necesario hacer notar que la proporción mostrada en la Figura 44 varía dependiendo de la demanda de producción de biomasa, ya que la potencia consumida por los estanques varía proporcionalmente a la quinta potencia del diámetro del *impeller*, mientras que la potencia que consume la centrifuga es proporcional al cuadrado de su diámetro externo; dado esto, y considerando que los diámetros de los equipos aumentan acorde a la demanda de producción de biomasa, a medida que crece el flujo de cultivo saturado, en ambos procesos ocurre que la preponderancia de la potencia consumida por la centrifuga disminuye y aumenta la importancia de la potencia consumida por la agitación de los estanques.

De manera independiente al flujo, es posible afirmar que la operación de una centrífuga en un proceso de esta magnitud es el punto crítico en términos del consumo energético, y a la vez, es el único equipo encontrado que aplica para ser utilizado en la separación mecánica de partículas tan pequeñas como una bacteria, resultando ser un paso inevitable para el abatimiento de arsénico mediante la estrategia lógica propuesta.

En cuanto a la tecnología utilizada para la producción de biomasa, y dados los resultados reportados en la Figura 40 y en la Figura 43, una buena propuesta es unificar la aireación del cultivo con la agitación, de manera de no depender de la acción de agitadores para la transferencia de oxígeno, ya que consumen cantidades no despreciables de energía bajo ciertas condiciones. Con esto, se propone para una siguiente etapa de dimensionamientos, considerar el diseño de reactores tipo *airlift*, en los cuales no existe agitación mecánica además de la otorgada por el mismo sistema de insuflación de aire.

5.5.3.2. Análisis de sensibilidad

Respecto a los fenómenos fisicoquímicos de superficie, es necesario considerar dos aspectos. Por una parte, los valores de salida del diseño y dimensionamiento de los equipos que incorporan magnitudes de flujos, volúmenes, balances y supuestos, son las energías requeridas por unidad de tiempo para la operación de cada uno de los equipos. Por otro lado, los parámetros que determinan tales magnitudes, a partir de la termodinámica de la transferencia de masa bajo estudio, se reducen a los parámetros de la isoterma de adsorción de arsénico sobre membranas que exponen fitoquelatinas sintéticas. Además, la isoterma de adsorción utilizada para el modelamiento y simulación de ambos procesos no corresponde exactamente a la del fenómeno de transporte involucrado, sino que a un fenómeno similar con especies químicas distintas, cuya interacción se asume relativamente similar.

Con esto, el estudio necesario de realizar para concluir este trabajo converge a un análisis de sensibilidad de las potencias requeridas para la operación de cada proceso como funciones de los parámetros de la isoterma de Freundlich: K_F y m . Cada uno de estos parámetros se varió entre el 100 y 250% del valor reportado por Merrifield en las condiciones más ácidas [78].

Para el estudio de sensibilidad, se comenzó, para ambos procesos, determinando la dependencia de la demanda de biomasa con los parámetros de la isoterma de adsorción de Freundlich. La metodología de determinación de potencia continúa a través de los balances de masa para la determinación de flujos de operación y volúmenes de equipo, que es lo que finalmente determina la potencia consumida. Los detalles de los cálculos se encuentran en el Anexo 8.9 y Anexo 8.10.

En particular, el cálculo del consumo de potencias para las operaciones que involucran estanques posee distintos valores dependiendo de la razón seleccionada entre el diámetro del *impeller* y el diámetro del estanque. Es por esto que, para el cálculo de la potencia de un proceso, se impuso que tal razón tome el valor de 1/3 para el estanque de abatimiento y 1/2 para el estanque de acondicionamiento, ambas partes del proceso de abatimiento en estanques. En el caso de la razón entre diámetros para los reactores, se consideraron los casos en que tal razón toma los valores 0,3, 0,45 y 0,6.

Además de las variaciones recién mencionadas, el análisis de sensibilidad considera tres escenarios respecto al recubrimiento de cuarzo con biomasa: el caso en el que se alcanza el 90% de recubrimiento del total de la superficie disponible, el caso de recubrimiento del 70% de la misma, y finalmente el caso en el que sólo se alcanza a cubrir el 50% del total de superficie.

Con el objetivo posibilitar una comparación cuantitativa del consumo energético de cada proceso, se determinó la potencia total consumida para cada uno de éstos a partir de la suma de las demandas energéticas de los equipos en cada proceso, como función de los valores de K_F y m .

Una vez determinadas las condiciones para el análisis de sensibilidad, se confeccionó una superficie de valores de potencia dependiente de los parámetros de la isoterma de Freunlich, para cada uno de los casos que se listan en la Tabla 7, junto con el valor máximo obtenido.

Tabla 7: Demanda de potencia de los dos procesos de abatimiento de arsénico diseñados, para las distintas combinaciones de recubrimiento de cuarzo y razón de diámetros.

| PROCESO | GRADO RECUBRIMIENTO DEL CUARZO | RAZÓN D_i/D_E | POTENCIA MÍNIMA [MW] | POTENCIA MÁXIMA [MW] |
|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Abatimiento en columnas | 90% | 0,45 | 9,3 | 37,6 |
| | 70% | 0,30 | 6,1 | 28,1 |
| | 70% | 0,45 | 9,1 | 29,0 |
| | 70% | 0,60 | 6,4 | 32,2 |
| | 50% | 0,45 | 3,8 | 20,5 |
| Abatimiento en estanques | 90% | 0,45 | 15,0 | 37,9 |
| | 70% | 0,30 | 9,2 | 29,1 |
| | 70% | 0,45 | 9,2 | 29,2 |
| | 70% | 0,60 | 9,2 | 29,7 |
| | 50% | 0,45 | 9,2 | 29,2 |

A continuación, se muestran los gráficos de la simulación de la condición que generó la superficie de potencias de mayor magnitud para cada uno de los procesos diseñados (Figura 45 y Figura 46). Los análisis de sensibilidad para las demás combinaciones de condiciones se encuentran en el Anexo 8.1.

Potencia para abatimiento en filtros [MW], recubrimiento del 50% y razón $D_i/D=0.45$

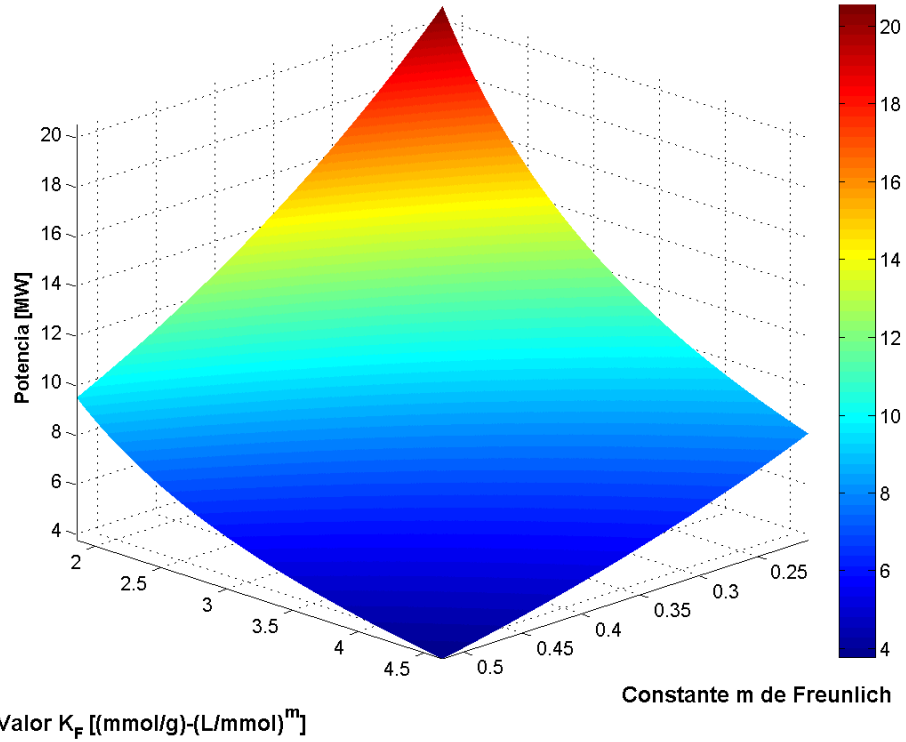


Figura 45: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en filtros percoladores, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 50% y una razón D_i/D igual a 0,45.

Potencia para abatimiento en estanques [MW], recubrimiento del 70% y razón $D_i/D=0.3$

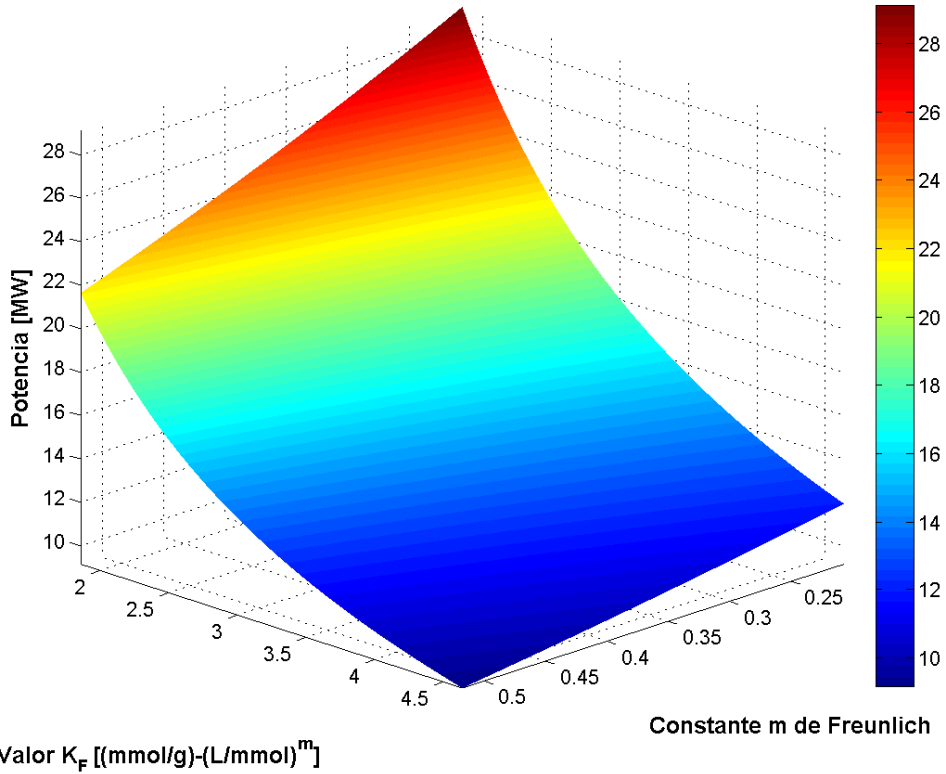


Figura 46: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en estanques agitados, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D_i/D igual a 0,3.

En la Figura 45 y Figura 46 es posible observar que el valor que adquiere la potencia total consumida por ambos procesos crece pronunciadamente a medida que los valores de K_F y m se acercan al mínimo del rango simulado, lo cual era esperable dada la forma que tiene el modelo de Freundlich, y además permite visualizar el requerimiento de altos valores de K_F y m que reflejan un mayor favorecimiento termodinámico de la quelación de arsénico en la superficie celular.

5.5.3.3. Comparación de procesos y selección de las condiciones de factibilidad

La cantidad de energía que consumió EcoMetales a través de la operación del proceso de lixiviación ácida de cenizas y de abatimiento de arsénico y antimonio, suma en total 41444 MW-h [89]; considerando una operación de 300 días al año, la demanda de potencia de los procesos de la empresa alcanza los 5,76 MW. El establecer este mismo valor como el límite superior de consumo energético del abatimiento que utiliza estrategias biológicas diseñado en este trabajo, permite determinar las condiciones que deben cumplir las combinaciones de valores de K_F y m para no sobrepasar el valor de potencia mencionado.

La relación que impone las condiciones sobre el par (K_F, m) puede ser modelada a partir de una regresión sobre la curva de nivel 5,76 MW obtenida de la superficie de potencias generada por la simulación de la única combinación de condiciones que satisface la restricción impuesta: proceso de abatimiento en columnas con 50% de cobertura del área del cuarzo y con una razón de diámetros de 0,45, al ser menor a la potencia total consumida actualmente por ECL.

Dado esto, se determinó la relación de los pares (K_F, m) que generan un consumo de potencia inferior a 5,76 MW sólo para el proceso de abatimiento en filtros percoladores con una demanda de biomasa para recubrir el 50% de la superficie total de cuarzo donde la razón de diámetros del reactor es 0,45. La curva de nivel y la región que satisface las condiciones de máximo valor impuestas se muestran en la Figura 47.

Potencia para abatimiento en filtros [MW], recubrimiento del 50% y razón Di/D=0,45

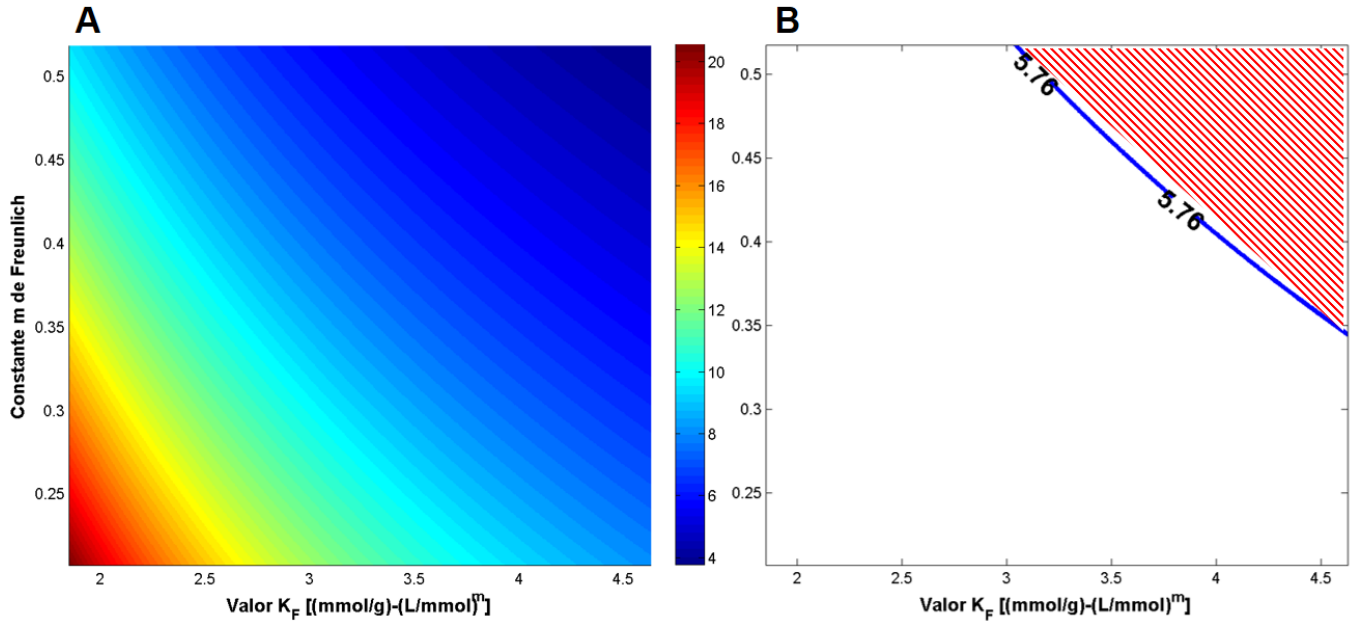


Figura 47: Simulación del proceso de abatimiento en filtros con 50% de recubrimiento y razón de diámetros del reactor de 0,45. A: superficie de potencias, la barra de colores indica magnitud (MW); B: curva de nivel de 5,76 MW, la zona achurada contiene los pares (K_F, m) que generan potencias de consumo inferiores a 5,76 MW.

Al extraer los datos que generan la curva de nivel en el gráfico a la derecha de la Figura 47 (en azul), se realizó una regresión que entregó los siguientes valores con un coeficiente de determinación igual a 1 (Figura 62 en el Anexo 8.1):

Ecuación 9: Ecuación de la curva de nivel 5,76 MW.

$$m(K_F) = 1,1255e^{-0,256 \cdot K_F}$$

Con esto, la región de la superficie de potencias que permite operar el proceso de abatimiento de arsénico con un consumo inferior al límite impuesto está determinada por la siguiente relación de orden en función de los parámetros de la isoterma de Freunlich:

$$m \geq 1,1255e^{-0,256 \cdot K_F}$$

Así, se determinó la relación que debe cumplir K_F y m para que la operación del proceso de abatimiento de arsénico mediante bioacumulación en filtros percoladores sea energéticamente factible.

6. CONCLUSIONES

Primeramente, y en concordancia con los objetivos planteados, se menciona que fue posible diseñar teóricamente cuatro construcciones genéticas capaces de expresar en la superficie celular moléculas con actividad quelante de especies arsenicales; a pesar de esto, en primera instancia no fue posible la implementación de un microorganismo recombinante con capacidad de quelación de arsénico adquirida por la exposición en superficie de fitoquelatinas sintéticas; se presume que las dificultades de ligación de fragmentos de DNA y sus amplificaciones se deben a la naturaleza de sus secuencias, altamente repetitivas y ricas en GC. Dado lo anterior, tampoco fue posible caracterizar las propiedades cinéticas y fisicoquímicas de la adsorción de arsénico en el microorganismo diseñado.

Las primeras conclusiones de la fase experimental del trabajo derivan de los resultados de las experiencias relativas a las técnicas de amplificación de DNA en biología molecular. En primer lugar, la técnica de PCR recursivo resultó ser satisfactoriamente aplicable en las condiciones bajo estudio, sin presentar mayores problemas de amplificaciones inespecíficas ni complicación en la visualización en geles de agarosa por causa del bajo peso molecular de los productos. Respecto a la técnica de OE-PCR, se concluye que existe una fuerte dependencia del resultado con la enzima utilizada, ya que se hace necesario contar con una DNA polimerasa que actúa con *hotstart*. Complementando lo anterior, se afirma que es posible mejorar los resultados de la etapa de amplificación de los OE-PCR mediante la disminución de los tiempos de extensión; también, se reconoce la dificultad que imponen las temperaturas de *annealing* de los partidores en el OE-PCR cuando los partidores son los mismos productos de la etapa de elongación, debido a que tales temperaturas de *annealing* son mayores a la temperatura óptima para la actividad polimerasa de la enzima presente en el mix.

En relación con los métodos de *screening* en placas, se concluye que el método de *blue-white selection* no es efectivo para la detección de transformantes que poseen insertos de longitudes por debajo de los 150 pb dentro de pBluescript II SK(+), por cuanto insertos de bajo peso molecular dentro del marco de lectura de la β -galactosidasa no generan una pérdida completa de su actividad enzimática, generando colonias de coloraciones que resultan en falsos positivos, confirmados como tales a partir de las secuenciaciones.

De manera similar, se afirma que la técnica de ligación *Gibson Assembly* también es poco efectiva cuando los fragmentos de DNA tienen al menos un orden de magnitud de diferencia de longitud, además de verse dificultada cuando existen secuencias altamente repetidas y ricas en GC. A pesar de esto, la ligación de varios fragmentos dividida en etapas parece ser efectiva, según lo que se revela en los geles de electroforesis de amplificación de los productos de *Gibson Assembly*.

Por otro lado, fue posible realizar un estudio bibliográfico de las operaciones unitarias de carácter biotecnológico que pudieren ser incorporadas a la planta de abatimiento de arsénico y antimonio. Este estudio derivó en la conclusión de que el fenómeno determinante es la transferencia de masa por adsorción, y fue posible analogar las

características fisicoquímicas del microorganismo diseñado con las de otro proceso similar, que permitió la concepción de un proceso de abatimiento de arsénico en filtros percoladores, y otro proceso de abatimiento de arsénico en estanques agitados con suspensiones.

Respecto a los cálculos para el dimensionamiento de los equipos, se concluye que a pesar de que las aproximaciones y simplificaciones realizadas resultaron ser bastante cercanas a lo esperado referentes a las conversiones de unidades de biomasa y los valores de parámetros cinéticos utilizados, es necesario realizar pruebas y ensayos de laboratorio y escala piloto bajo las condiciones de cultivo continuo para validar tales supuestos. De manera similar, se concluye sobre el uso de correlaciones y ajustes de parámetros que, a pesar de entregar resultados coherentes con los órdenes de magnitud y dimensiones esperados, no son ecuaciones que expliquen la fenomenología, y se requieren más resultados experimentales a nivel piloto para validar la aplicabilidad de tales relaciones, ya que en particular, las correlaciones relativas a la pérdida de carga en columnas y a la velocidad crítica de agitación para suspensiones completas no reportan haber sido validadas a escala industrial.

El diseño de procesos de abatimiento de arsénico y los consecuentes dimensionamientos de los equipos involucrados en cada uno de ellos, entregaron como parámetro de salida la energía consumida por unidad de tiempo, y fueron estos valores los utilizados para definir la factibilidad de implementación de cada una de las condiciones estudiadas para cada proceso. Así, fue posible determinar que el consumo de potencia es un factor fundamental en la determinación de la viabilidad de implementación de un proceso de abatimiento aguas abajo del proceso AAA; este parámetro obtenido a partir de simulaciones permitió concluir que el proceso de abatimiento de arsénico en estanques agitados no es factible de implementar, y que el proceso de abatimiento en filtros sería factible sólo cuando la cobertura de la superficie adsorbente no supera el 50% y cuando el diámetro del *impeller* del biorreactor de producción de biomasa es 0,45 veces el valor del radio de su estanque.

En relación con lo anterior, la incorporación de una centrífuga hace crecer de manera considerable la potencia de consumo de los procesos, al mismo tiempo que resulta ser una operación insustituible al considerar las tecnologías estudiadas para la separación mecánica de microorganismos bacterianos. Se concluye que hace falta contar con nuevas tecnologías de producción y/o conversión de energía para el suministro energético de equipos de separación centrífuga a escala industrial, lo cual parece ser determinante y decisivo al momento de proyectar la biotecnología en la industria nacional minera.

A modo de proyecciones, se postula la necesidad de continuar con estudios de laboratorio para obtener los plasmidios diseñados mediante estrategias que mantengan la modularidad y estandarizabilidad del diseño aquí propuesto, o bien, recurrir a nuevas tecnologías de síntesis de material génico que permitan conservar las propiedades recién expuestas a precios más asequibles. Por lo pronto, los estudios en biología molecular relativos a esta propuesta requieren de más ensayos para determinar la factibilidad de

ensambladura de cadenas nucleotídicas bajo el mismo diseño experimental ya seguido, con los consecuentes estudios de transformación bacteriana.

Relativo al diseño de equipos, se propone la concepción y diseño de pruebas a escala de laboratorio y piloto para obtener de manera más precisa los parámetros de operación de filtros percoladores cuyos materiales de relleno, flujos de operación y dimensiones sean aplicables a la industria de la minería chilena.

Respecto al diseño de los equipos de producción de biomasa biosorbente, es necesario realizar un refinamiento del escalamiento de los mismos, utilizando parámetros cinéticos de crecimiento más *ad hoc* al microorganismo diseñado en las secciones anteriores y a las fuentes de nutrientes que fueren más factibles de utilizar. Asimismo, se propone en conjunto con lo recién mencionado, el estudio de la transferencia de energía de estos biorreactores, ya teniendo en una siguiente etapa, y utilizando los resultados de ésta, un mayor grado de definición de los materiales, fluidos de intercambio y capacidad de las fuentes de generación de servicios dentro de la planta ya existente.

En relación con lo anterior, se propone el estudio de la factibilidad de la utilización de aguas negras producidas en las dependencias de ECL como potencial fuente de nutrientes para la producción de biomasa, de manera de disminuir los gastos operacionales relativos al abastecimiento de insumos para el cultivo de microorganismos.

En cuanto a aspectos operacionales de las plantas de los procesos auxiliares diseñados para ECL, se propone fuertemente el estudio sobre la desorción y posterior procesamiento de las especies arsenicales adheridas a la biomasa, y también el estudio de la disposición de la biomasa compuesta por organismos genéticamente modificados que pudieren ser incorporados en los procesos tal y como se propone en este trabajo.

Finalmente, y también con relación a la operación del proceso, se propone realizar un estudio detallado de todos los intercambios de calor existentes actualmente en el proceso AAA y también de los propuestos en este documento, con el fin de determinar los posibles ahorros en producción de energía a través de la implementación de *matching* de calor donde fuere posible.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] ECOMETALES LIMITED. Quienes somos | Ecometales [en línea]. <<http://www.ecometales.cl/quienes-somos/>> 2017 [consulta: 17 enero 2017].
- [2] BISSEN, Monique y FRIMMEL, Fritz H. 2003. Arsenic - A review. Part I: Occurrence, toxicity, speciation, mobility. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica [en línea]. 31: 9–18. ISSN 03234320. 10.1002/aheh.200390025
- [3] DAS, Surajit y DASH, Hirak Ranjan. Handbook of metal-microbe interactions and bioremediation [en línea]. 1ª ed. [consulta: 23 abril 2017]. ISBN 9781498762434. <<https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=TvGfDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA267&ots=ZCg1nm27wN&sig=6byZ59vR5ppHu3YAsuZOmizqqfg#v=onepage&q&f=false>>
- [4] FONDEF. Formulación de Proyecto Arsénico EcoMetales. 2016.
- [5] ECOMETALES LIMITED. Reporte de Sustentabilidad 2015 [en línea]. 2015. [consulta: 16 diciembre 2016]. <<http://www.ecometales.cl/wp-content/uploads/2016/08/EcoMetales-11-2015.pdf>>
- [6] ACUÑA, Marcelo. Presentación Proceso PTP/AAA 14. 2016
- [7] ECOMETALES LIMITED. Abatimiento de Arsénico y Antimonio (AAA): la mejor solución ambiental y económica al arsénico en minería. 2017
- [8] LIAO, V.H.C.; Chu, Y.J.; Su, Y.C.; Hsiao, S.Y.; Wei, C.C.; Liu, C.W.; Liao, C.M.; Shen, W.C.; Chang, F.J. 2010. Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. Journal of Contaminant Hydrology [en línea]. 123: 20–29. ISSN 01697722. 10.1016/j.jconhyd.2010.12.003
- [9] SALTIKOV, C.W.; OLSON, B.H. 2002. Homology of Escherichia coli R773 ArsA, ArsB and ArsC genes in Arsenic-Resistant Bacteria Isolated from Raw Sewage and arsenic-enriched creek waters. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY [en línea]. 68: 280–288. 10.1128/AEM.68.1.280
- [10] ROSEN, B.P. 1999. Families of arsenic transporters. Trends in Microbiology [en línea]. 7: 207–212. ISSN 0966842X. 10.1016/S0966-842X(99)01494-8
- [11] CAMPOS, V. L.; León, C.; Mondaca, M. A.; Yañez, J.; Zaror, C. 2011. Arsenic mobilization by epilithic bacterial communities associated with volcanic rocks from Camarones river, Atacama Desert, Northern Chile. Archives of Environmental Contamination and Toxicology [en línea]. 61: 185–192. ISSN 00904341. 10.1007/s00244-010-9601-7
- [12] THORSEN, M.; Perrone, G.G.; Kristiansson, E.; Traini, M.; Ye, T.; Dawes, I.W.; Nerman, O.; Tamás, M.J. 2009. Genetic basis of arsenite and cadmium tolerance in Saccharomyces cerevisiae. BMC genomics [en línea]. 10: 105. ISSN 1471-2164. 10.1186/1471-2164-10-105
- [13] MULLER, D.; Lie, D.; Simeonova, D.D.; Hubert, J-C.; Lett, M-C. 2002. Arsenite Oxidase aox Genes from a Metal-Resistant beta-Proteobacterium. Journal of Bacteriology [en línea]. 185: 135–141. 10.1128/JB.185.1.135

- [14] CAMPOS, V. L.; Escalante, G.; Yañez, J.; Zaror, C. A.; Mondaca, M. A. 2009. Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from a natural biofilm associated to volcanic rocks of Atacama Desert, Chile. *Journal of Basic Microbiology* [en línea]. 49: 93–97. ISSN 0233111X. 10.1002/jobm.200900028
- [15] CAMPOS, V.;Valenzuela, C.; Yarza, P; Kämpfer, P.; Vidal, R.; Zaror, C.; Mondaca, M.A.; Rosselló-Móra, R. 2010. *Pseudomonas arsenicoxydans* sp nov., an arsenite-oxidizing strain isolated from the Atacama desert. *Systematic and Applied Microbiology* [en línea]. 33: 193–197. ISSN 07232020. 10.1016/j.syapm.2010.02.007
- [16] BLUMHOFF, M.L.; Steiger, M.G.; Mattanovich, D.; Sauer, M. 2013. Targeting enzymes to the right compartment: Metabolic engineering for itaconic acid production by *Aspergillus niger*. *Metabolic Engineering* [en línea]. 19: 26–32. ISSN 10967176. 10.1016/j.ymben.2013.05.003
- [17] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Peroxisomes [en línea]. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9930/>> 2000 [consulta: 17 diciembre 2016].
- [18] SILVA GONZAGA, M.I.; Gonzaga Santos, J.A.; Ma, L.Q. 2006. Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. *Scientia Agricola* [en línea]. 63: 90–101. ISSN 0103-9016. 10.1590/S0103-90162006000100015
- [19] MA, L.Q.; Komar, K.M.; Tu, C.; Zhang, W.; Cai, Y.; Kennelley, E.D. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* [en línea]. 409: 579. ISSN 0028-0836. 10.1038/35054664
- [20] WANG,J.; Zhao, F.; Meharg, A.A.; Raab, A.; Feldmann, J.; Mcgrath, S.P. 2002. Mechanisms of Arsenic Hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate and arsenic speciation. *Plant physiology* [en línea]. 130: 1552–1561. ISSN 0032-0889. 10.1104/pp.008185.phate
- [21] TU, S. y MA, L. Q. 2004. Comparison of Arsenic and Phosphate Uptake and Distribution in Arsenic Hyperaccumulating and Nonhyperaccumulating Fern. *Journal of Plant Nutrition* [en línea]. 27: 1227–1242. ISSN 0190-4167. 10.1081/PLN-120038545
- [22] YANG, X.; Chen, H.; Dai, X.J.; Xu, W.Z.; He, Z.Y.; Ma, M. 2009. Evidence of vacuolar compartmentalization of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Chinese Science Bulletin* [en línea]. 54: 4229–4233. ISSN 10016538. 10.1007/s11434-009-0675-4
- [23] ZHAO, F.J. ;Wang, J.R.; Barker, J.H.A.; Schat, H.; Bleeker, P.M.; McGrath, S.P. 2003. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist* [en línea]. 159: 403–410. ISSN 0028646X. 10.1046/j.1469-8137.2003.00784.x
- [24] GRILL, E.; Löffler, S.; Winnacker, E.L.; Zenk, M.H. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

- [en línea]. 86: 6838–6842. ISSN 0027-8424. 10.1073/pnas.86.18.6838
- [25] HA, S-BSmith, A.P.; Howden, R.; Dietrich, W.M.; Bugg, S.; O'Connell, M.J.; Goldsbrough, P.B.; Cobbett, C.S. 1999. Phytochelatin Synthase Genes from Arabidopsis and the Yeast Schizosaccharomyces pombe. *The Plant Cell*. 11: 1153–1163.
- [26] SCHMÖGER, M.E.; Oven, M.; Grill, E. 2000. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant physiology* [en línea]. 122: 793–801. ISSN 0032-0889. 10.1104/pp.122.3.793
- [27] SPAIN, Stephen M.; RABENSTEIN, Dallas L. 2003. Characterization of the acid/base and redox chemistry of phytochelatin analogue peptides. *Analytical Chemistry* [en línea]. 75: 3712–3719. ISSN 00032700. 10.1021/ac0207426
- [28] BIONDO, R.; Da Silva, F.A.; Vicente, E.J.; Souza Sarkis, J.E.; Schenberg, A.C.G. 2012. Synthetic phytochelatin surface display in cupriavidus metallidurans CH34 for enhanced metals bioremediation. *Environmental Science and Technology* [en línea]. 46: 8325–8332. ISSN 0013936X. 10.1021/es3006207
- [29] HERAS, B.; Totsika, M.; Peters, K.M.; Paxman, J.J.; Gee, C.L.; Jarrott, R.J.; Perugini, M.A.; Whitten, A.E.; Schembri, M.A. 2014. The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea]. 111: 457–62. ISSN 1091-6490. 10.1073/pnas.1311592111
- [30] METCALF y EDDY. 2003. *Wastewater Engineering - Treatment and Reuse*. 4^a ed. 1819 p.
- [31] GARG, N.; SINGLA, P. 2011. Arsenic toxicity in crop plants: Physiological effects and tolerance mechanisms. *Environmental Chemistry Letters* [en línea]. 9: 303–321. ISSN 16103653. 10.1007/s10311-011-0313-7
- [32] GHOSH, M.; Shen, J.; Rosen, B.P.; Kaback, H.R. 1999. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae* (ACR3YCF1Sb(III)resistanceABC transporters). *Cell Biology* [en línea]. 96: 5001–5006. ISSN 0027-8424. 10.1073/pnas.96.9.5001
- [33] TONG, Y.P.; Kneer, R.; Zhu, Y.G. 2004. Vacuolar compartmentalization: A second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science* [en línea]. 9: 7–9. ISSN 13601385. 10.1016/j.tplants.2003.11.009
- [34] NOVAGEN. pET-22b (+) Vector [en línea]. 2013. <<http://wolfson.huji.ac.il/expression/commercial-vectors/pet-22b-map.pdf>>
- [35] AGILENT TECHNOLOGIES. pET Expression Systems - Details & Specifications [en línea]. <<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pagelId=472>> 2017 [consulta: 24 enero 2017].
- [36] MICROBUSTERS - IGEM 2015. Ag43 secretion system. iGEM 2015 [en línea]. <http://2015.igem.org/Team:HokkaidoU_Japan/ag43> 2015 [consulta: 24 enero 2017].

- [37] ROYANT, A.; NOIRCLERC-SAVOYE, M. 2011. Stabilizing role of glutamic acid 222 in the structure of Enhanced Green Fluorescent Protein. *Journal of Structural Biology* [en línea]. 174: 385–390 [consulta: 2 enero 2017]. ISSN 10478477. 10.1016/j.jsb.2011.02.004
- [38] SCHRÖDINGER. Supported Operating Systems and Hardware | www.pymol.org [en línea]. <<http://pymol.org/support/platforms>> [consulta: 24 enero 2017].
- [39] CHEN, X.; Zaro, J.L.; Shen, W.C. 2013. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews* [en línea]. 65: 1357–1369. ISSN 0169409X. 10.1016/j.addr.2012.09.039
- [40] WIRED CHEMIST - CHEMISTRY DATA. Common Bond Energies (D) and bond lengths (r) [en línea]. <http://www.wiredchemist.com/chemistry/data/bond_energies_lengths.html> 2017 [consulta: 2 enero 2017].
- [41] PRODROMOU, C.; PEARL, L.H. 1992. Recursive PCR: A novel technique for total gene synthesis. *Protein Engineering, Design and Selection* [en línea]. 5: 827–829. ISSN 17410126. 10.1093/protein/5.8.827
- [42] NEW ENGLAND BIOLABS INC. PCR Protocol for Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (M0530) | NEB [en línea]. <<https://www.neb.com/protocols/1/01/01/pcr-protocol-m0530>> 2017 [consulta: 15 marzo 2017].
- [43] HORTON, R.M.; Hunt, H.D.; Ho, S.N.; Pullen, J.K.; Pease, L.R. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* [en línea]. 77: 61–68. ISSN 03781119. 10.1016/0378-1119(89)90359-4
- [44] NOVAGEN. KOD Hot Start DNA Polymerase [en línea]. [consulta: 19 marzo 2017]. <http://www.protocol-online.org/forums/uploads/monthly_01_2010/post-3573-1264028806.ipb>
- [45] AGILENT TECHNOLOGIES. pBluescript II Phagemid Vectors Instruction Manual [en línea]. sin fecha. [consulta: 8 junio 2017]. <<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/212205.pdf>>
- [46] GIBSON, D.G.; Young, L.; Chuang, R-Y.; Venter, J.C.; Hutchison, C.A.; Smith, H.O.; Lii, C.A.H. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* [en línea]. 6: 343–5. ISSN 1548-7105. 10.1038/nmeth.1318
- [47] NEW ENGLAND BIOLABS. Gibson Assembly Cloning Kit Instruction Manual [en línea]. [consulta: 9 junio 2017]. <[https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/E13C03EA3FE14F12BEA0A0ECE9490093/Datacards or Manuals/ManualE5510.pdf](https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/E13C03EA3FE14F12BEA0A0ECE9490093/Datacards%20or%20Manuals/ManualE5510.pdf)>
- [48] NEW ENGLAND BIOLABS. What are the strain properties (C2527)? [en línea]. <<https://www.neb.com/faqs/1/01/01/what-are-the-strain-properties-c2527>> [consulta: 16 junio 2017].
- [49] NEW ENGLAND BIOLABS. Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (M0202) | NEB

- [en línea]. <<https://www.neb.com/protocols/1/01/01/dna-ligation-with-t4-dna-ligase-m0202>> 2017 [consulta: 8 septiembre 2017].
- [50] NEW ENGLAND TECHNOLOGIES. What are the strain properties (C3019)? | NEB [en línea]. <<https://www.neb.com/faqs/1/01/01/what-are-the-strain-properties-c3019>> 2017 [consulta: 16 junio 2017].
- [51] PROMEGA. 2007. GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase Protocol - Promega. aReactions. 7801: 8–9.
- [52] ADDGENE - THE NONPROFIT PLASMID REPOSITORY. pET-22b(+) - Addgene Vector Database (Plasmids, Expression Vectors, etc) [en línea]. <<https://www.addgene.org/vector-database/2554/>> 2017 [consulta: 16 junio 2017].
- [53] THERMOFISCHER SCIENTIFIC. Electrocompetent Cells [en línea]. <<https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/electrocompetent-cells.html>> 2017 [consulta: 23 septiembre 2017].
- [54] THERMOFISCHER SCIENTIFIC. Chemically Competent Cells [en línea]. <<https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/chemically-competent.html>> 2017 [consulta: 23 septiembre 2017].
- [55] DHAR, R.K.; Zheng, Y.; Rubenstone, J. Van Geen, A. 2004. A rapid colorimetric method for measuring arsenic concentrations in groundwater. *Analytica Chimica Acta* [en línea]. 526: 203–209. ISSN 00032670. 10.1016/j.aca.2004.09.045
- [56] INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES. Codon Optimization Tool [en línea]. <<https://www.idtdna.com/CodonOpt>> 2016 [consulta: 22 diciembre 2016].
- [57] HODAR, Christian. Técnicas de detección de Ácidos Nucleicos. 2016
- [58] THERMO SCIENTIFIC. 2015. Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit [en línea]. [consulta: 15 marzo 2017]. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_UG.pdf>
- [59] NORTHWESTERN BIOTOOLS. OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator [en línea]. <<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>> [consulta: 20 diciembre 2016].
- [60] OMEGA BIO-TEK. E.Z.N.A. Gel Extraction Kit [en línea]. 2012. [consulta: 17 julio 2017]. <http://2015.igem.org/wiki/images/6/62/NUDT_CHIAN-Protoco2.pdf>
- [61] PALMER, J.; Flint, S.; Brooks, J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [en línea]. 34: 577–588. ISSN 13675435. 10.1007/s10295-007-0234-4
- [62] KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* [en línea]. 42: 9–27 [consulta: 24 abril 2017]. <http://dl.iran-mavad.com/sell/trans/en/Significance_of_microbial_biofilms_in_food_industry_a_review.pdf>

- [63] SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY. SYMPOSIUM (59TH: 2000: EXETER, England) et al. 2000. Community structure and co-operation in biofilms [en línea]. 59ª ed. Cambridge University Press. 349 p. [consulta: 24 abril 2017]. ISBN 9780521793025. <[https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=nU0AuP0Zv2AC&oi=fnd&pg=PA37&dq=Davies+DG+\(2000\)+Physiological+events+in+biofilm+formation.+In:+Allison+D,+Gilbert+P,+Lappin-Scott+M,+Wilson+M+\(eds\)+Community+structure+and+co-operation+in+biofilms,+pp+37-51&ots](https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=nU0AuP0Zv2AC&oi=fnd&pg=PA37&dq=Davies+DG+(2000)+Physiological+events+in+biofilm+formation.+In:+Allison+D,+Gilbert+P,+Lappin-Scott+M,+Wilson+M+(eds)+Community+structure+and+co-operation+in+biofilms,+pp+37-51&ots)>
- [64] PRATT, L.A.; KOLTER, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* [en línea]. 30: 285–293 [consulta: 24 abril 2017]. 10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x
- [65] DUNNE, W.M. 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Bio Films Lately? *Clinical Microbiology reviews* [en línea]. 15: 155–166. ISSN 0893-8512, 1098-6618. 10.1128/CMR.15.2.155
- [66] RIJNAARTS, H.H.M.; Norde, W.; Lyklema, J.; Zehnder, A.J.B. 1999. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [en línea]. 14: 179–195. ISSN 09277765. 10.1016/S0927-7765(99)00035-1
- [67] POORTINGA, A.T.; Bos, R.; Norde, W.; Busscher, H.J. 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces [en línea]. 1-32 p. ISBN 3150363314. 10.1016/S0167-5729(02)00032-8
- [68] SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY. SYMPOSIUM (59TH: 2000: EXETER, England) et al. Physiological events in biofilm formation. En: Community structure and co-operation in biofilms [en línea]. Cambridge University Press, 2000 [consulta: 25 abril 2017], p. 349. ISBN 9780521793025. <[https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=nU0AuP0Zv2AC&oi=fnd&pg=PA37&dq=Davies+DG+\(2000\)+Physiological+events+in+biofilm+formation.+In:+Allison+D,+Gilbert+P,+Lappin-Scott+M,+Wilson+M+\(eds\)+Community+structure+and+co-operation+in+biofilms,+pp+37%2525E2%252](https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=nU0AuP0Zv2AC&oi=fnd&pg=PA37&dq=Davies+DG+(2000)+Physiological+events+in+biofilm+formation.+In:+Allison+D,+Gilbert+P,+Lappin-Scott+M,+Wilson+M+(eds)+Community+structure+and+co-operation+in+biofilms,+pp+37%2525E2%252)>
- [69] VERRAN, J.; Airey, P.; Whitehead, K.A. 2006. Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces. *Food and Bioproducts Processing* [en línea]. 84: 260–264. ISSN 09603085. 10.1205/fbp06036
- [70] WANG, Z.R.; Wang, W.L.; Zhu, X.Y.; Wang, J.L.; Han, Z.J.; Hua, Y. 2014. Adsorption-Desorption Characteristics of *E.coli* by Quartz Sands of Different Particle Size. *Advanced Materials Research* [en línea]. 955–959: 436–444. ISSN 1662-8985. 10.4028/www.scientific.net/AMR.955-959.436
- [71] GILBERT, P.; Evans, D.J.; Evans, E.; Duguid, I.G.; Brown, M.R.W. 1991. Surface Characteristics and Adhesion of *Escherichia-Coli* and *Staphylococcus-Epidermidis*. *Journal of Applied Bacteriology*. 71: 72–77. ISSN 0021-8847.
- [72] LYTLE, D.A.; Rice, E.W.; Johnson, C.H.; Fox, K.R.; Fox, K.I.M.R. 1999. Electrophoretic Mobilities of *Escherichia coli* O157 : H7 and Wild-Type *Escherichia coli* Strains Electrophoretic Mobilities of *Escherichia coli* O157 : H7 and Wild-Type

Escherichia coli Strains. 65: 3222–3225.

- [73] CELL BIOLOGY BY THE NUMBERS. » How big is an E. coli cell and what is its mass? [en línea]. <<http://book.bionumbers.org/how-big-is-an-e-coli-cell-and-what-is-its-mass/>> [consulta: 5 junio 2017].
- [74] MILLS, A.L.; Herman, J.S.; Hornberger, G.M.; DeJesus, T.H. 1994. Effect of solution ionic strength and iron coatings on mineral grains on the sorption of bacterial cells to quartz sand. Applied and Environmental Microbiology. 60: 3300–3306. ISSN 00992240.
- [75] AKHAVAN, Amir Chossrow. The Quartz Page: Chemical Properties [en línea]. <http://www.quartzpage.de/gen_chem.html> 2015 [consulta: 31 julio 2017].
- [76] HOOSHYARI, Ghaem. 2017. EVALUATING FILTER MATERIALS FOR E. Coli REMOVAL FROM STORMWATER [en línea]. South Dakota State University. 10.13140/RG.2.2.17587.22563
- [77] SOOSAIPRAKASAM, I.R.; VEAWAB, A. 2008. Corrosion and polarization behavior of carbon steel in MEA-based CO₂ capture process. International Journal of Greenhouse Gas Control [en línea]. 2: 553–562. ISSN 17505836. 10.1016/j.ijggc.2008.02.009
- [78] MERRIFIELD, J.D.; Davids, W.G.; MacRae, J.D.; Amirbahman, A. 2004. Uptake of mercury by thiol-grafted chitosan gel beads. Water Research [en línea]. 38: 3132–3138. ISSN 00431354. 10.1016/j.watres.2004.04.008
- [79] KUNII, Daizo y LEVENSPIEL, Octave. 1991. Fluidization Engineering. 2^a ed. 491 p.
- [80] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2000. Wastewater Technology Fact Sheet -Trickling Filter Nitrification [en línea]. : 1–7. ISSN <null>. EPA 832-F-99-062
- [81] SEADER, J.D.; Henley, Ernest J.; Roper, D. Keith 2011. Separation Process Principles. 3^a ed. 821 p.
- [82] BELTER, Paul A.; Cussler, E.L.; Hu, Wei-Shou. 1988. Bioseparations: downstream processing for biotechnology. 398 p.
- [83] PERRY, Robert H. y GREEN, Don W. 2008. Perry's Chemical Engineers' Handbook [en línea]. Octava. 2400 p. ISBN 9788578110796. 10.1017/CBO9781107415324.004
- [84] MCCABE, Warren L.; Smith, Julian C.; Harriott, Peter. 1991. Operaciones Unitarias en Ingeniería Química. 4^a ed. Madrid, España. McGraw Hill. 1112 p.
- [85] ACEVEDO, Fernando; Gentina, Juan Carlos; Illanes, Andrés. 2002. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. 347 p.
- [86] KOVAROVA-KOVAR, K.; EGLI, T. 1998. Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. [en línea]. 62: 646–666. ISSN 1092-2172. <<http://mibr.asm.org/cgi/content/abstract/62/3/646>><<http://mibr.asm.org/cgi/content/full/62/3/646>>

- [87] CELL BIOLOGY BY THE NUMBERS. What is the concentration of bacterial cells in a saturated culture? [en línea]. <<http://book.bionumbers.org/what-is-the-concentration-of-bacterial-cells-in-a-saturated-culture/>> [consulta: 16 agosto 2017].
- [88] ZWIETERING, Th.N. 1958. Suspending of solid particles in liquid by agitators. Chemical Engineering Science [en línea]. 8: 244–253. ISSN 00092509. 10.1016/0009-2509(58)85031-9
- [89] ECOMETALES LIMITED. Reporte Sustentabilidad 2016. 2016.
- [90] SYDOW, U.; Sempf, K.; Herrmann, M.; Schneider, M.; Kleebe, H. J.; Michaelis, A. 2013. Electrochemical corrosion of liquid phase sintered silicon carbide ceramics. Materials and Corrosion [en línea]. 64: 218–224. ISSN 09475117. 10.1002/maco.201106283
- [91] CHENG, H.; Hu, Y.; Luo, J.; Xu, B.; Zhao, J. 2009. Geochemical processes controlling fate and transport of arsenic in acid mine drainage (AMD) and natural systems. Journal of Hazardous Materials [en línea]. 165: 13–26. ISSN 03043894. 10.1016/j.jhazmat.2008.10.070
- [92] FAGNANI, Danielle. Biological activity and environmental removal of Benzo(a)pyrene, the most carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon [en línea]. <<http://cheminfo2010.wikispaces.com/Danielle+Fagnani-+final+project>> 2010 [consulta: 16 diciembre 2016].
- [93] YAP, B.H.J.; Martin, G.J.O.; Scales, P.J. 2016. Rheological manipulation of flocculated algal slurries to achieve high solids processing. Algal Research [en línea]. 14: 1–8. ISSN 22119264. 10.1016/j.algal.2015.12.007
- [94] CELL BIOLOGY BY THE NUMBERS. What is the elemental composition of a cell? [en línea]. <<http://book.bionumbers.org/what-is-the-elemental-composition-of-a-cell/>> [consulta: 21 agosto 2017].

8. ANEXOS

8.1. Anexo A – Imágenes y gráficos

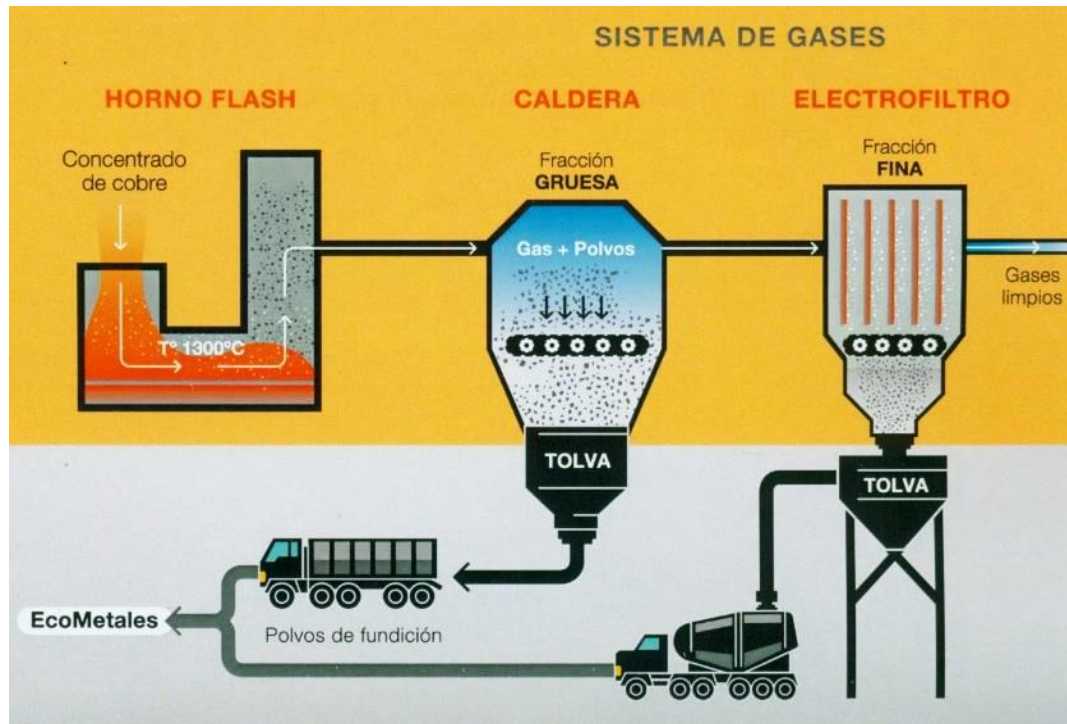


Figura 48: Imagen del proceso de lixiviación ácida de los polvos de fundición [6].

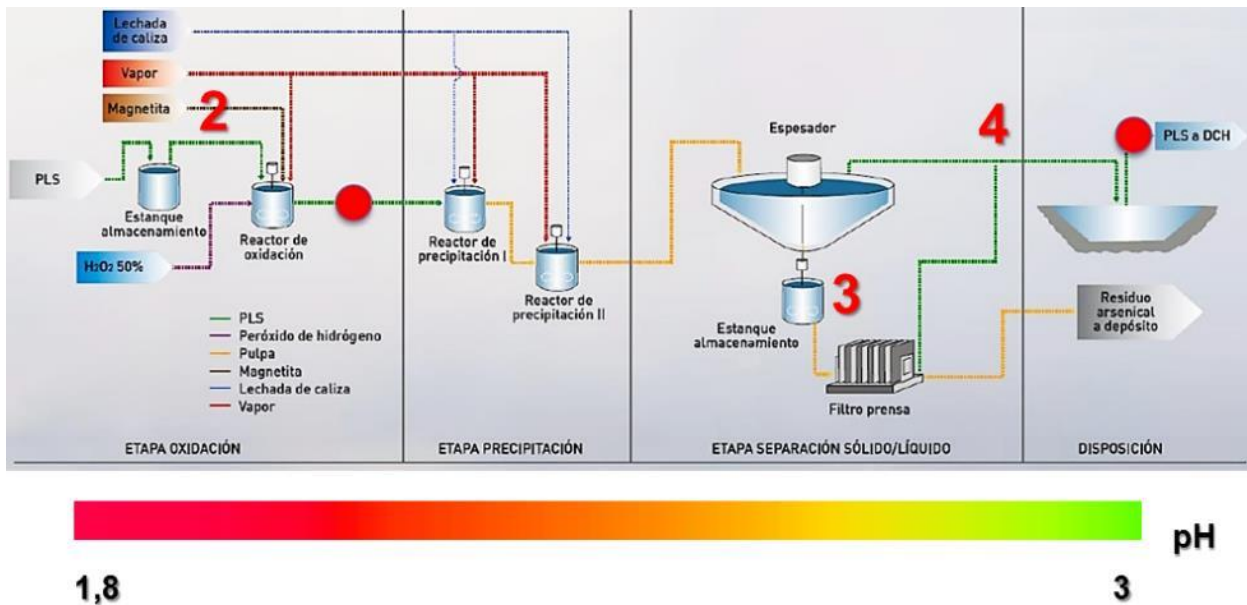


Figura 49: Imagen de los puntos de intervención biotecnológica propuestos por la empresa. Se ilustra abajo la variación de pH desde el inicio al final del proceso. El punto 1 que se propone está en el proceso de lixiviación ácida de los polvos de fundición (no referenciado). El punto 4 corresponde al cual se pretende estudiar e intervenir en este trabajo [6]. Imagen modificada.

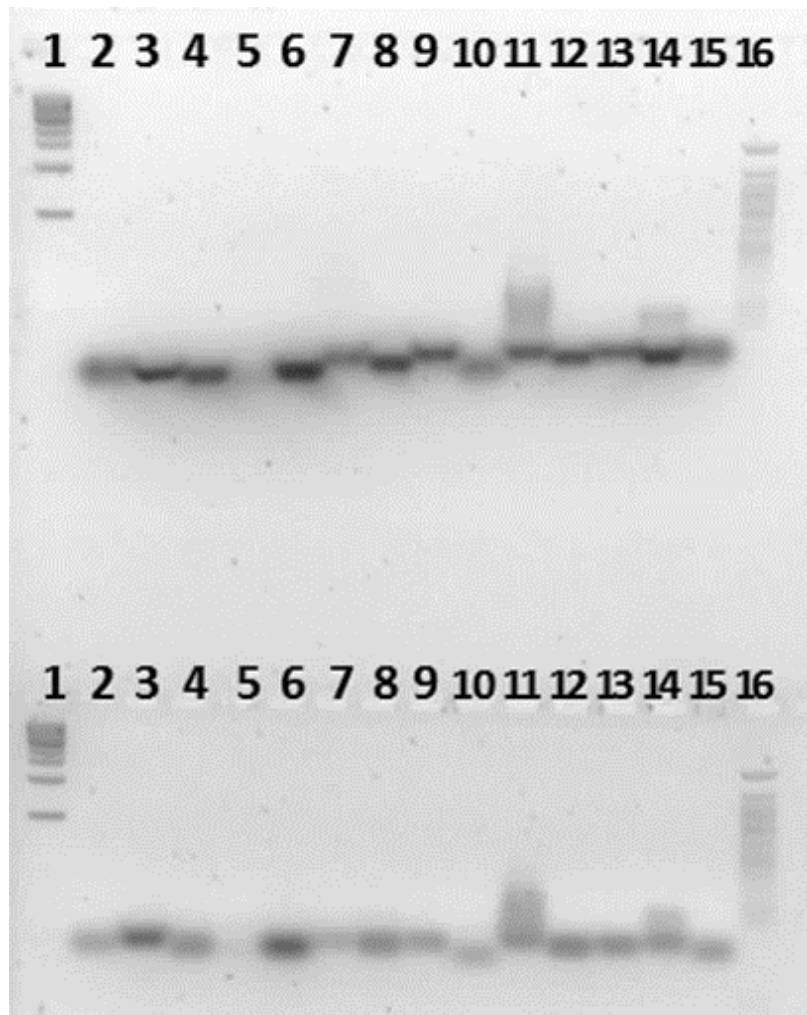


Figura 50: Fotografía del gel de electroforesis (agarosa 2% por 45 minutos a 80 V) para visualización del estado de integridad de los partidores. Carril 1 y 16: 1kb y 50bp *ladder*, respectivamente. Los carriles 5 superior e inferior contienen la muestra correspondiente a los stocks del partidor EGFP-F 5 μ M y 100 μ M, respectivamente. Se observa que se encuentran degradados casi en su totalidad.

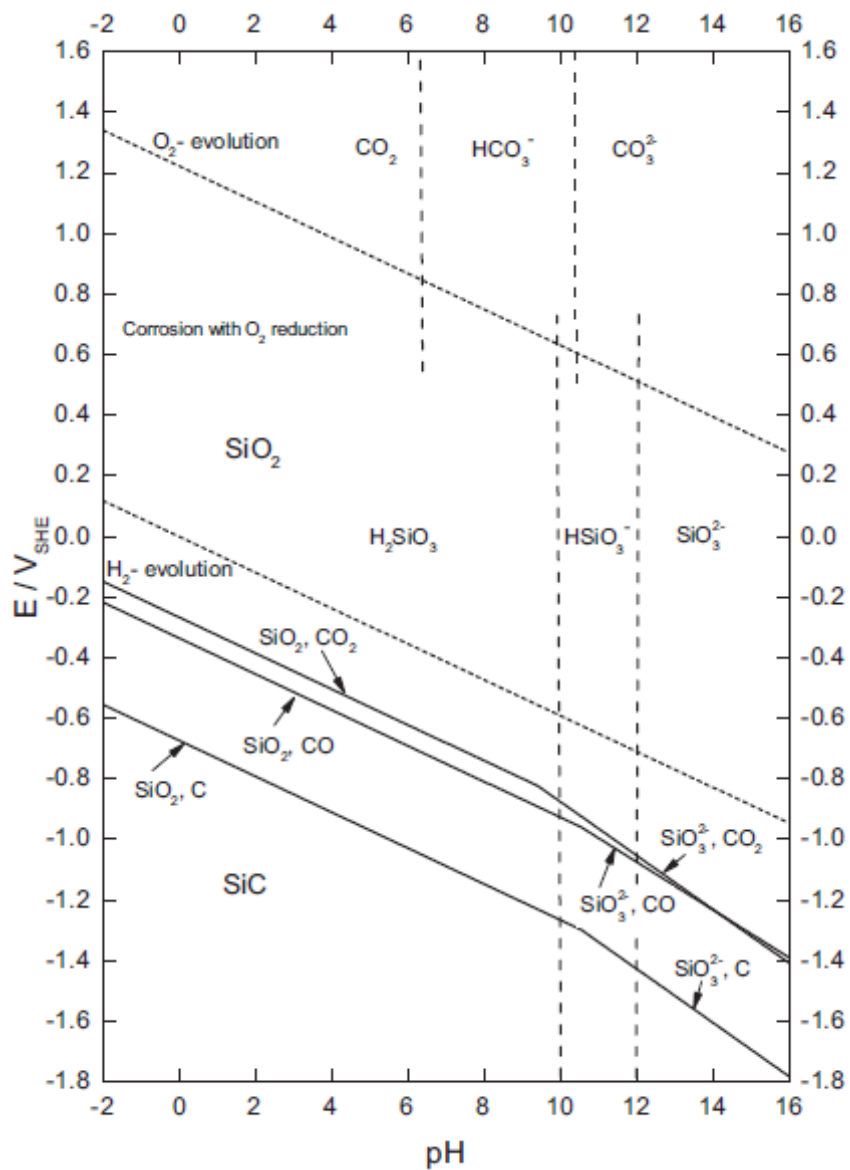


Figura 51: Diagrama de Pourbaix para el sistema SiC/SiO₂ (10⁻⁶ M para especies solubles). Las líneas discontinuas verticales muestran la predominancia de dióxido de carbono /carbonatos y la de dióxido de silicio/silicatos [90].

Potencia para abatimiento en filtros [MW], recubrimiento del 90% y razón $D_i/D=0.45$

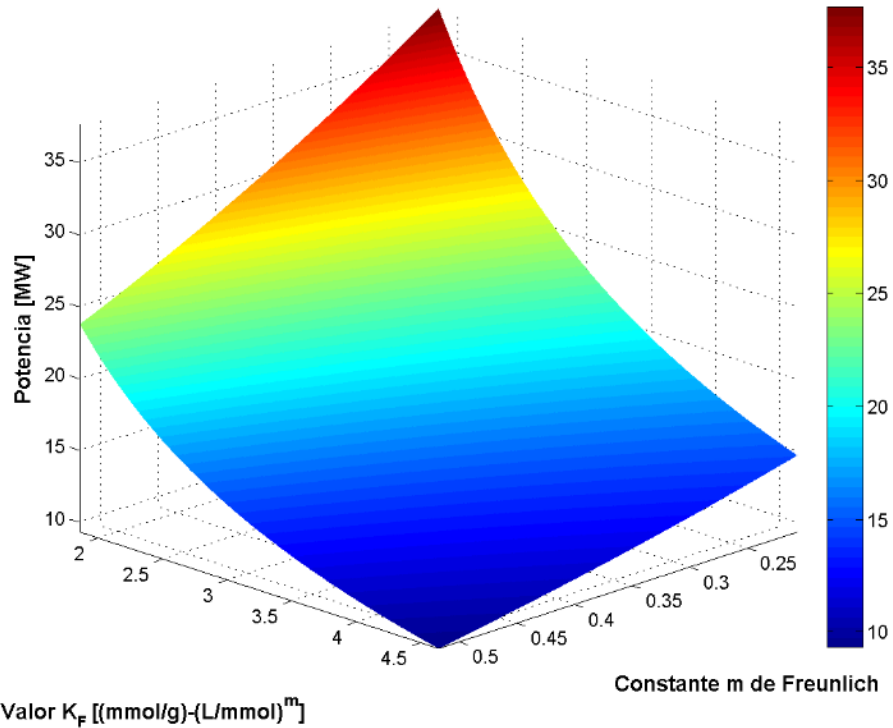


Figura 54: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en filtros percoladores, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 90% y una razón D_i/D igual a 0,45.

Potencia para abatimiento en filtros [MW], recubrimiento del 70% y razón $D_i/D=0.3$

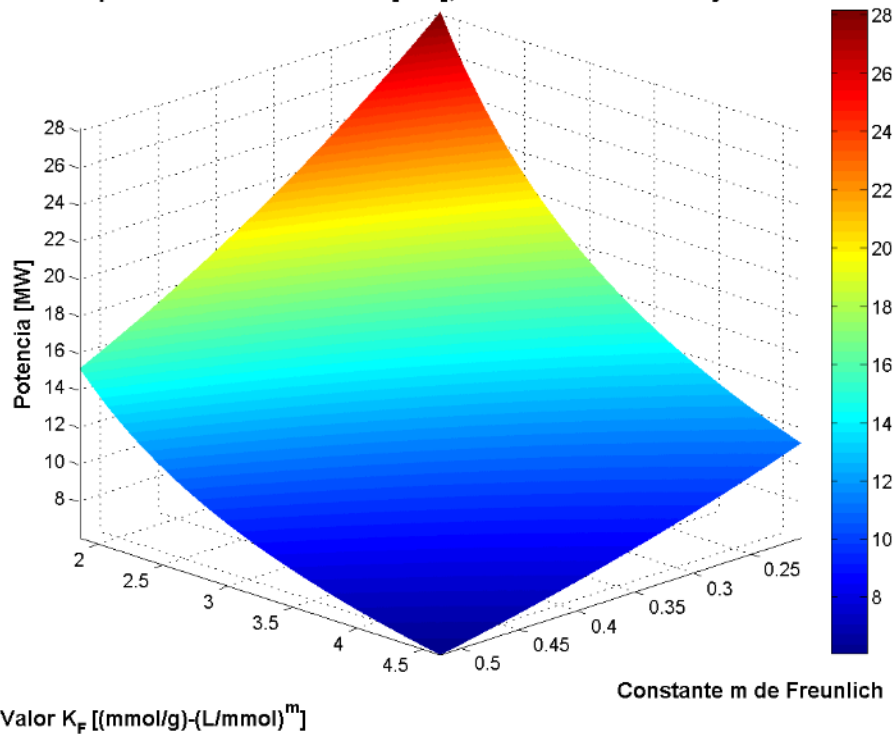


Figura 55: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en filtros percoladores, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D_i/D igual a 0,3.

Potencia para abatimiento en filtros [MW], recubrimiento del 70% y razón $D_i/D=0.45$

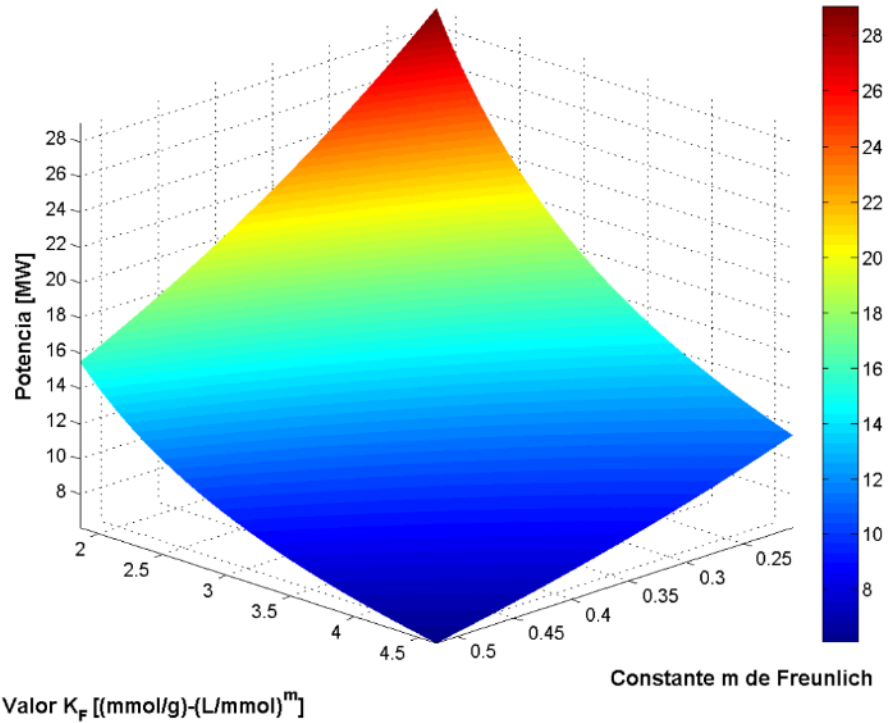


Figura 56: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en filtros percoladores, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D_i/D igual a 0,45.

Potencia para abatimiento en filtros [MW], recubrimiento del 70% y razón $D_i/D=0.6$

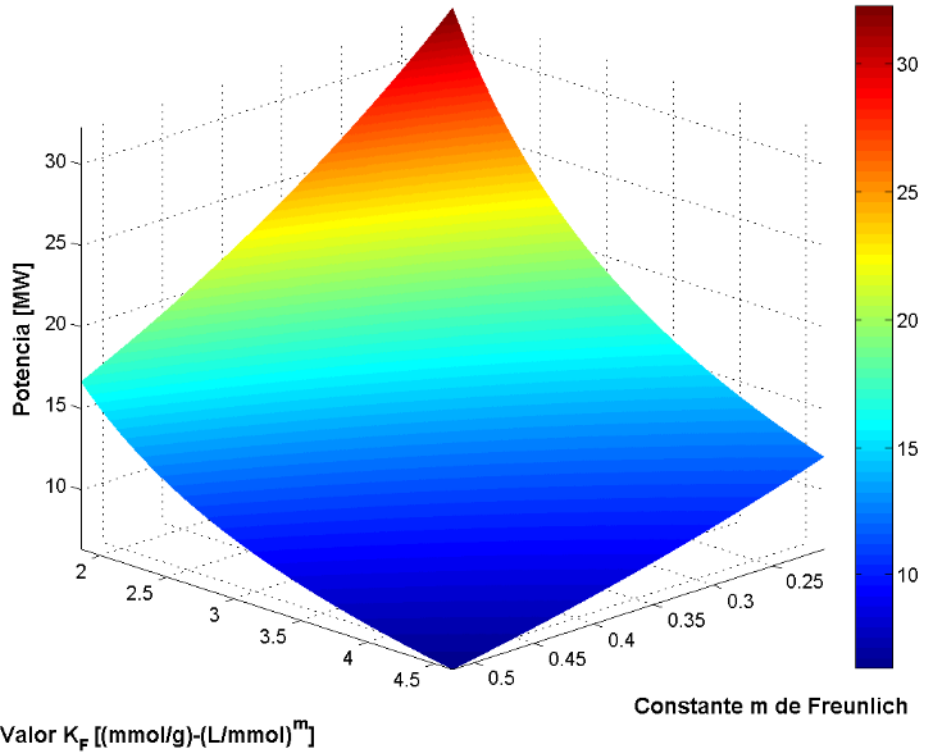


Figura 57: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en filtros percoladores, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D_i/D igual a 0,6.

Potencia para abatimiento en estanques [MW], recubrimiento del 90% y razón $D_i/D=0.45$

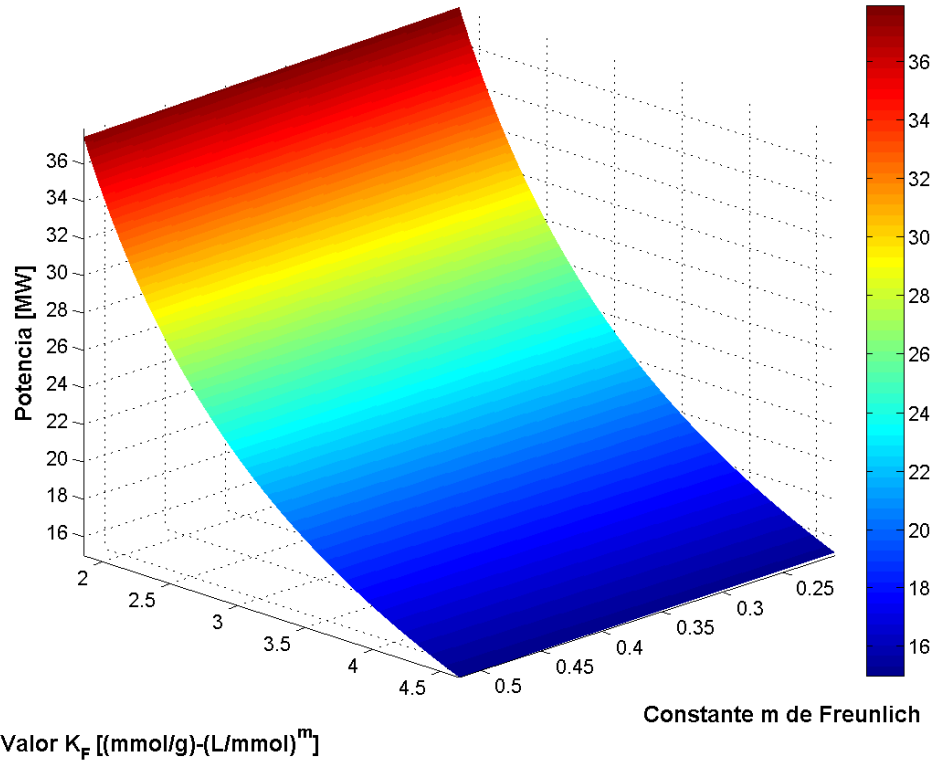


Figura 58: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en estanques agitados, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 90% y una razón D_i/D igual a 0,45.

Potencia para abatimiento en estanques [MW], recubrimiento del 70% y razón $D_i/D=0.45$

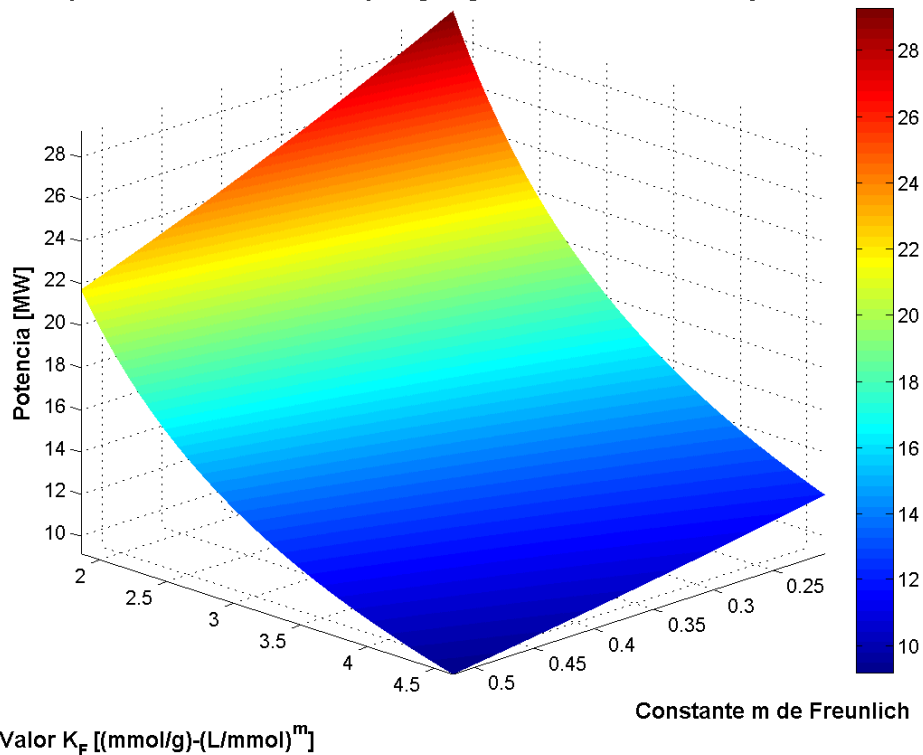


Figura 59: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en estanques agitados, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D_i/D igual a 0,45.

Potencia para abatimiento en estanques [MW], recubrimiento del 70% y razón $D_i/D=0.6$

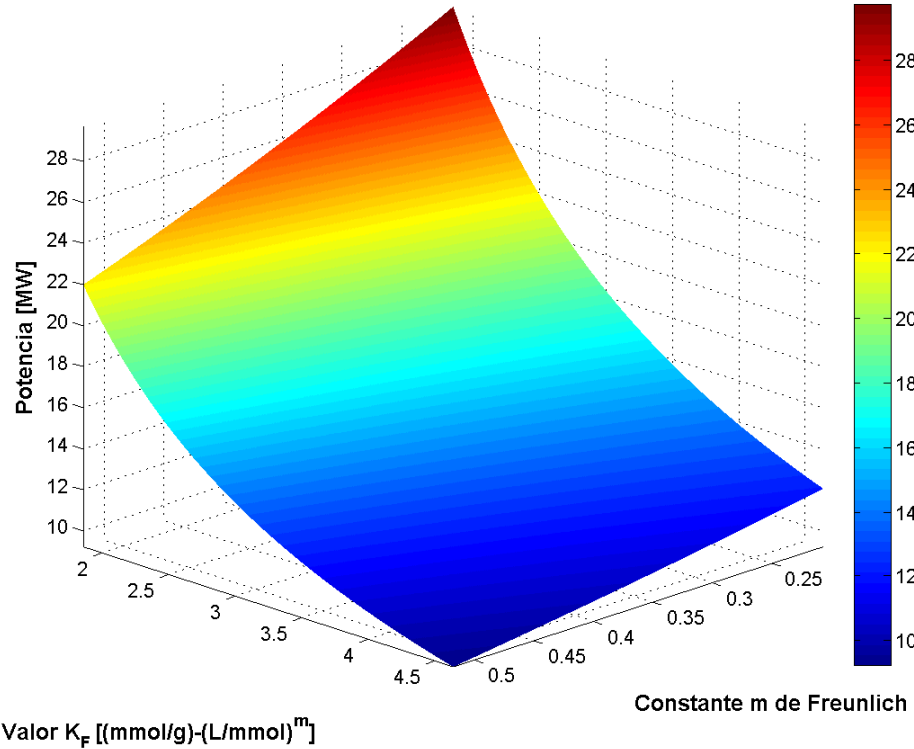


Figura 60: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en estanques agitados, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 70% y una razón D_i/D igual a 0,6.

Potencia para abatimiento en estanques [MW], recubrimiento del 50% y razón $D_i/D=0.45$

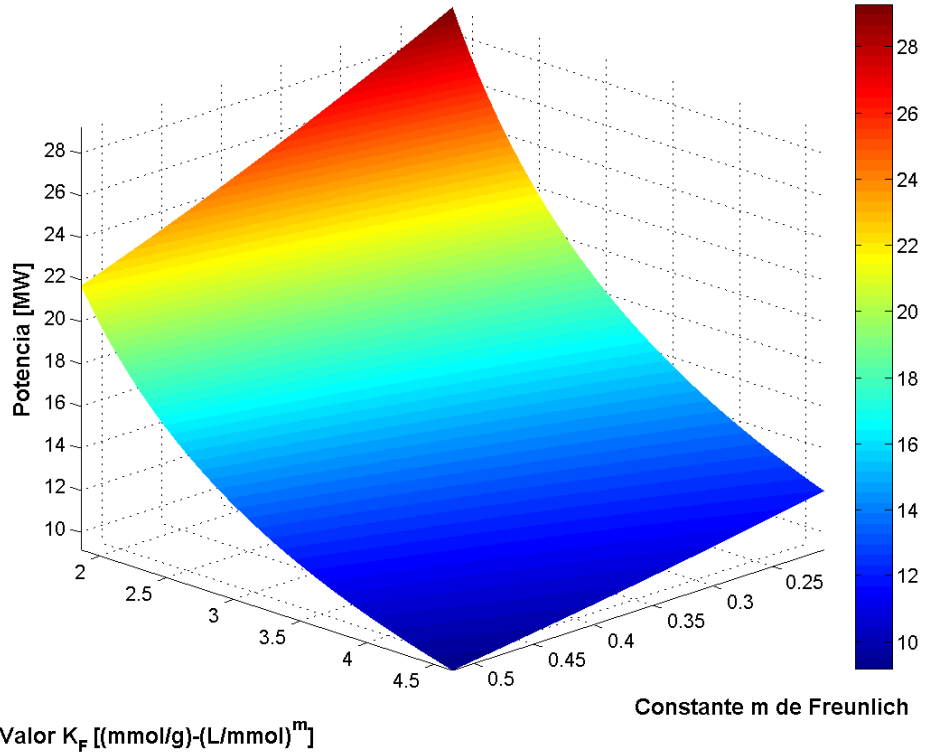


Figura 61: Análisis de sensibilidad de la potencia de consumo del proceso de abatimiento en estanques agitados, con un recubrimiento de la superficie de cuarzo del 50% y una razón D_i/D igual a 0,45.

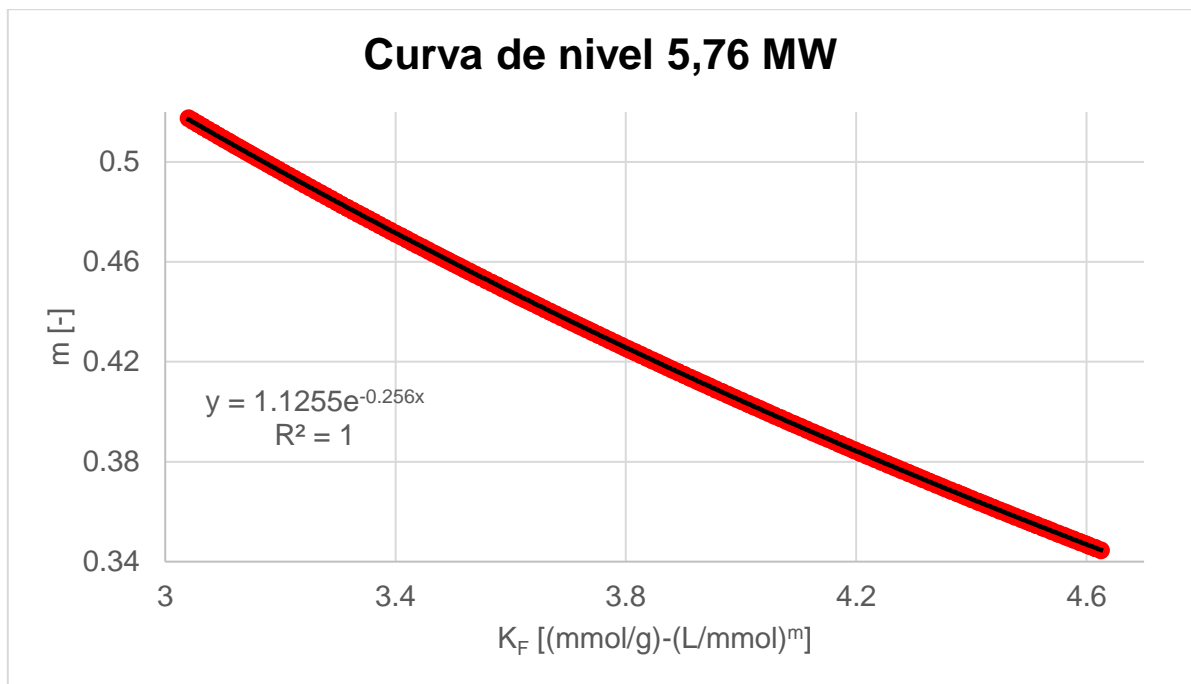


Figura 62: Curva de nivel 5,76 MW obtenida de la superficie de potencias como función de los parámetros de la isoterma de Freundlich, para el proceso de abatimiento de arsénico en filtros que tienen el 50% de su superficie interna recubierta con biomasa producida en un biorreactor cuya razón de diámetros es 0,45. En rojo se observa los datos extraídos directamente de la curva de nivel bajo estudio; en negro se muestra una regresión exponencial cuya ecuación se muestra en el interior del gráfico, con un $R^2=1$.

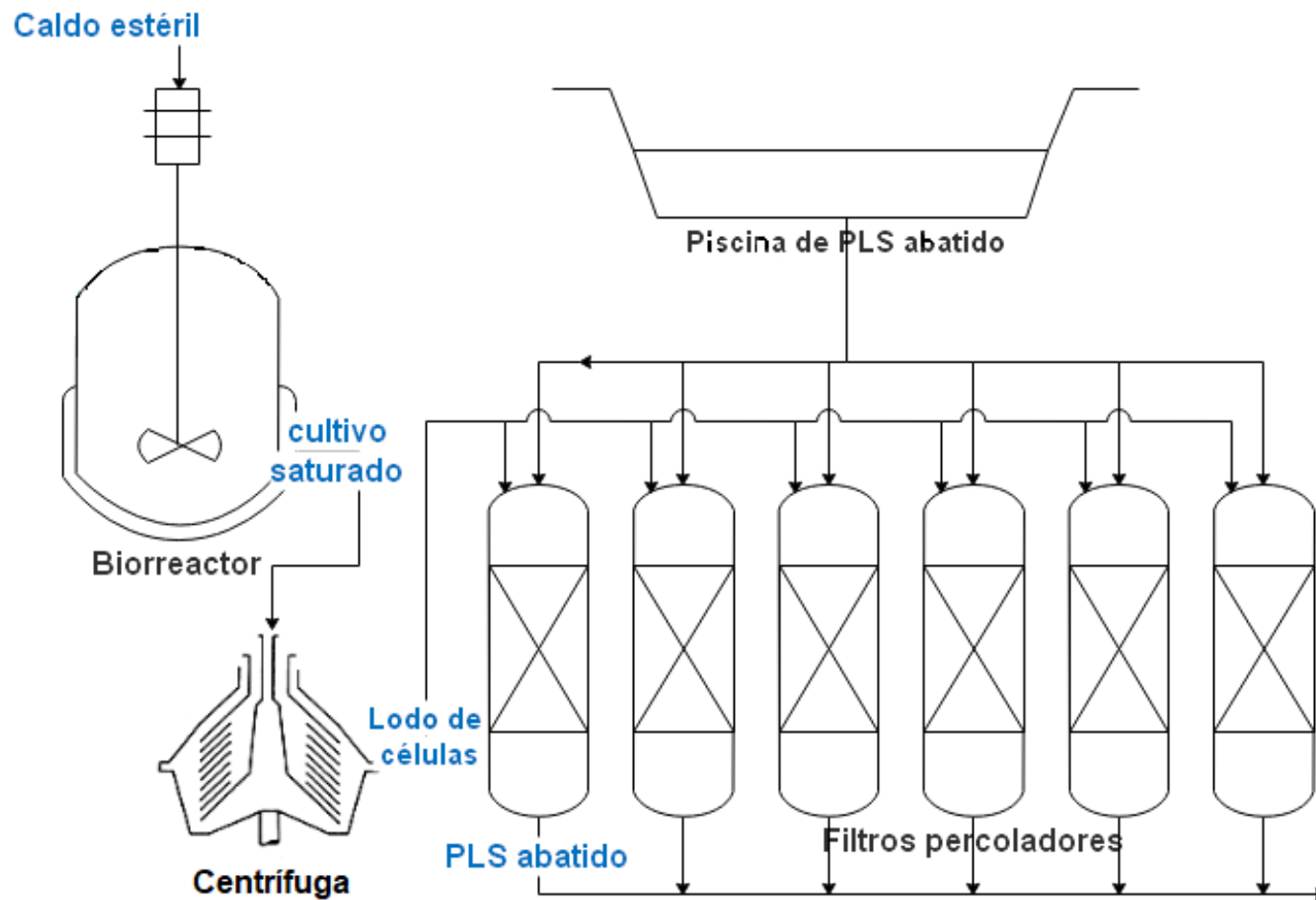


Figura 63: Diagrama de flujo del proceso propuesto de abatimiento de arsénico en filtros percoladores.

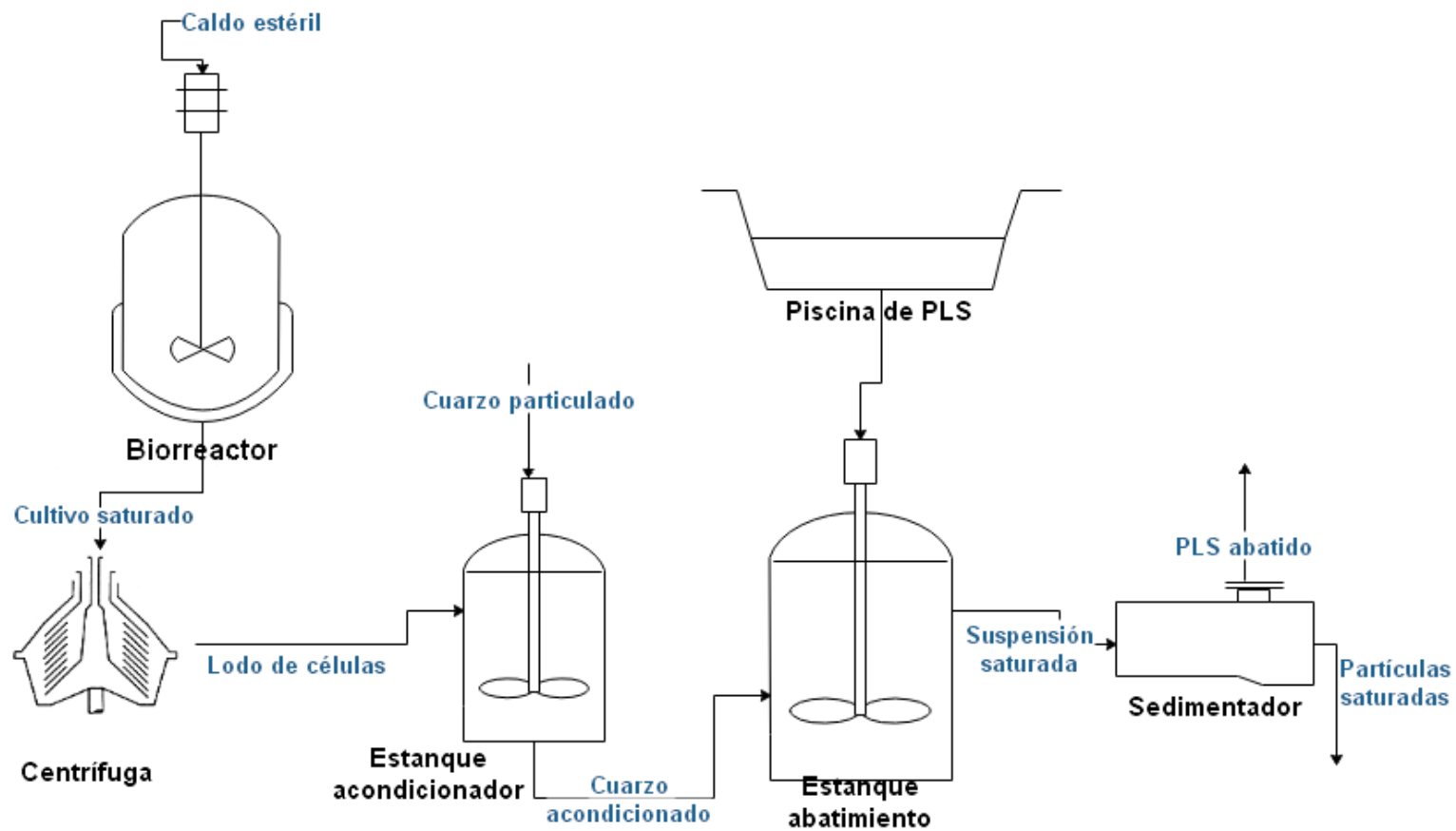
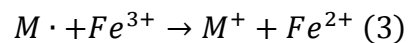
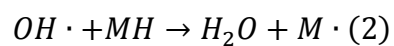
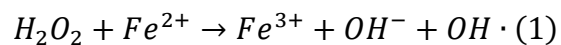


Figura 64: Diagrama de flujo del proceso propuesto de abatimiento de arsénico en estanques agitados.

8.2. Anexo B – Mecanismo de reacción de Fenton

El mecanismo de reacción de Fenton es una secuencia de reacciones de oxidación de especies que utiliza un metal como catalizador, comúnmente hierro, utilizando peróxido de hidrógeno como agente oxidante [92].



En este mecanismo, el catalizador corresponde a la especie ion ferroso, y la especie que se desea oxidar es M, que al final de la cadena de reacciones logra aumentar su estado de oxidación en una unidad.

8.3. Anexo C – Secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de TU-Ag43, EGFP y SP-Ag43

SP-Ag43: 52 residuos aminoacídicos, 156 bases

N- MKRHLNTCYRLVWNHMTGAFVVASELARARGKRGGVAVALSLAAVTSLPVLA –C

5'- ATGAAACGACATCTGAATACCTGCTACAGGCTGGTATGGAATCACATGACGGGC
GCTTTTCGTGGTTGCCTCCGAAGTGGCCCGCGCACGGGGTAAACGTGGCGGTGTG
CGGTTGCACTGTCTCTTGCCGCAGTCACGTCACTCCCGGTGCTGGCC -3'

EGFP: 239 residuos aminoacídicos, 717 bases

N- MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP
WPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK
FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED
GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITL
GMDELYK –C

5'- ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCCG
AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGG
GCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCT
GCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTC
AGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCG
AAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC
CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA
GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC
TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGT
GAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCAC
TACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACT
ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
GGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTC
TACAAG -3'

TU-Ag43: 486 residuos aminoacídicos + codón de término, 161 bases

N- TNVTLASGATWNIPDNATVQSVVDDL SHAGQIHFTSTRTGKFPATLKVKNLNGQN
GTISLRV RPDMAQNNADRLVIDGGRATGKTILNLVNAGNSASGLATSGKGIQVVEAING
ATTEEGAFVQGNRLQAGAFNYS LNRDSDSWYLRSENAYRAEVPLYASMLTQAMDYD
RIVAGSRSHQTGVNGENNSVRLSIQGGHLGHDNNGGIARGATPESSGSYGFVRLEGD
LMRTEVAGMSVTAGVYGAAGHSSVDVKDDDGSRAGTVRDDAGSLGGYLNLVHTSSG
LWADIVAQGTRHSMKASSDNDFRARGWGWLGSLETGLPFSITDNLMLPQLQYTWQ
GLSLDDGKDNAGYVKFGHGSAQHVRAGFRLGSHNDMTFGEGTSSRAPLRDSAKHSV
SELPVNWWVQPSVIRTFSSRGDMRVGTSTAGSGMTFSPSQNGTSLDLQAGLEARVRE
NITLGVQAGYAHSVSGSSAEGYNGQATLNVTF **Stop** -C

5'- ACGAATGTC ACTCTCGCCTCCGGTGCCACCTGGAATATCCCCGATAACGCCAC
GGTGCAGTCGGTGGTGGATGACCTCAGCCATGCCGGACAGATTCATTTACCTCC
ACCCGCACAGGGAAGTTCGTACCGGCAACCCTGAAAGTGAAAACCTGAACGGAC
AGAATGGCACCATCAGCCTGCGTGTACGCCCGGATATGGCACAGAACAATGCTGA
CAGACTGGTCATTGACGGCGGCAGGGCAACCGGAAAAACCATCCTGAACCTGGTG
AACGCCGGCAACAGTGCCTCGGGGCTGGCGACCAGCGGTAAGGGTATT CAGGTG
GTGGAAGCCATTAACGGTGCCACCACGGAGGAAGGGGCCTTTGTCCAGGGGAACA
GGCTGCAGGCCGGTGCCTTTAACTACTCCCTCAACCGGGACAGTGATGAGAGCTG
GTATCTGCGCAGTGAAAATGCTTATCGTGCAGAAGTCCCCCTGTATGCCTCCATGC
TGACACAGGCAATGGACTATGACCGGATTGTGGCAGGCTCCCGCAGCCATCAGAC
CGGTGTAATGGTGAAAACAACAGCGTCCGTCTCAGCATT CAGGGCGGTCATCTC
GGTCACGATAACAATGGCGGTATTGCCCGTGGGGCCACGCCGGAAGCAGCGGC
AGCTATGGATTTCGTCCGTCTGGAGGGTGACCTGATGAGAACAGAGGTTGCCGGTA
TGTCTGTGACCGCGGGGGTATATGGTGCTGCTGGCCATTCTTCCGTTGATGTTAAG
GATGATGACGGCTCCCGTGCCGGCACGGTCCGGGATGATGCCGGCAGCCTGGGC
GGATACCTGAATCTGGTACACACGTCTCCGGCCTGTGGGCTGACATTGTGGCAC
AGGGAACCCGCCACAGCATGAAAGCGTCATCGGACAATAACGACTTCCGCGCCCCG
GGGCTGGGGCTGGCTGGGCTCACTGGAAACCGGTCTGCCCTTCAGTATCACTGAC
AACCTGATGCTGGAGCCACAACCTGCAGTATACCTGGCAGGGACTTTCCCTGGATGA
CGGTAAGGACAACGCCGGTTATGTGAAGTTCGGGCATGGCAGTGCAACAACATGTG
CGTGCCGGTTTCCGTCTGGGCAGCCACAACGATATGACCTTTGGCGAAGGCACCT
CATCCCGTGCCCCCCTGCGTGACAGTGCAAAACACAGTGTGAGTGAATTACCGGT
GAACTGGTGGGTACAGCCTTCTGTTATCCGCACCTTCAGCTCCCGGGGAGATATG
CGTGTGGGGACTTCCACTGCAGGCAGCGGGATGACGTTCTCTCCCTCACAGAATG
GCACATCACTGGACCTGCAGGCCGGACTGGAAGCCCGTGTCCGGGAAAATATCAC
CCTGGGCGTT CAGGCCGGTTATGCCACAGCGTCAGCGGCAGCAGCGCTGAAGG
GTATAACGGTCAGGCCACACTGAATGTGACCTTCTGA -3'

Anexo C adaptado del material amablemente compartido por Lagos (2014).

8.5. Anexo E – Partidores para la obtención de los plasmidios p02, p03, p04, p05, p06, p07, p08 y p09

En la Tabla 8 se entregan las secuencias nucleotídicas y propiedades químicas y fisicoquímicas de los partidores utilizados para la construcción de los plasmidios p02 a p09 mediante PCR. Las temperaturas de *melting* y porcentaje GC fueron determinados con la herramienta OligoCalc [59]. Los plasmidios cuyos nombres presentan asterisco son los que esta herramienta considera potenciales formadores de estructuras secundarias.

La columna “HOMOL. GIBSON” muestra el largo en bases del segmento del partidor que genera homología para la recircularización mediante *Gibson Assembly*. La columna “Tm GIBSON” muestra la temperatura de *melting* de sólo el segmento del partidor que cumple la función de ligar mediante *Gibson Assembly*. La columna “Tm SIN G.A.” muestra la temperatura de *melting* del partidor, sin considerar su segmento utilizado para *Gibson Assembly*.

Tabla 8: Detalle de los partidores utilizados para la eliminación de marcos de lectura a partir de los plasmidios p10, p11, p12 y p13.

| VECTOR FINAL | FUNCIÓN PARTIDOR | NOMBRE | SECUENCIA | LARGO [b] | HOMOL. GIBSON [b] | Tm GIBSON [°C] | %GC | Tm SIN G.A. [°C] |
|--------------|---------------------|-----------|--|-----------|-------------------|----------------|-----|------------------|
| p06 | Elimina EGFP de p10 | TU-L1-F6 | FW: 5'- GTAGCGGTACGAATGTCACTCTCGCCTCC -3' | 29 | 17 | 52,4 | 59 | 63,2 |
| | | TU-L1-R6 | RV: 5'- GACATTCGTACCGCTACCTCCACCACTACC -3' | 30 | | | | |
| p07 | Elimina EGFP de p11 | TU-L1-F7* | FW: 5'- AGGCAGTGAACGAATGTCACTCTCGCCTCC -3' | 31 | 18 | 53,8 | 58 | 63,2 |
| | | TU-L1-R7 | RV: 5'- ACATTCGTTCCACTGCCTCCCCCGGAT -3' | 27 | | | | |
| p08 | Elimina EGFP de p12 | TU-L2-F8 | FW: 5'- GGGGGGGACGAATGTCACTCTCGCCTCC -3' | 28 | 15 | 51,7 | 68 | 63,2 |
| | | TU-L2-R8 | RV: 5'- ACATTCGTCCCCCGGATCCTCCCC -3' | 25 | | | | |
| p09 | Elimina EGFP de p13 | TU-L2-F9* | FW: 5'- GCGGAGGCACGAATGTCACTCTCGCCTCC -3' | 29 | 16 | 53,5 | 66 | 63,2 |
| | | TU-L2-R9 | RV: 5'- ACATTCGTGCCTCCGCTACCCCCGC -3' | 25 | | | | |
| p04 | Elimina PC2 de p11 | L1-SP-F* | FW: 5'- TGCTGGCCGGATCCGGGGGAGGCAGT -3' | 26 | 15 | 54,2 | 73 | 62,9 |
| | | L1-SP-R* | RV: 5'- CGGATCCGGCCAGCACCGGGAGTGA -3' | 25 | | | | |
| p05 | Elimina PC1 de p12 | L2-SP-F* | FW: 5'- TGCTGGCCGGTAGCGGTGGCGGGTCT -3' | 26 | 15 | 54,2 | 73 | 62,9 |
| | | L2-SP-R* | RV: 5'- CGCTACCGGCCAGCACCGGGAGTGA -3' | 25 | | | | |
| p02 | Elimina EGFP de p04 | TU-L1-F7 | <i>mismos partidores para plasmid7 desde plasmid11</i> | | | | | |
| | | TU-L1-R7 | <i>mismos partidores para plasmid7 desde plasmid11</i> | | | | | |
| p03 | Elimina EGFP de p05 | TU-L2-F8 | <i>mismos partidores para plasmid8 desde plasmid12</i> | | | | | |
| | | TU-L2-R8 | <i>mismos partidores para plasmid8 desde plasmid12</i> | | | | | |

8.6. Anexo F – Receta para los procedimientos de PCR, digestión, ligación y Gibson Assembly

Cóctel para PCR recursivo

| | |
|--|-------------------------------|
| - Phusion HF 5X Buffer | 10 μ L |
| - dNTP 2 mM | 5 μ L |
| - Partidor FW 5 μ M | 5,5 μ L |
| - Partidor RV 5 μ M | 5,5 μ L |
| - Phusion HF DNA polymerase | 0,5 μ L |
| - <u>H₂O libre de nucleasas</u> | <u>23,5 μL</u> |
| - TOTAL | 50 μ L |

Cóctel para etapa de elongación por OE-PCR

| | |
|--|--------------------------------------|
| - Fragmento 1 | 4,5 μ L (mínimo: 1350 ng de DNA) |
| - Fragmento 2 | 4,5 μ L |
| - 5X Buffer KOD | 3 μ L |
| - dNTP 2 mM | 3 μ L |
| - MgSO ₄ 25mM | 1,2 μ L |
| - KOD Hotstart | 0,6 μ L |
| - <u>H₂O libre de nucleasas</u> | <u>13,2 μL</u> |
| - TOTAL | 30 μ L |

Cóctel para etapa de amplificación por OE-PCR

| | |
|--|------------------------------|
| - Cóctel etapa elongación | 30 μ L |
| - 5X Buffer KOD | 2 μ L |
| - dNTP 2 mM | 5 μ L |
| - Partidor FW 5 μ M | 2 μ L |
| - Partidor RV 5 μ M | 2 μ L |
| - KOD Hotstart | 0,4 μ L |
| - <u>H₂O libre de nucleasas</u> | <u>8,6 μL</u> |
| - TOTAL | 50 μ L |

Mix para digestión de pBS con EcoRV

| | |
|--------------------------------------|----------------------|
| - Vector pBS circular | 200 ng |
| - EcoRV | 1 μ L |
| - Buffer R | 5 μ L |
| - H ₂ O destilada estéril | completar 50 μ L |

Mix para ligación con extremos romos

| | |
|---|----------------------------|
| - Buffer de ligación | 4 μ L |
| - T4 ligasa | 1 μ L |
| - Inserto | 10 μ L |
| - Vector digerido | 2 μ L |
| - <u>H₂O destilada estéril</u> | <u>7 μL</u> |
| - TOTAL | 24 μ L |

Cóctel para PCR de colonias

| | |
|--|-----------------------------------|
| - Buffer Green 5X | 4 μ L |
| - MgCl ₂ | 3,2 μ L |
| - dNTP 2 mM | 2 μ L |
| - Partidor FW 5 μ M | 2 μ L |
| - Partidor RV 5 μ M | 2 μ L |
| - Templado | 0,6 μ L (picadura de colonia) |
| - Go Taq DNA Polymerase | 0,1 μ L |
| - <u>H₂O libre de nucleasas</u> | <u>6,1 μL</u> |
| - TOTAL | 20 μ L |

Cóctel para PCR de linealización de pET22b(+) modificado

| | |
|--|-----------------------------|
| - Templado (~230 ng/ μ L) | 1 μ L |
| - 5X Buffer KOD | 5 μ L |
| - MgSO ₄ 25mM | 3 μ L |
| - dNTP 2 mM | 5 μ L |
| - Partidor FW 5 μ M | 3 μ L |
| - Partidor RV 5 μ M | 3 μ L |
| - KOD Hotstart | 1 μ L |
| - <u>H₂O libre de nucleasas</u> | <u>29 μL</u> |
| - TOTAL | 50 μ L |

Cóctel para PCR de amplificación de SP-Ag43 desde pET22b(+) modificado

| | |
|--|-------------------------------|
| - Buffer HF 5X | 10 μ L |
| - dNTP 2 mM | 5 μ L |
| - Betaína 5M | 8 μ L |
| - Partidor FW 5 μ M | 5 μ L |
| - Partidor RV 5 μ M | 5 μ L |
| - Templado diluido 1/100 | 1 μ L |
| - X7 DNA Polymerase | 0,5 μ L |
| - <u>H₂O libre de nucleasas</u> | <u>15,5 μL</u> |
| - TOTAL | 50 μ L |

Cóctel para PCR de amplificación de EGFP-TU desde pET22b(+) modificado

| | |
|--|------------------------------|
| - Buffer HF 5X | 10 μ L |
| - dNTP 2 mM | 5 μ L |
| - Betaína 5M | 8 μ L |
| - Partidor FW 5 μ M | 15 μ L |
| - Partidor RV 5 μ M | 5 μ L |
| - Templado diluido 1/100 | 1 μ L |
| - X7 DNA Polymerase | 0,5 μ L |
| - <u>H₂O libre de nucleasas</u> | <u>5,5 μL</u> |
| - TOTAL | 50 μ L |

Mix para la doble digestión de pET22b(+) nativo

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| - DNA plasmidial | 2000 ng |
| - Buffer Cutsmart 10X | 10 µL |
| - NdeI | 2 µL |
| - MscI | 2 µL |
| - H ₂ O destilada estéril | completar 50 µL |

Master Mix al 2X para cinco alícuotas de ligación por Gibson Assembly

| | |
|--|---------------|
| - 5X isothermal buffer | 10 µL |
| - T5 exonucleasa | 0,2 µL |
| - Phusion HF DNA Polymearse | 0,6 µL |
| - DNA Taq ligase | 5 µL |
| - <u>H₂O libre de nucleasas</u> | <u>9,2 µL</u> |
| - TOTAL | 25 µL |

Cóctel para PCR de amplificación de productos de Gibson Assembly

| | |
|--|---------------|
| - Buffer HF 5X | 10 µL |
| - dNTP 2 mM | 5 µL |
| - Betaína 5M | 8 µL |
| - Partidor FW 5µM | 5 µL |
| - Partidor RV 5 µM | 5 µL |
| - Producto <i>Gibson Assembly</i> | 10 µL |
| - Phusion HF DNA Polymerase | 0,5 µL |
| - <u>H₂O libre de nucleasas</u> | <u>6,5 µL</u> |
| - TOTAL | 50 µL |

8.7. Anexo G – Protocolo para la preparación de células de *Escherichia coli* electrocompetentes

Materiales

- Preinóculo saturado en caldo LB de la cepa de *E. coli* que se desea transformar
- Matraz de 1L con 500mL de caldo LB estéril
- Probeta de 250 mL estéril
- Puntas p5000 estériles
- Puntas p1000 estériles
- 2 recipientes estériles de 300 mL para centrifugación
- Glicerol 10% 1L estéril
- Tubo Falcon 50 mL estéril
- 60 tubos Eppendorf de 0,6 mL estériles

Procedimiento

Todo el procedimiento debe ser realizado manteniendo las condiciones de esterilidad bajo mechero y conservando la cadena de frío.

- Inocular 500 mL de medio LB con (sin NaCl) con 5 mL del preinóculo para lograr una dilución de 1/100 del cultivo original.
- Crecer a 37°C con agitación vigorosa (190-200 RPM) hasta alcanzar una OD₆₀₀ de entre 0,5 y 0.65. El tiempo aproximado desde el inóculo a que los 500 mL alcancen esa OD es de 4 horas.
- Colocar el cultivo en hielo durante 15 a 30 minutos.
- Distribuir 250 mL de cultivo en los dos 2 tubos de plástico de 300 mL de la centrifuga y centrifugar con el rotor previamente enfriado a 0°C.
- Remover todo el sobrenadante y resuspender el total del pellet en 500 mL de glicerol al 10% previamente enfriado en hielo (250 mL en cada recipiente).
- Centrifugar a 4000 RPM durante 10 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el total del pellet en 250 mL de glicerol al 10% (125 mL en cada recipiente).
- Centrifugar a 4000 RPM durante 10 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el total del pellet en 10 mL de glicerol a 10% (Falcon de 50 mL). Juntar todas las fracciones en uno, completando los 20 mL en un sólo tubo.
- Resuspender en un volumen final de 2 mL de glicerol al 10% el pellet de células.
- Agregar en tubos de 600 µL alícuotas de 60 µL y almacenar a -80°C; mientras se realiza el alícuotado en los tubos Eppendorf de 0,6 mL es importante mantener todo en hielo.

8.8. Anexo H – imágenes de screening de transformación
Placas para screening de la primera transformación en *E. coli* Top 10 (PCL1, PCL2, PCL3 y PCL4)

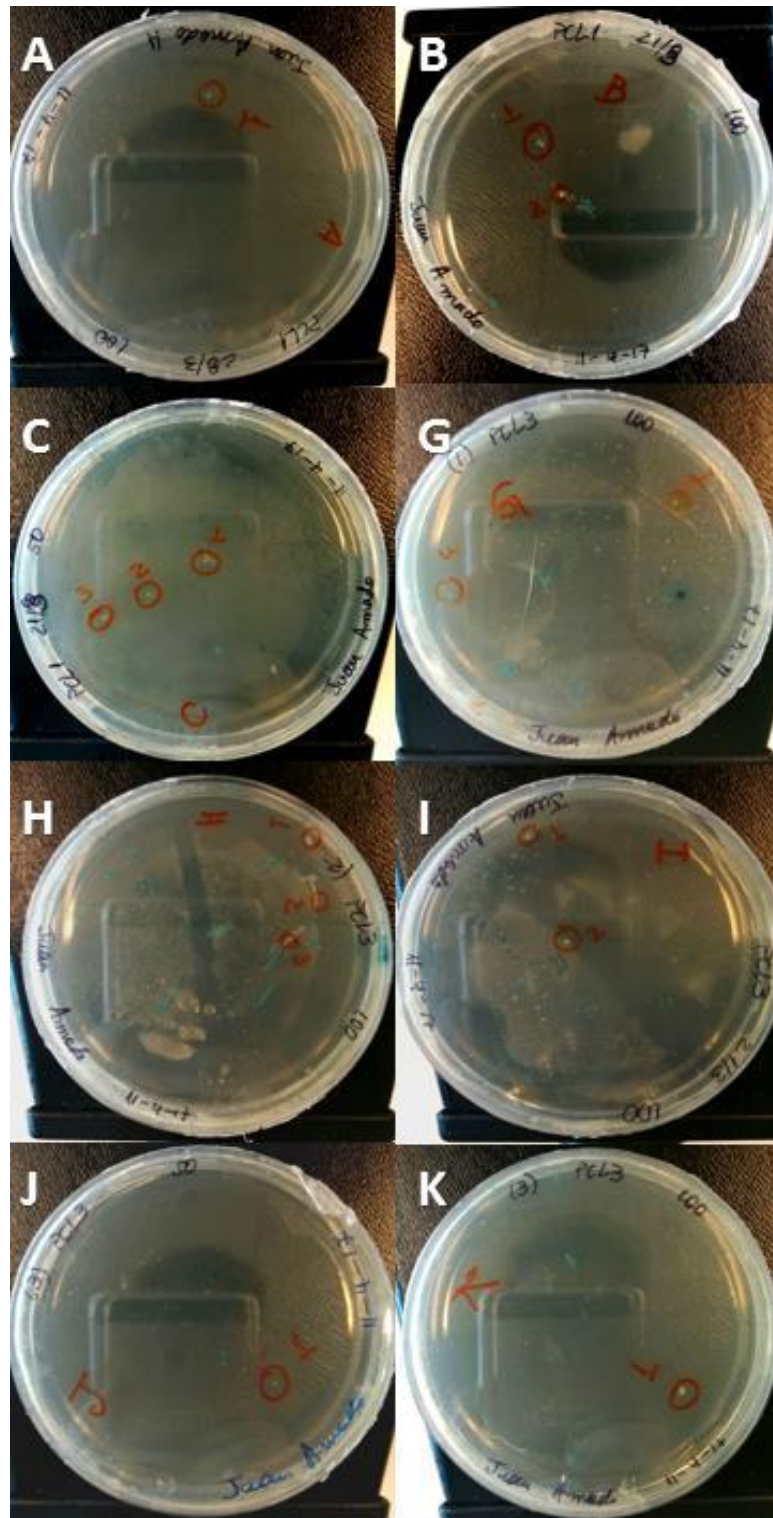


Figura 65: Fotografía de siembra en placas de células *E. coli* Top10 transformadas por electroporación con el vector pBS recircularizado luego de ligarle los insertos PCL. Las placas A, B y C corresponden a transformantes con pBS con el inserto PCL1, las placas D, E y F con el inserto PCL2 (no reportadas), placas G, H, I, J y K con el inserto PCL3, y placas L y M con el inserto PCL4 (no reportadas).

Placas para screening de la segunda transformación en *E. coli* Top10 (PCL2 y PCL4)

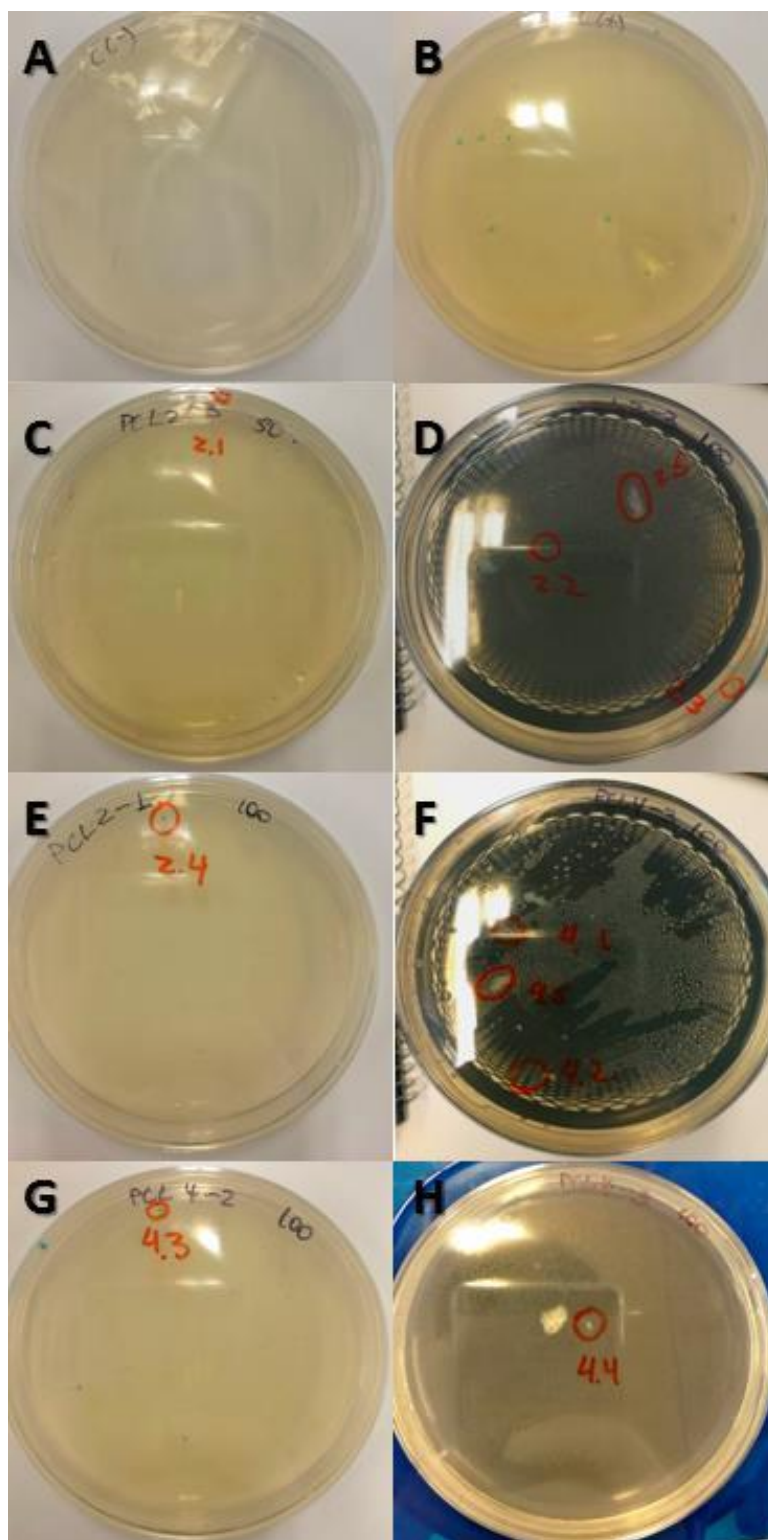


Figura 66: Fotografía de siembra en placas (LB agar + ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + X-gal 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + IPTG 0,5 mM) de células *E. coli* Top10 transformadas por electroporación con el vector pBS recircularizado luego de ligarle los insertos PCL. Las placas A y B contienen controles positivo y negativo, respectivamente. Las placas C, D y E contienen transformantes con el inserto PCL2; Las placas F, G y H contienen transformantes con el inserto PCL4.

Placas para screening de la transformación de *E. coli* BL21(DE3) con el vector de expresión modificado

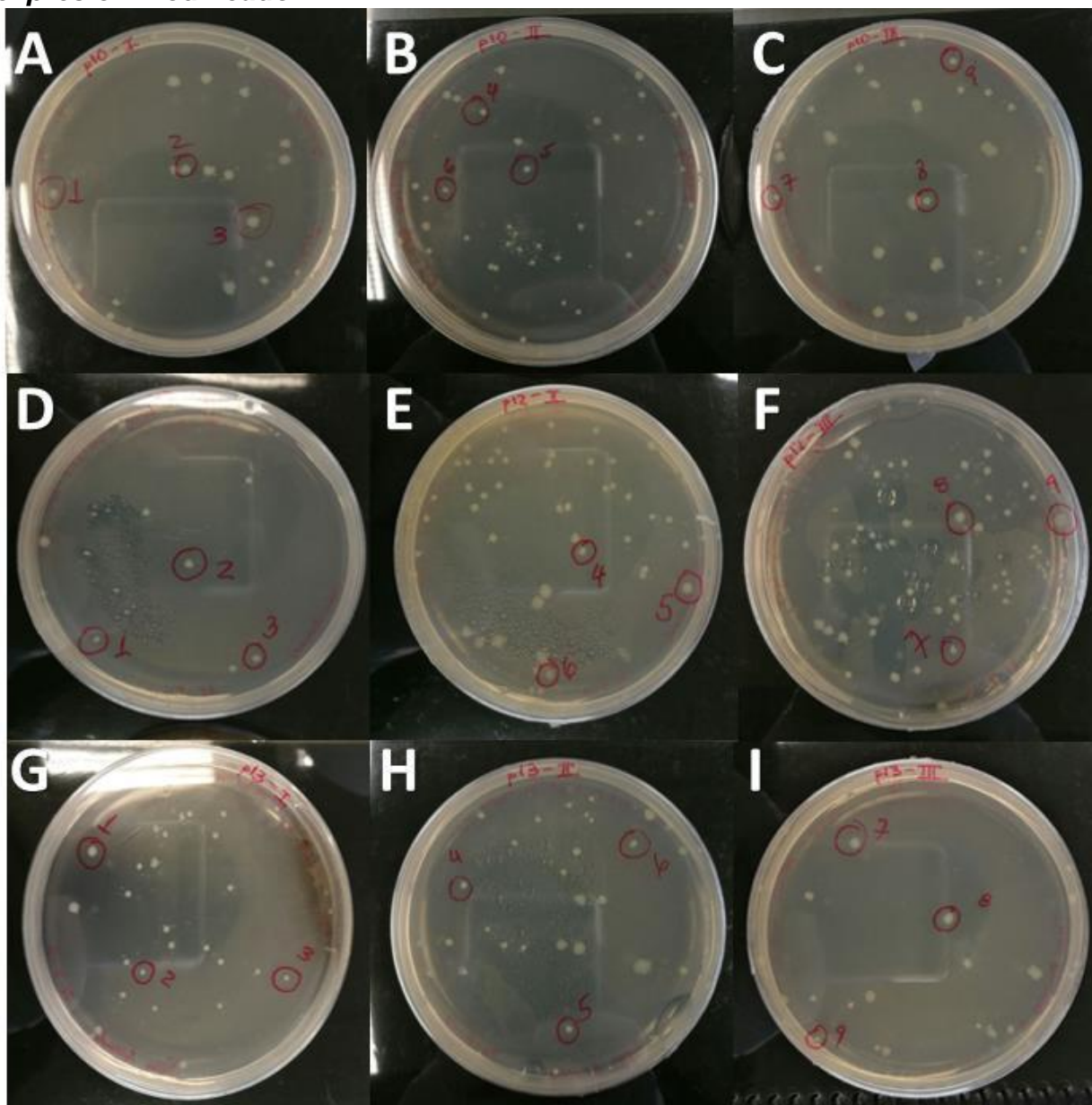


Figura 67: Fotografía de siembra en placas (LB agar + ampicilina 100 µg/mL) de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas por electroporación con el vector p10 (placas A, B y C), p12 (placas D, E y F) y p13 (placas G, H e I).

8.9. Anexo I – Memorias de cálculo para el proceso de abatimiento de arsénico en filtros percoladores

8.9.1. Dimensionamiento de filtros percoladores

Las partículas de cuarzo tienen una esfericidad característica que se encuentra ya caracterizada y tabulada, y tiene el valor de 0,86. Con esto, y considerando un lecho compacto, la porosidad del lecho es determinada gráficamente como sigue:

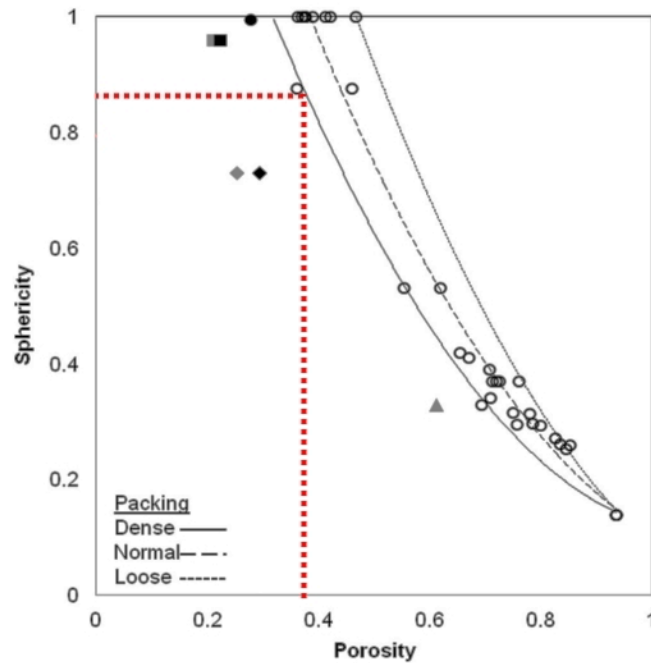


Figura 68: Esfericidad de partículas como función de la porosidad del lecho relleno con partículas uniformes [93].

Con lo anterior, la porosidad resulta con un valor aproximado de 0,38. Usando estos datos, y la viscosidad y densidad del flujo a tratar, la pérdida de carga o variación de presión por fricción se calcula con la correlación de Ergun [79]:

$$\frac{\Delta P_{fr}}{H} = 150 \frac{(1 - \varepsilon)^2}{\varepsilon^3} \frac{\mu \cdot u_0}{(\Phi_S \cdot d_p)^2} + 1,75 \frac{(1 - \varepsilon) \rho_F \cdot u_0^2}{\varepsilon^3 \Phi_S \cdot d_p}$$

Se asume que la velocidad terminal del fluido es igual a la razón entre la altura del mismo y el tiempo de residencia en su interior:

$$u_0 = \frac{H}{\tau}$$

Se tiene, además, según el balance de energía de Bernoulli, lo siguiente:

$$\frac{1}{2} \rho V_1^2 + \rho g h_1 + P_1 = \frac{1}{2} \rho V_2^2 + \rho g h_2 + P_2$$

Los principales supuestos usados para resolver la ecuación para la altura son: la velocidad inicial de caída del fluido es nula; la altura en el primer punto de referencia es la altura del filtro; la velocidad terminal del fluido es igual a su velocidad a la salida del filtro; la posición final es a nivel del suelo, la pérdida de carga es la diferencia entre las presiones del punto 2 y punto 1:

$$\begin{aligned}\Delta P_{fr} &= P_2 - P_1 \\ V_1 &= 0 \\ h_1 &= H \\ V_2 &= u_0 = \frac{H}{\tau} \\ h_2 &= 0\end{aligned}$$

Se cumple entonces que:

$$\rho g H = \frac{1}{2} \rho \left(\frac{H}{\tau} \right)^2 + \Delta P$$

Expresando la caída de presión como función de la altura y reordenando, se cumple que:

$$-\frac{1,75\rho_F(1-\varepsilon)}{\varepsilon^3\tau^2\Phi_S d_p} H^3 - \left(\frac{150\mu(1-\varepsilon)^2}{\varepsilon^3\tau\Phi_S^2 d_p^2} + \frac{\rho_F}{2\tau^2} \right) H^2 + \rho_F g H = 0$$

La solución $H=0$ no tiene sentido físico, por lo cual la ecuación anterior queda reducida a una ecuación cuadrática:

$$-\frac{1,75\rho_F(1-\varepsilon)}{\varepsilon^3\tau^2\Phi_S d_p} H^2 - \left(\frac{150\mu(1-\varepsilon)^2}{\varepsilon^3\tau\Phi_S^2 d_p^2} + \frac{\rho_F}{2\tau^2} \right) H + \rho_F g = 0$$

Resolviendo para H , se obtiene una única solución positiva:

$$H = 3,242 \text{ [m]}$$

El área total corresponde a la razón entre el flujo y el flux determinado mediante análisis de sensibilidad de parámetros:

$$A_F = \frac{Q}{q^*} = 10155 \text{ [m}^2\text{]}$$

El área total de un solo filtro de radio R que genera en área A_F puede dividirse en varios filtros para permitir alternar su operación, y utilizar dimensiones dentro de los rangos normales de operación. Se impone entonces que la suma de las áreas de varios filtros i es igual al área necesaria para tratar todo el flujo:

$$\begin{aligned}\sum_{i=1}^n A_i &= A_F \\ \sum_{i=1}^n r_i^2 \cdot \pi &= R^2 \cdot \pi\end{aligned}$$

Si se diseñan todos los filtros iguales, la suma anterior se reduce a lo que sigue:

$$n \cdot r^2 \cdot \pi = R^2 \cdot \pi$$

Por lo que la relación entre los radios para que se cumpla la imposición inicial es:

$$r = \frac{R}{\sqrt{n}}$$

Donde n es el número de filtros iguales. Es necesario determinar cuál es la suma de los volúmenes de los n filtros iguales, respecto al filtro único de radio R :

$$\sum_{i=1}^n V_i = \sum_{i=1}^n \pi \cdot r_i^2 \cdot H = n \cdot \pi \cdot r^2 \cdot H$$

Pero, según los cálculos anteriores se cumplía que:

$$n \cdot r^2 \cdot \pi = R^2 \cdot \pi = A_F$$

Luego:

$$\sum_{i=1}^n V_i = A_F \cdot H = V_B$$

Donde V_B es el volumen del filtro de radio R ; con esto, se demuestra que la suma de los volúmenes de los n filtros de radio r es igual al volumen del filtro de radio R , por lo tanto, el área específica total es la misma también. El volumen total de todos los filtros es el producto entre el área total y la altura:

$$V_B = A_F \cdot H = 32925 [m^3]$$

El área específica total de los filtros se calcula según la fórmula [79]:

$$a_F = \frac{6(1 - \varepsilon)}{\Phi_S d_{sph}} = \frac{\text{área total de contacto}}{\text{volumen del lecho}}$$

Donde d_{sph} es el diámetro de una esfera que tiene igual volumen de una partícula. Como no es posible conocer el volumen de una partícula de cuarzo dada su irregular geometría, se asume que d_{sph} es igual al diámetro de la partícula, d_P . Con esto, el área específica toma el valor de 12324 m^{-1} . Al multiplicar el área específica de contacto por el volumen total V_B , y dividiendo el resultado por 5 (ya que son 5 filtros que se repartirían el flujo a tratar) se obtiene el área total de contacto para cada filtro i :

$$A_{Ci} = a_F \cdot \frac{V_B}{5} = 8,11 \times 10^7 [m^2]$$

Si se divide el área de contacto por el área que ocupa una célula sobre las partículas, se puede determinar la cantidad de células requeridas para recubrir el 100% del área de contacto disponible dentro del lecho:

$$N_c = \frac{A_{TC}}{S_c}$$

E. coli es un bacilo de 2 μm de largo y 1 μm de ancho [73]; su área es la suma el área del tronco con la que generan sus casquetes esféricos en cada extremo (Figura 69).

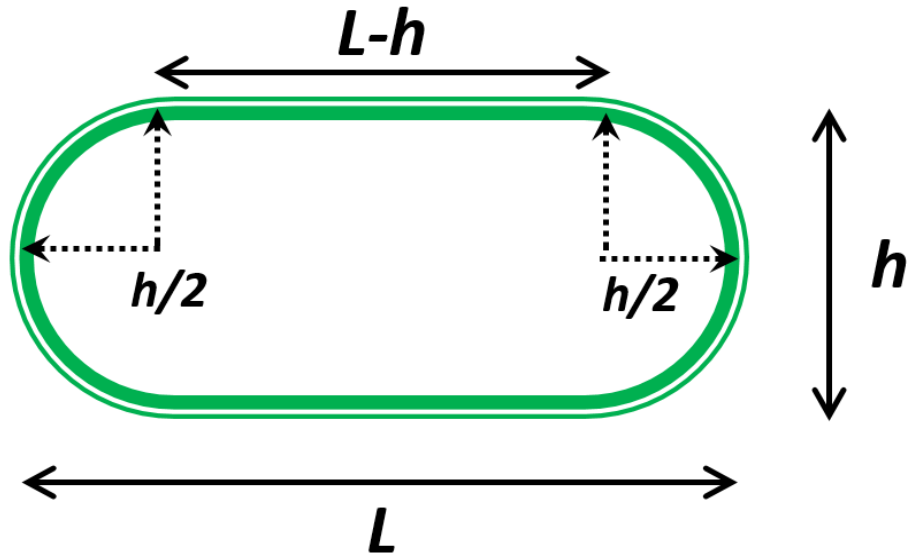


Figura 69: Simplificación de la geometría de un bacilo. Se le asigna a cada longitud característica el parámetro de altura o largo, según corresponda. Elaboración propia.

$$S_c = h(L - h) + \frac{\pi h^2}{4} = 1,79 \times 10^{-12} [m^2]$$

Se considera imposible cubrir la totalidad de la superficie de contacto dentro del lecho, por lo cual se varió el porcentaje de cobertura de la misma con biomasa entre el 100 y el 30% de cobertura, obteniéndose un vector de número total de células requerido. Al multiplicar este número por la masa unitaria de una *E. coli* ($7,55 \times 10^{-16}$ kg), se obtiene un vector con la totalidad de biomasa requerida para la operación del equipo:

$$\vec{M}_{ads} = m_c \cdot \vec{N}_c$$

Tabla 9: Biomasa total requerida para cubrir porcentajes del área total interna del filtro.

| % COBERTURA | ÁREA [m ²] | # CÉLULAS | M _{ads} [kg] |
|-------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 100 | 8,11×10 ⁷ | 4,55×10 ¹⁹ | 34316 |
| 95 | 7,71×10 ⁷ | 4,32×10 ¹⁹ | 32600 |
| 90 | 7,30×10 ⁷ | 4,09×10 ¹⁹ | 30884 |
| 85 | 6,90×10 ⁷ | 3,86×10 ¹⁹ | 29169 |
| 80 | 6,49×10 ⁷ | 3,64×10 ¹⁹ | 27453 |
| 75 | 6,09×10 ⁷ | 3,41×10 ¹⁹ | 25737 |
| 70 | 5,68×10 ⁷ | 3,18×10 ¹⁹ | 24021 |
| 65 | 5,27×10 ⁷ | 2,95×10 ¹⁹ | 22305 |
| 60 | 4,87×10 ⁷ | 2,73×10 ¹⁹ | 20590 |
| 55 | 4,46×10 ⁷ | 2,50×10 ¹⁹ | 18874 |
| 50 | 4,06×10 ⁷ | 2,27×10 ¹⁹ | 17158 |
| 45 | 3,65×10 ⁷ | 2,05×10 ¹⁹ | 15442 |
| 40 | 3,25×10 ⁷ | 1,82×10 ¹⁹ | 13726 |
| 35 | 2,84×10 ⁷ | 1,59×10 ¹⁹ | 12011 |
| 30 | 2,43×10 ⁷ | 1,36×10 ¹⁹ | 10295 |

Ahora, realizando un balance de masa para el ácido arsénico, que es la especie arsenical predominante en esta etapa del proceso, se tiene:

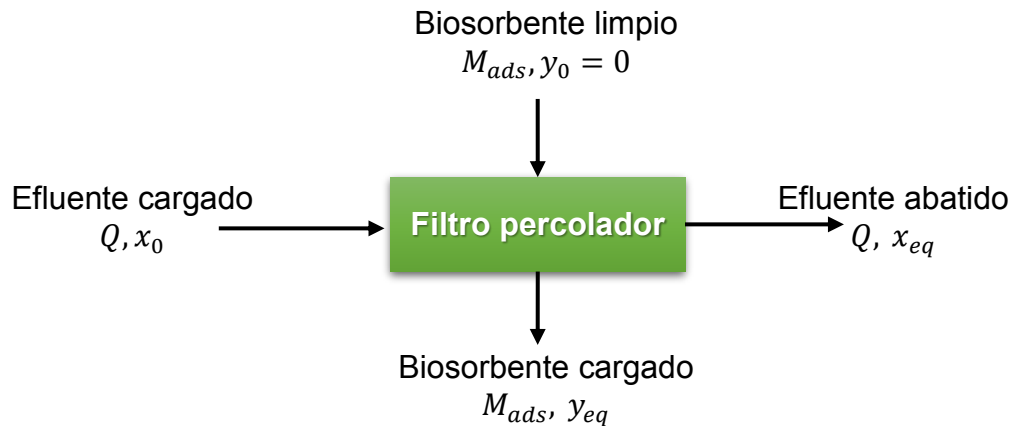


Figura 70: Balance de masa de ácido arsénico para determinar la biomasa requerida.

$$Q \cdot x_0 + \vec{M}_{ads} \cdot y_0 = Q \cdot x_{eq} + \vec{M}_{ads} \cdot y_{eq}$$

Al eliminar el término nulo, y considerando la isoterma de adsorción propuesta por Merrifield *et al.* (2004):

$$K_F = 1,85 \left[\left(\frac{mmol}{g} \right) \cdot \left(\frac{L}{mmol} \right)^{0,207} \right]$$

$m = 0,207$

Se cumple que:

$$x_0 - x_{eq} - \frac{\vec{M}_{ads}}{Q} \cdot K_F \cdot x_{eq}^m = 0$$

Considerando que Q representa un volumen y no un flujo, hay que fijar un tiempo de operación durante el cual el filtro operaría continuamente. Si se toma un tiempo de siete días, y un flujo de un quinto del total a tratar, la ecuación anterior es como sigue, reemplazando los valores conocidos:

$$26,7 \left[\frac{mmol}{L} \right] - \vec{x}_{eq} \left[\frac{mmol}{L} \right] - \frac{\vec{M}_{ads} [kg]}{7[d] \cdot 86400 \left[\frac{s}{d} \right] \cdot \frac{0,028}{5} \left[\frac{m^3}{s} \right]} \cdot 1,85 \left[\left(\frac{mmol}{g} \right) \cdot \left(\frac{L}{mmol} \right)^{0,207} \right] \cdot \vec{x}_{eq}^{0,207} \left[\left(\frac{mmol}{L} \right)^{0,207} \right] = 0$$

Resolviendo la ecuación anterior para x_{eq} y considerando una masa total de biosorbente que barre un recubrimiento de entre el 100 y 30% del área total disponible, se obtiene el vector de concentraciones de ácido arsénico a la salida de la columna:

Tabla 10: Relación entre el porcentaje de cobertura de la superficie de contacto del cuarzo, con la concentración de salida de los filtros percoladores.

| % COBERTURA | x_{eq} [mM] |
|--------------------|---------------------------------|
| 100 | 3,13 |
| 95 | 3,62 |
| 90 | 4,18 |
| 85 | 4,81 |
| 80 | 5,51 |
| 75 | 6,28 |
| 70 | 7,13 |
| 65 | 8,06 |
| 60 | 9,07 |
| 55 | 10,16 |
| 50 | 11,32 |
| 45 | 12,56 |
| 40 | 13,87 |
| 35 | 15,25 |
| 30 | 16,70 |

El volumen del *bulk* de cada filtro resulta del producto de su altura por su área basal; al multiplicar esto por su densidad, se obtiene la masa del *bulk*, y, por lo tanto, la masa total del adsorbente para células en cada filtro:

$$M_B = \frac{A_F}{5} \cdot H \cdot \rho_B = \frac{10154}{5} [m^2] \cdot 3,24[m] \cdot 1639 \left[\frac{kg}{m^3} \right] = 5,4 \times 10^6 [kg]$$

La masa total de sorbente para el arsénico (es decir, células) necesaria para cubrir la superficie interna de cada filtro se muestra en la Tabla 9. En particular, se muestra la equivalencia en número de células; para simplificar, se asumirá que cada célula es una unidad formadora de colonias. De esta manera, la concentración de células adsorbidas en la matriz sólida se muestra como sigue (resultados en Tabla 11):

$$\vec{q}_{eq} = \frac{\# \text{ células}}{M_B} = \frac{\vec{N}_c \text{ [CFU]}}{1000 \left[\frac{g}{kg} \right] \cdot (5,4 \times 10^6 \text{ [kg]})}$$

Por otra parte, para determinar la concentración del cultivo que debe ser alimentado al filtro para su preparación como adsorbente, se considerarán los valores de la isoterma de Henry reportados por Wang *et al.*; luego, se cumple que [70] (resultados en la Tabla 11):

$$\vec{c}_{eq} = \frac{\vec{q}_{eq}}{K_H} = \frac{\vec{q}_{eq} \left[\frac{CFU}{g} \right]}{1,905 \left[\frac{mL}{g} \right]}$$

Al multiplicar lo anterior por la masa unitaria celular, se obtiene la concentración de células en equilibrio en la fase acuosa (Tabla 11).

Tabla 11: Relación entre el porcentaje de cobertura del cuarzo y las concentraciones en equilibrio entregadas por la isoterma de Henry.

| % COBERTURA | q_{eq} [CFU/g] | c_{eq} [CFU/mL] | c_{eq} [mg/mL] |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 100 | $4,21 \times 10^9$ | $2,21 \times 10^9$ | 1,67 |
| 95 | $4,00 \times 10^9$ | $2,10 \times 10^9$ | 1,59 |
| 90 | $3,79 \times 10^9$ | $1,99 \times 10^9$ | 1,50 |
| 85 | $3,58 \times 10^9$ | $1,88 \times 10^9$ | 1,42 |
| 80 | $3,37 \times 10^9$ | $1,77 \times 10^9$ | 1,34 |
| 75 | $3,16 \times 10^9$ | $1,66 \times 10^9$ | 1,25 |
| 70 | $2,95 \times 10^9$ | $1,55 \times 10^9$ | 1,17 |
| 65 | $2,74 \times 10^9$ | $1,44 \times 10^9$ | 1,09 |
| 60 | $2,53 \times 10^9$ | $1,33 \times 10^9$ | 1,00 |
| 55 | $2,32 \times 10^9$ | $1,22 \times 10^9$ | 0,92 |
| 50 | $2,11 \times 10^9$ | $1,11 \times 10^9$ | 0,83 |
| 45 | $1,90 \times 10^9$ | $9,95 \times 10^8$ | 0,75 |
| 40 | $1,68 \times 10^9$ | $8,85 \times 10^8$ | 0,67 |
| 35 | $1,47 \times 10^9$ | $7,74 \times 10^8$ | 0,58 |
| 30 | $1,26 \times 10^9$ | $6,64 \times 10^8$ | 0,50 |

Lo anterior representa la concentración en equilibrio de células en suspensión, necesaria para que la superficie de contacto de cuarzo se sature con la cantidad mínima requerida de células para realizar la adsorción de arsénico. Con este valor, y realizando un balance de masa de adsorbato, se obtiene la concentración requerida en el fluido para que se alcance tal equilibrio dentro del filtro:

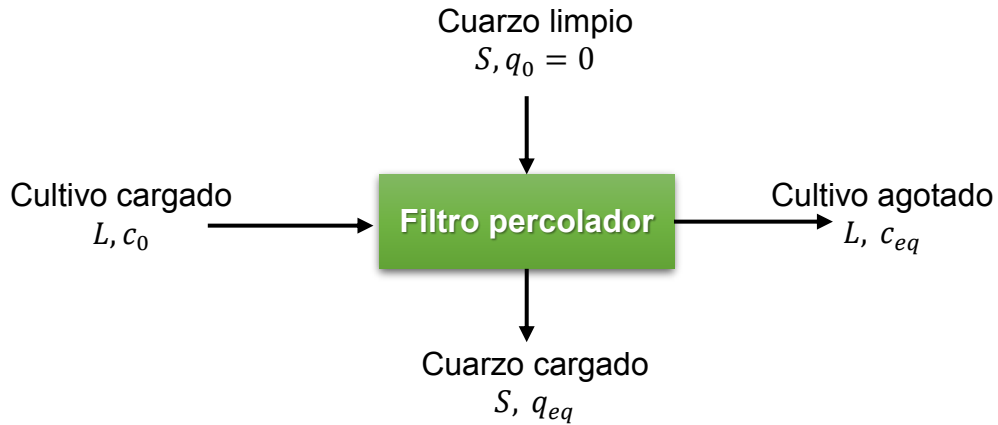


Figura 71: Diagrama para el balance de biomasa del filtro percolador.

$$L \cdot c_0 + S \cdot q_0 = L \cdot \vec{c}_{eq} + S \cdot \vec{q}_{eq}$$

Sabiendo que inicialmente el cuarzo no contiene biomasa, y que se cumple la relación de la isoterma de Henry, se despeja L de la ecuación anterior:

$$\vec{L} = \frac{S \cdot \vec{q}_{eq}}{c_0 - \vec{c}_{eq}}$$

Se para encontrar un flujo de cultivo celular concentrado, es necesario trabajar la expresión anterior con un “flujo másico” de sólido, que será equivalente al cociente entre la masa total del relleno de un filtro y un tiempo de operación igual al tiempo de residencia utilizado para el tratamiento:

$$S = \frac{\left(\frac{M_B}{5}\right)}{\tau} = 428,19 \left[\frac{kg}{s}\right]$$

Teniendo en cuenta la consistencia dimensional del álgebra anterior para obtener L , se tiene (Tabla 12):

Tabla 12: Relación entre el porcentaje de cobertura de la superficie de cuarzo y la concentración celular de alimentación para el acondicionamiento de los filtros.

| % COBERTURA | L [m³/s] | FLUX [m³/m²-d] |
|--------------------|----------------------------|---|
| 100 | 0,0091 | 0,39 |
| 95 | 0,0087 | 0,37 |
| 90 | 0,0082 | 0,35 |
| 85 | 0,0077 | 0,33 |
| 80 | 0,0073 | 0,31 |
| 75 | 0,0068 | 0,29 |
| 70 | 0,0064 | 0,27 |
| 65 | 0,0059 | 0,25 |
| 60 | 0,0054 | 0,23 |
| 55 | 0,0050 | 0,21 |
| 50 | 0,0045 | 0,19 |
| 45 | 0,0041 | 0,17 |
| 40 | 0,0036 | 0,15 |
| 35 | 0,0032 | 0,13 |
| 30 | 0,0027 | 0,12 |

Se observa de la Tabla 12 que los flux obtenidos a partir del vector de flujos de acondicionamiento calculado son todos inferiores a 0,4 [m³/m²-d], que es el valor máximo obtenido a partir del análisis de sensibilidad de los parámetros de la ecuación de diseño de un filtro percolador, por lo que es hidráulicamente factible operar estos flujos en la etapa de acondicionamiento.

8.9.2. Dimensionamiento de la centrífuga de discos para la concentración del caldo del biorreactor

Para la determinación de parámetros operacionales del fermentador, se hace necesario tener como supuesto que el comportamiento fluidodinámico del PLS a tratar es similar al de un cultivo saturado de *E. coli*. Con esto como supuesto principal, se tiene que el tiempo que demora un diferencial de volumen en atravesar la columna completa es de 7 horas, por lo que para que el fluido saturado en bacterias alcance las capas inferiores del relleno es necesario que transcurran 7 horas desde que se comienza a regar concentrado de células por el extremo superior de la columna.

Primero, se realiza un balance de masa sobre la centrífuga con el fin de determinar su flujo de alimentación, que corresponde al flujo de salida del biorreactor. Se tienen como datos conocidos el flujo del lodo (L , alimentación para el acondicionamiento del filtro), la concentración del lodo (c_0) y la concentración del flujo de alimentación (X_S , equivalente a OD igual a 15 y convertido las unidades g/L [87] y CFU/mL); además se impondrá que la concentración de células en el clarificado sea despreciable.

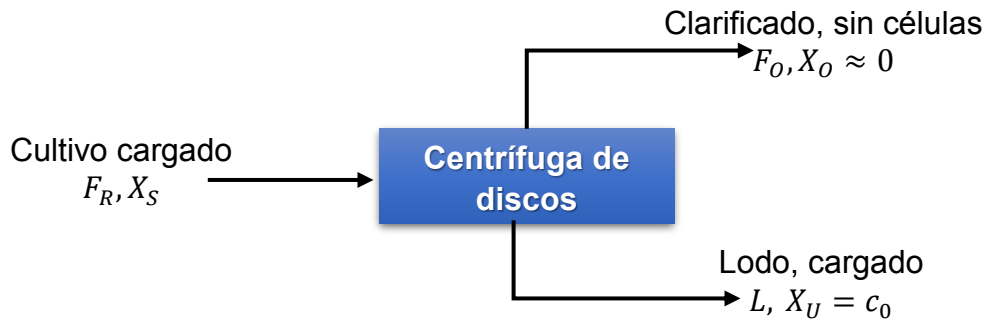


Figura 72: Diagrama para el balance de masa sobre la centrífuga de discos.

El balance de biomasa se expresa:

$$F_R \cdot X_S = F_O \cdot X_O + L \cdot X_U$$

De lo cual se obtiene:

$$F_R \cdot X_S = L \cdot c_0$$

Resolviendo para F_R :

$$F_R = \frac{L \cdot c_0}{X_S} = 0,23 \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

La ecuación de diseño de una centrífuga de discos es como sigue:

$$F_R = v_g \cdot \Sigma$$

Donde:

$$v_g = \frac{d_p^2}{18\mu} (\rho_c - \rho_F) \cdot g$$

$$\Sigma = \frac{2\pi n \Omega^2}{3g} (R_0^3 - R_1^3) \cdot \text{ctg}\theta$$

Se considera que el diámetro esférico del bacilo *E. coli* corresponde a la media aritmética entre el largo y el ancho promedio de un individuo; además, la densidad de esta 'partícula' es su masa unitaria dividida en el volumen calculado como la suma del volumen de dos casquetes esféricos con el de un cilindro.

Teniendo en cuenta las proporciones de los flujos, se dimensiona una centrífuga con 150 discos, que es el mayor número sugerido [81] y con un ángulo de los mismos respecto a vertical de 42,5°, que es el promedio del rango típico [81]. Además, se han reportado fuerzas centrífugas de hasta 14300xg en centrífugas de discos [82]:

$$G = \frac{\Omega^2 \cdot R_0}{g} = 14300$$

Las máximas velocidades angulares de las centrífugas de discos de mayor diámetro varían cerca de las 4000 rpm [83, 84]; para asegurar la duración e integridad del material, y considerando la escala de trabajo, se toma como margen de seguridad el 20% de la velocidad sugerida anteriormente:

$$\Omega = (1 - 0,2) \cdot 4000 \left[\frac{\text{rev}}{\text{min}} \right] \cdot 2\pi \left[\frac{\text{rad}}{\text{rev}} \right] \cdot \frac{1}{60} \left[\frac{\text{min}}{\text{s}} \right] = 335 \left[\frac{\text{rad}}{\text{s}} \right]$$

Reemplazando esta velocidad en la relación para G, se obtiene el radio externo de la centrífuga:

$$R_0 = 1,25 \text{ [m]}$$

Para determinar el radio interno, se reemplaza el valor de este radio e la fórmula del factor Σ :

$$\Sigma = \frac{F_R}{v_g} = 1440464 \text{ [m}^2\text{]}$$

$$R_1 = \sqrt[3]{R_0^3 - \frac{3 \cdot g \cdot \Sigma}{2 \cdot \pi \cdot n \cdot \Omega^2 \cdot \text{ctg}\theta}} = 1,16 \text{ [m]}$$

Finalmente, se determina la potencia consumida para la operación de esta centrífuga:

$$P_C = F_R \cdot \rho_F \cdot \Omega^2 \cdot R_0^2 = 40,14 \text{ [MW]}$$

8.9.3. Dimensionamiento del biorreactor para el acondicionamiento de los filtros percoladores

El dimensionamiento del fermentador comienza con el balance de masa global:



Figura 73: Diagrama para el balance de masa sobre el biorreactor.

$$\rho_{in} \cdot F_{in} - \rho_{out} \cdot F_{out} = \frac{d(\rho \cdot V)}{dt} = \rho \frac{dV}{dt} + V \frac{d\rho}{dt}$$

Asumiendo que la densidad no varía considerablemente en el tiempo, se cumple:

$$F_{in} - F_{out} = \rho \frac{dV}{dt}$$

En estado estacionario, no hay acumulación de masa en el estanque, luego la derivada temporal del volumen es nula:

$$\begin{aligned} F_{in} - F_{out} &= 0 \\ F_{in} &= F_{out} = F_R \end{aligned}$$

Luego, se realiza el balance de biomasa sobre el reactor:

$$F_{in} \cdot X_0 - F_{out} \cdot X_S + \mu_S \cdot X_S \cdot V - \alpha \cdot X_S \cdot V = V \frac{dX}{dt}$$

Donde μ es la tasa de crecimiento microbiano y α la tasa de muerte celular. Dado que el equipo funcionaría en una fase del crecimiento en la que la velocidad de muerte celular es mucho menor a la de proliferación ($\mu \gg \alpha$), y que el balance se realiza en estado estacionario, la ecuación anterior queda como sigue:

$$\begin{aligned} -F_R \cdot X_S + \mu_S \cdot X_S \cdot V &= 0 \\ \mu_S &= \frac{F_R}{V} \end{aligned}$$

Además, se modelará el reactor utilizando la cinética de Monod:

$$\mu_S = \frac{\mu_{MAX} \cdot S}{K_S + S}$$

Donde S corresponde a la concentración de sustrato limitante, que comúnmente es la fuente de carbono. Lo que sigue es el balance de masa de tal sustrato:

$$F_R \cdot S_0 - F_R \cdot S - \frac{\mu_S \cdot X_S \cdot V}{Y_{X/S}} - m \cdot X_S \cdot V - \frac{q_P \cdot X_S \cdot V}{Y_{P/S}} = \frac{d(V \cdot S)}{dt}$$

Donde q_P es la tasa de formación de producto y m es el coeficiente de mantención; es común considerar que ambos parámetros son despreciables en comparación con la concentración inicial del sustrato y la velocidad de crecimiento; esto, junto con asumir estado estacionario, permite obtener lo siguiente a partir de la ecuación anterior:

$$F_R \cdot S_0 - F_R \cdot S - \frac{\mu_S \cdot X_S \cdot V}{Y_{X/S}} = 0$$

$$\frac{F_R}{V} (S_0 - S) = \frac{\mu_S \cdot X_S}{Y_{X/S}}$$

Recordando que del balance de masa global se obtuvo que la velocidad de crecimiento era igual a la razón entre el flujo y el volumen del estanque, se cumple que:

$$\mu_S (S_0 - S) = \frac{\mu_S \cdot X_S}{Y_{X/S}}$$

Ecuación 10: Relación entre la concentración de sustrato a la salida y a la entrada del reactor.

$$S = S_0 - \frac{X_S}{Y_{X/S}}$$

Por otra parte, la productividad se define como el producto entre la tasa de dilución D y la concentración de biomasa X_S . Existe un punto de máxima productividad, que se puede obtener al igualar a cero su derivada respecto a D [85]:

$$\frac{d(D \cdot X_S)}{dt} = 0$$

$$D \frac{dX_S}{dt} + X_S \frac{dD}{dD} = 0$$

A partir de balance de masa de sustrato, se obtuvo una expresión equivalente a:

$$X_S = Y_{X/S} (S_0 - S)$$

Y de la ley cinética de Monod, y considerando que la velocidad de crecimiento es igual a la tasa de dilución, se puede obtener una expresión para el sustrato:

$$S = \frac{D \cdot K_S}{\mu_{MAX} - D}$$

Entonces, la concentración de biomasa se puede ahora expresar en función de D :

$$X_S = Y_{X/S} \left(S_0 - \frac{D \cdot K_S}{\mu_{MAX} - D} \right)$$

Reemplazando esta ecuación en la expresión de optimización de la productividad, se obtiene:

$$-D \cdot \frac{Y_{X/S} K_S (\mu_{MAX} - D) - Y_{X/S} K_S D}{(\mu_{MAX} - D)^2} + Y_{X/S} - \frac{Y_{X/S} D K_S}{(\mu_{MAX} - D)} = 0$$

De tal expresión, se obtiene una función cuadrática para D , de la cual se obtiene el D óptimo:

$$D^* = \mu_{MAX} \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + S_0}} \right)$$

Con este valor, es posible encontrar la concentración óptima de sustrato a la salida del reactor:

$$S^* = \frac{S_0}{1 + \sqrt{\frac{K_S + S_0}{K_S}}}$$

Acoplado la igualdad anterior con la Ecuación 10, se obtiene una expresión para S_0 en función de sólo parámetros ya conocidos:

$$S_0 - \frac{X_S}{Y_{X/S}} - \frac{S_0}{1 + \sqrt{\frac{K_S + S_0}{K_S}}} = 0$$

Resolviendo para S_0 , y luego reemplazando en la Ecuación 10 para resolver S :

$$S_0 = 16,69 \left[\frac{mg}{mL} \right]$$

$$S = 0,023 \left[\frac{mg}{mL} \right]$$

Reemplazando el valor de S , es posible determinar la velocidad de crecimiento microbiano en el interior del reactor mediante el modelo de Monod:

$$\mu_S = \frac{\mu_{MAX} \cdot S}{K_S + S} = \frac{0,76 \left[\frac{1}{h} \right] \cdot 0,023 \left[\frac{mg}{mL} \right]}{3,3 \times 10^{-5} \left[\frac{mg}{mL} \right] + 0,023 \left[\frac{mg}{mL} \right]} = 0,759 \left[\frac{1}{h} \right]$$

Con este dato, se calcula la productividad del biorreactor:

$$\Pi = D \cdot X_S = \mu_S \cdot X_S = 4,55 \left[\frac{g}{L \cdot h} \right]$$

Recordando que, en estado estacionario, la velocidad específica de crecimiento es igual a la razón entre el flujo y el volumen del reactor, se obtiene el volumen del estanque:

$$V_R = \frac{F_R}{\mu_S} = \frac{0,239 \left[\frac{m^3}{s} \right]}{0,759 \left[\frac{1}{h} \right] \cdot \frac{1}{3600} \left[\frac{h}{s} \right]} = 1088 \left[m^3 \right]$$

Considerando un margen de seguridad del 20%, el volumen del reactor se obtiene según la relación:

$$V_R = \frac{120}{100} V = 1306 [m^3]$$

Los biorreactores industriales de geometría cilíndrica cumplen en general que su altura es igual a tres veces su diámetro [85]. Como el volumen de un cilindro es su área basal por la altura, se cumple entonces que:

$$V_R = \pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot H = \frac{\pi \cdot D^2 \cdot 3D}{4} = \frac{3\pi D^3}{4}$$

Con esta relación se obtienen las dimensiones del estanque:

$$D_R = \sqrt[3]{\frac{4V_R}{3\pi}} = 8,22 [m]$$

$$H_R = 3D_R = 24,65 [m]$$

Respecto al intercambio de calor para la mantención de la temperatura interna, los cálculos comienzan con el balance total de energía:

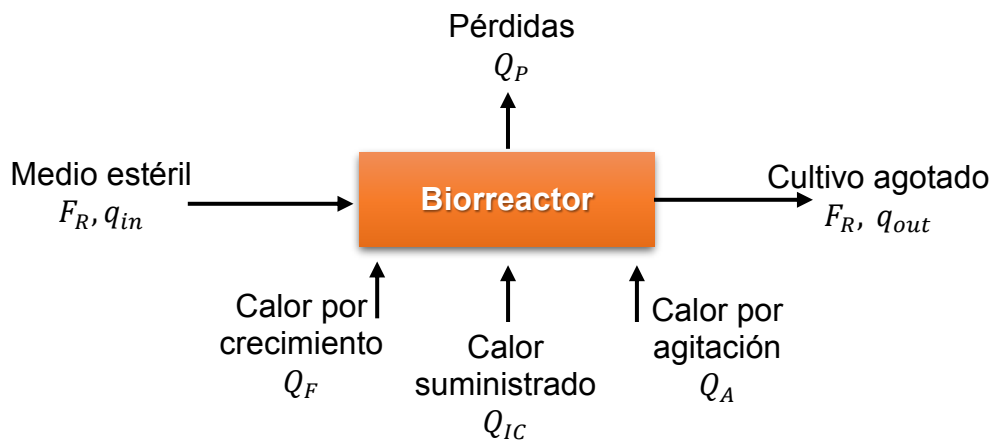


Figura 74: Diagrama para el balance de energía sobre el biorreactor.

El balance de energía se expresa a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{dE}{dt} = q_{in} \cdot F_R - q_{out} \cdot F_R + \dot{Q}_F + \dot{Q}_{IC} + \dot{Q}_A - \dot{Q}_P$$

Como el reactor debe ser isotérmico, los calores (entalpías) de entrada y salida deben ser similares; además, se asume que el calor de agitación es despreciable respecto al de fermentación [85]. Realizando un balance en estado estacionario, la relación anterior queda como sigue:

$$0 = \dot{Q}_F + \dot{Q}_{IC} - \dot{Q}_P$$

$$\dot{Q}_{IC} = \dot{Q}_P - \dot{Q}_F$$

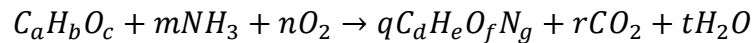
Para la determinación de la demanda de oxígeno de la población microbiana al interior del reactor, se utiliza la siguiente relación [85]:

$$N_{O_2} = \frac{\mu_S \cdot X_S}{Y_{X/O}}$$

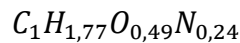
Donde $Y_{X/O}$ corresponde al rendimiento de crecimiento de biomasa respecto al consumo de oxígeno, el cual se calcula según la siguiente relación [85]:

$$\frac{1}{Y_{X/O}} = \frac{32a + 8b - 16c}{Y_{X/S} \cdot PM_S} + 0,01f - 0,0267d + 0,017414g - 0,08e$$

Donde PM_S corresponde al peso molecular del sustrato limitante, que por simplicidad se considerará glucosa, y a, b, c, d, e, f y g corresponden a los subíndices de la fórmula empírica del sustrato y del microorganismo que se está cultivando, según la siguiente reacción balanceada:



Si el sustrato es glucosa, $2a=2c=b=12$, y la fórmula empírica de *E. coli* es [94]:



Realizando un balance de masa por elemento, se obtienen los valores del resto de los parámetros. Reemplazando estos valores en la expresión para el rendimiento de oxígeno, se obtiene

$$Y_{X/O} = 0,36$$

Y con lo anterior, se obtiene la demanda de oxígeno:

$$N_{O_2} = 12,77 \left[\frac{g}{L \cdot h} \right]$$

El aire que se introduce al cultivo se mide usualmente como tasa específica de aireación (VVM), que cumple la siguiente relación [85]:

$$VVM = \frac{F_{aire}}{V_R} = \frac{N_{O_2} \cdot 22,4 \cdot T}{1000 \cdot 0,21 \cdot E \cdot \pi \cdot 273 \cdot 60}$$

Donde T es la temperatura en grados Kelvin, E es la eficiencia de transferencia de oxígeno y π es la presión en atmósferas. El valor de VVM para biorreactores aeróbicos industriales se mueve entre 0,2 y 0,7 [$m^3/m^3 \cdot min$]; se utilizarán los dos valores extremos y el valor de 0,5 [$m^3/m^3 \cdot min$], pero para ejemplos de cálculo se procederá con el valor 0,5. De la ecuación anterior, es posible determinar el flujo de aire y la eficiencia de transferencia de oxígeno asumiendo una temperatura de 310°K y una presión interna de 1 atm:

$$F_{aire} = 10,89 \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

$$E = 5,2\%$$

El rango normal en el cual se encuentra la eficiencia de transferencia de O₂ en escala industrial es entre 3 y 30%, lo que valida la pertinencia de los supuestos anteriormente tomados.

Para el dimensionamiento de los gastos por agitación, se comenzó utilizando un rango sugerido de la razón entre el diámetro del *impeller* y el estanque, que se mueve entre 0,3 y 0,6 [85]; se realizó un análisis de sensibilidad para varios valores de esta razón, pero para ejemplos de cálculo se utilizará el valor 0,45. Dado el diámetro del estanque, se determina el diámetro del *impeller*:

$$D_i = 0,45D_R = 3,7 [m]$$

Con este valor, se calcula el número de Reynolds modificado:

$$Re_i = \frac{N \cdot D_i^2 \rho_R}{\mu_R}$$

Donde N es la velocidad de agitación, ρ_R es la densidad del caldo dentro del reactor y μ_R es la viscosidad dinámica del mismo. Para biorreactores industriales, la velocidad de agitación varía comúnmente entre 50 y 300 rpm [85]; considerando la magnitud del diámetro del *impeller*, se tomó el valor de 50 rpm. Asumiendo que la densidad y viscosidad del caldo son similares a la del agua a 37°C, se obtuvo el valor para Re_i :

$$Re_i = 1,65 \times 10^8$$

Por lo que, en las condiciones consideradas, el flujo en el interior del reactor es turbulento. Dado esto, el cálculo de la potencia nominal es como sigue [85]:

$$P_f = K_2 \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D_i^5$$

Tomando el valor $K_2=5,5$ si el *impeller* es de tipo turbina en flujo turbulento [85], la presión nominal es:

$$P_f = 2,2 \times 10^6 [W]$$

El valor anterior es nominal para cierta geometría de *impeller* tipo turbina, por lo que se debe calcular una potencia corregida mediante la fórmula [85]:

$$P' = P_f \sqrt{\frac{\left(\frac{D}{D_i}\right) \left(\frac{H_R}{D_i}\right)}{\left(\frac{D}{D_i}\right)_f \left(\frac{H_R}{D_i}\right)_f}}$$

Donde

$$\left(\frac{D}{D_i}\right)_f = 3 \quad y \quad \left(\frac{H_R}{D_i}\right)_f = 3$$

La potencia corregida es entonces

$$P' = 2,82 \times 10^6 [W]$$

El valor anterior corresponde a la potencia requerida para un agitador con 1 *impeller* tipo turbina en un estanque sin aireación. La correlación para obtener la potencia necesaria para el funcionamiento de un agitador con 1 *impeller* tipo turbina en un estanque con el flujo de aireación determinado anteriormente es la que sigue [85]:

$$P_g = \alpha \cdot \left(\frac{P'^2 \cdot N \cdot D_i^3}{F_{aire}^{0,56}} \right)^{0,45}$$

Donde α es una constante que toma el valor 1 si el reactor tiene un estanque de más de 1000L. Luego, la presión corregida para el estanque aireado es:

$$P_g = 1,88 \times 10^6 [W]$$

8.10. Anexo J – Memorias de cálculo del proceso de abatimiento de arsénico en tanques agitados

8.10.1. Dimensionamiento de estanque agitado

Para la determinación de la cantidad de material biosorbente, y, por lo tanto, de partículas en suspensión, se realiza un balance de masa:

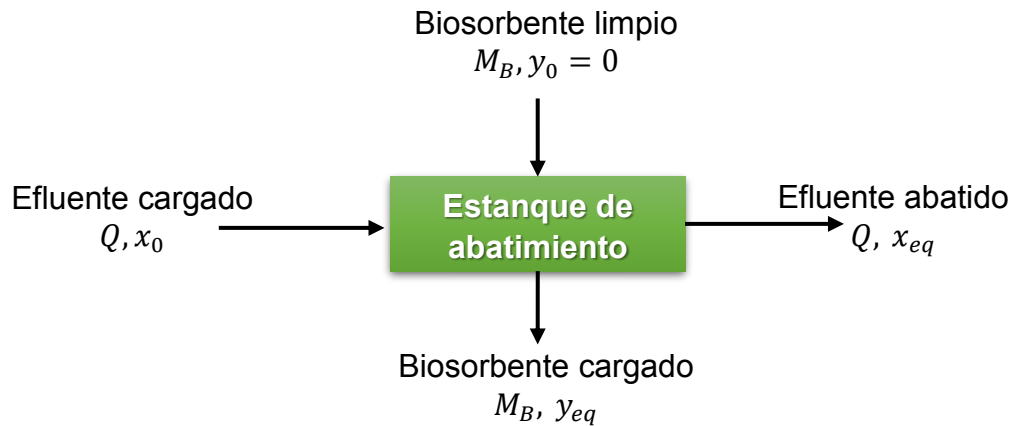


Figura 75: Diagrama para el balance de masa sobre el estanque de abatimiento de arsénico.

$$Q \cdot x_0 + M_P \cdot y_0 = Q \cdot x_{eq} + M_P \cdot y_{eq}$$

$$M_B = Q \frac{x_0 - x_{eq}}{y_{eq}} = Q \frac{x_0 - x_{eq}}{K_F \cdot x_{eq}^m}$$

Resolviendo la ecuación anterior, se obtiene la biomasa necesaria para alcanzar una concentración de salida de 0,5 g/L de arsénico:

$$M_B = 0,21 \left[\frac{kg}{s} \right]$$

Asumiendo que una partícula tiene un área similar a la de una esfera del mismo diámetro, se determina la cantidad de células que se pueden adsorber en cada una de ellas:

$$N_{CP} = \frac{\pi \cdot d_p^2}{S_C} = 2,17 \times 10^5 \left[\frac{CFU}{partícula} \right]$$

Al multiplicar este valor se obtiene la biomasa admisible en la superficie de cada partícula:

$$N_{MC} = N_{CP} \cdot m_C = 1,64 \times 10^{-10} \left[\frac{kg}{partícula} \right]$$

Al dividir la biomasa total necesaria por la biomasa adherida a una partícula, se obtiene el número de partículas requeridas por unidad de tiempo:

$$P_N = \frac{M_B}{N_{MC}} = 31,26 \times 10^9 \left[\frac{partículas}{s} \right]$$

Y si se multiplica el flujo de partículas por la masa promedio de una de ellas ya recubierta por bacterias, se obtiene el flujo másico de sólidos:

$$M_A = P_N \left[\frac{\text{partículas}}{s} \right] \left(m_p + N_{MC} \left[\frac{kg}{\text{partícula}} \right] \right) = 75,55 \left[\frac{kg}{s} \right]$$

Con esto se obtiene el flujo másico total. Asumiendo que el flujo de partículas se comporta como un lecho, se puede calcular el flujo volumétrico de las mismas al dividir el flujo másico por la densidad de un *bulk* hipotético:

$$Q_A = \frac{M_A}{\rho_p(1 - \varepsilon)} = 0,046 \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

Y así se obtiene el flujo volumétrico total que debe procesar el agitador. Se impone un tiempo de residencia de 7 horas, con lo cual se puede obtener el volumen del estanque mediante la relación:

$$\tau = \frac{V_E}{Q_T}$$

Luego, considerando un margen de seguridad del 20%,

$$V_E = 1,2 \cdot \tau \cdot Q_T = 2247 [m^3]$$

Como no es conveniente tener un estanque muy alargado por la ancha capa de líquido claro que se formaría, se estima conveniente usar un estanque en el que el diámetro es igual a la altura. El volumen se expresa entonces como sigue:

$$V_E = A_{basal} \cdot \text{Altura} = \pi \cdot \left(\frac{D_E}{2} \right)^2 \cdot H = \frac{\pi D_E \cdot D_E}{4} = \frac{\pi D_E^3}{4}$$

Así, se calcula el diámetro:

$$D_E = \sqrt[3]{\frac{4V_E}{\pi}} = 14,2 [m] = H_E$$

Para determinar la velocidad crítica de agitación del *impeller*, se utiliza la correlación de Zwietering [88]:

$$N'_C \cdot D_i^{0,85} = S \cdot \nu^{0,1} \cdot d_p^{0,2} \cdot \left(g \frac{\Delta\rho}{\rho} \right)^{0,45} \cdot B^{0,13}$$

Donde el valor de S está condicionado por el tipo de agitador y sus proporciones. Se utilizan los valores tabulados de S al utilizar una turbina de seis palas, donde la razón entre el diámetro del *impeller* y su anchura es 5, la razón entre el diámetro del *impeller* y la altura del mismo sobre el fondo del estanque es 4, y el número de potencia es 6,2. Se muestra a continuación una tabla con valores de S para distintas razones entre el diámetro del estanque y del *impeller*.

Tabla 13: Valores reportados para la constante S según la razón entre el diámetro del estanque y del *impeller* [85].

| RAZÓN D_E/D_i | VALOR S |
|-----------------|---------|
| 2 | 4,1 |
| 3 | 7,5 |
| 4 | 11,5 |

Con las razones entre el diámetro del estanque y del *impeller*, se pueden determinar tres diámetros de *impeller* distintos, que a su vez generan a partir de la correlación de Zwietering tres velocidades críticas de agitación. Los valores para la constante S reportados son válidos sólo para un número de potencia de valor 6,2, lo cual define la potencia consumida por cada una de las configuraciones establecidas para generar los valores reportados en la Tabla 13, según la relación que define al número de potencia:

$$P_j = N_P \cdot \rho \cdot N_{c_j}^3 \cdot D_{ij}^5$$

Donde se utilizará la velocidad crítica de agitación, y la densidad de la suspensión completa, calculada como sigue:

$$\rho_{PT} = \frac{M_A + M_{PLS}}{Q + Q_A} = 1419 \left[\frac{kg}{m^3} \right]$$

Con esto, la potencia se despeja como sigue:

$$P_j = N_P \cdot \rho_{PT} \cdot N_{c_j}^3 \cdot D_{ij}^5$$

Como existen 3 valores de velocidad crítica de agitación, se encuentran también tres diámetros de *impeller* y tres potencias (j es subíndice que toma valores 1, 2 y 3). En la siguiente tabla se muestran entonces los resultados de tales cálculos.

Tabla 14: Valores del diámetro del *impeller*, velocidad crítica de agitación y potencia consumida para distintas configuraciones del *impeller* tipo turbina de 6 paletas planas.

| RAZÓN D_E/D_i | D_i [m] | N'_c [rps] | P [MW] |
|-----------------|-----------|--------------|--------|
| 2 | 7,10 | 0,33 | 5,64 |
| 3 | 4,73 | 0,85 | 12,79 |
| 4 | 3,55 | 1,66 | 22,79 |

Para determinar la concentración de biomasa adsorbida al sólido, es necesario convertir las unidades obtenidas para el valor de células adheridas a cada partícula:

$$q_{eq} = \frac{N_{CP}}{m_p} = \frac{2,17 \times 10^5 \left[\frac{CFU}{partícula} \right]}{5,98 \times 10^8 \left[\frac{kg}{partícula} \right] \cdot 1000 \left[\frac{g}{kg} \right]} = 13,62 \times 10^9 \left[\frac{CFU}{g} \right]$$

8.10.2. Dimensionamiento del estanque acondicionador del flujo de sólidos

Dada la concentración en equilibrio del adsorbato sobre las partículas, es posible calcular la concentración de biomasa en el líquido según la isoterma de Henry con parámetros reportados por Wang *et al.* (2014) [70]:

$$c_{eq} = \frac{q_{eq}}{K_H} = 1,9 \times 10^9 \left[\frac{CFU}{mL} \right]$$

Lo cual es muy cercano a la concentración máxima posible de alcanzar para un biorreactor [87], por lo que se considerará, igual que para el acondicionamiento del filtro percolador, una concentración del flujo de acondicionamiento cerca de dos órdenes de magnitud mayor (2×10^{11} CFU/mL). El balance de masa para el estanque acondicionador es entonces como sigue:

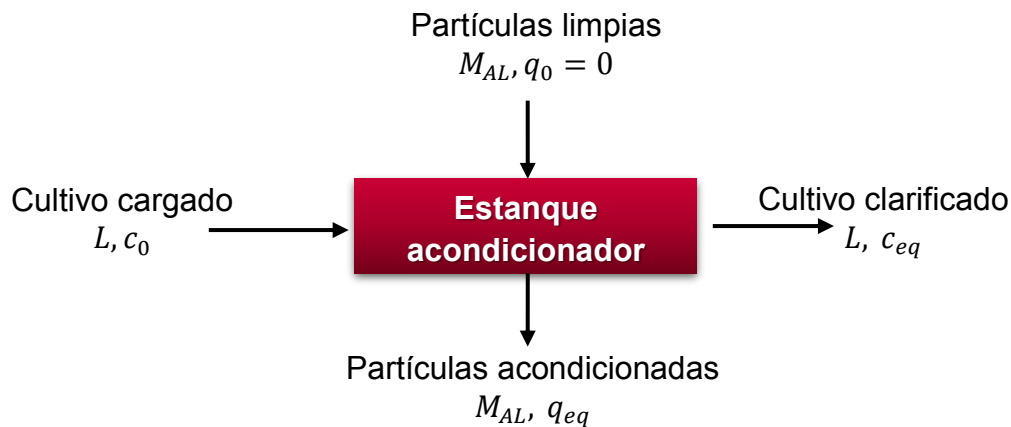


Figura 76: Diagrama para el balance de masa del estanque acondicionador.

$$L \cdot c_0 + M_{AL} \cdot q_0 = L \cdot c_{eq} + M_{AL} \cdot c_{eq}$$

$$L = \frac{M_{AL} \cdot q_{eq}}{c_0 - c_{eq}} = 1,38 \times 10^{-3} \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

Este flujo L de concentración 2×10^{11} CFU/mL deberá ser obtenido entonces de un equipo de concentración de biomasa, en este caso, una centrífuga de discos con boquilla.

Para la determinación del volumen del estanque de acondicionamiento, se utiliza la relación entre el flujo volumétrico total de alimentación y el tiempo de residencia. Según Wang *et al.* (2014), el equilibrio de adsorción de células de *E. coli* en partículas de cuarzo se asegura en dos horas, luego, este sería el tiempo de residencia del estanque.

$$V_A = \tau_A \cdot \left(L + \frac{M_{AL}}{\rho_B} \right) = 215 [m^3]$$

Si se considera nuevamente un estanque donde la altura sea igual al diámetro, se obtiene de la fórmula del volumen de un cilindro, tanto la altura como el diámetro del estanque:

$$D_A = \sqrt[3]{\frac{4V_A}{\pi}} = 6,49 \text{ [m]} = H$$

Anteriormente ya se determinó que la razón entre diámetros de estanque e *impeller* energéticamente más eficiente resulta ser la del valor 2, luego el largo del *impeller* para este estanque sería 2,14 m. Con este valor, nuevamente se utiliza la correlación de Zwietering [88] para determinar la velocidad crítica de agitación del *impeller*:

$$N'_c \cdot D_i^{0,85} = S \cdot v^{0,1} \cdot d_p^{0,2} \cdot \left(g \frac{\Delta\rho}{\rho}\right)^{0,45} \cdot B^{0,13}$$

Usando el valor de *S* correspondiente, calculando el valor de 100 veces la razón másica entre el sólido y el líquido (*B*), se obtiene que la velocidad crítica de agitación es:

$$N'_c = 0,76 \left[\frac{1}{s}\right]$$

Conociendo que el valor del número de potencia para esta configuración es 6,2, se obtiene la potencia consumida:

$$P = N_p \cdot \rho \cdot N'_c{}^3 \cdot D_i^5 = 2,53 \text{ [MW]}$$

8.10.3. Dimensionamiento de la centrífuga para la concentración del caldo acondicionador

Para la determinación de parámetros operacionales del fermentador, se hace necesario tener como supuesto que el comportamiento fluidodinámico del caldo de cultivo saturado a tratar es similar al de un cultivo saturado de *E. coli*.

Primero, se realiza un balance de masa sobre la centrífuga con el fin de determinar su flujo de alimentación, que corresponde al flujo de salida del biorreactor. Se tienen como datos conocidos el flujo del lodo (L , alimentación para el acondicionamiento del filtro), la concentración del lodo (c_0) y la concentración del flujo de alimentación (X_S , equivalente a OD igual a 15 y convertido las unidades g/L [87] y CFU/mL); además se impondrá que la concentración de células en el clarificado sea despreciable.

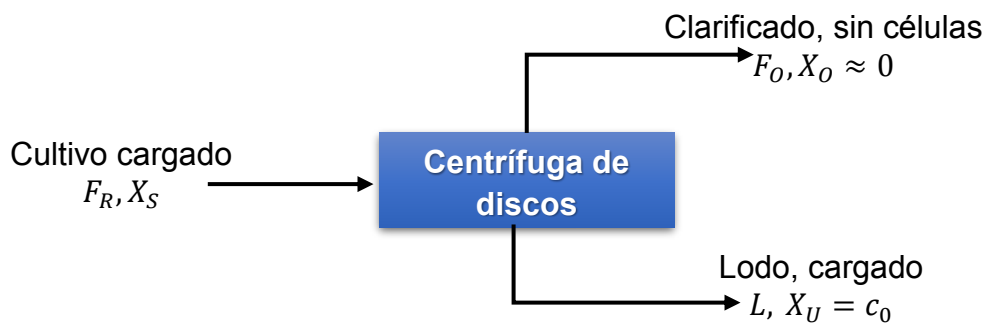


Figura 77: Diagrama para el balance de masa sobre la centrífuga de discos.

El balance de biomasa se expresa:

$$F_R \cdot X_S = F_O \cdot X_O + L \cdot X_U$$

De lo cual se obtiene:

$$F_R \cdot X_S = L \cdot c_0$$

Resolviendo para F_R :

$$F_R = \frac{L \cdot c_0}{X_S} = 0,035 \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

La ecuación de diseño de una centrífuga de discos es como sigue:

$$F_R = v_g \cdot \Sigma$$

Donde:

$$v_g = \frac{d_p^2}{18\mu} (\rho_p - \rho_f) \cdot g$$

$$\Sigma = \frac{2\pi n \Omega^2}{3g} (R_0^3 - R_1^3) \cdot ctg\theta$$

Nuevamente, teniendo en cuenta las proporciones de los flujos, se dimensiona una centrífuga con 150 discos, que es el mayor número sugerido [81] y con un ángulo de los mismos respecto a vertical de 42,5°, que es el promedio del rango típico [81]. Además, se han reportado fuerzas centrífugas de hasta 14300×g en centrífugas de discos [82]:

$$G = \frac{\Omega^2 \cdot R_0}{g} = 14300$$

Para esta centrífuga, se utiliza la máxima velocidad de giro del rotor (4200 rpm [83, 84]) utilizada para centrífugas de discos de mayor tamaño, y se toma como margen de seguridad el 20% de la velocidad sugerida anteriormente:

$$\Omega = (1 - 0,2) \cdot 4200 \left[\frac{rev}{min} \right] \cdot 2\pi \left[\frac{rad}{rev} \right] \cdot \frac{1}{60} \left[\frac{min}{s} \right] = 352 \left[\frac{rad}{s} \right]$$

Reemplazando esta velocidad en la relación para G, se obtiene el radio externo de la centrífuga:

$$R_0 = 1,13 [m^3]$$

Para determinar el radio interno, se reemplaza el valor de este radio e la fórmula del factor Σ :

$$\Sigma = \frac{F_R}{v_g} = 217642 [m^2]$$

$$R_1 = \sqrt[3]{R_0^3 - \frac{3 \cdot g \cdot \Sigma}{2 \cdot \pi \cdot n \cdot \Omega^2 \cdot ctg\theta}} = 1,11 [m]$$

Finalmente, se determina la potencia consumida para la operación de esta centrífuga:

$$P_C = F_R \cdot \rho_F \cdot \Omega^2 \cdot R_0^2 = 5,5 [MW]$$

8.10.4. Dimensionamiento del biorreactor para el proceso de abatimiento en estanque agitado

Considerando las condiciones de optimalidad determinadas en el Anexo 8.9.3, se obtiene el valor de la concentración inicial de sustrato:

$$S_0 - \frac{X_S}{Y_{X/S}} - \frac{S_0}{1 + \sqrt{\frac{K_S + S_0}{K_S}}} = 0$$

$$S_0 = 16,69 \left[\frac{mg}{mL} \right]$$

Con este valor se determina la concentración de sustrato en el seno del reactor:

$$S = \frac{S_0}{\sqrt{\frac{K_S + S_0}{K_S}} + 1} = 0,023 \left[\frac{mg}{mL} \right]$$

Y luego se determina la velocidad específica de crecimiento con la ecuación de Monod:

$$\mu_S = \frac{\mu_{MAX} \cdot S}{K_S + S} = 0,759 \left[\frac{1}{h} \right]$$

Recordando que en estado estacionario, la velocidad específica de crecimiento es igual a la razón entre el flujo y el volumen del reactor, y considerando un margen de seguridad del 20%, el volumen del reactor se obtiene según la relación:

$$V_R = 1,2 \frac{F_R}{\mu_S} = 1,2 \frac{0,036 \left[\frac{m^3}{s} \right]}{0,759 \left[\frac{1}{h} \right] \cdot \frac{1}{3600} \left[\frac{h}{s} \right]} = 197,4 \left[m^3 \right]$$

La productividad del biorreactor es como sigue:

$$\Pi = D \cdot X_S = \mu_S \cdot X_S = 4,55 \left[\frac{g}{L \cdot h} \right]$$

Los biorreactores industriales de geometría cilíndrica cumplen en general que su altura es igual a tres veces su diámetro [85]. Como el volumen de un cilindro es su área basal por la altura, se cumple entonces que:

$$V_R = \pi \cdot \left(\frac{D}{2} \right)^2 \cdot H = \frac{\pi \cdot D^2 \cdot 3D}{4} = \frac{3\pi D^3}{4}$$

Con esta relación se obtienen las dimensiones del estanque:

$$D_R = \sqrt[3]{\frac{4V_R}{3\pi}} = 4,38 \left[m \right]$$

$$H_R = 3D_R = 13,13 \left[m \right]$$

Respecto al balance de energía, y dado que el reactor debe ser isotérmico, nuevamente la entalpías de entrada y salida deben ser similares; además, se asume que el calor de

agitación es despreciable respecto al de fermentación [85]. Realizando un balance en estado estacionario, se tiene:

$$\frac{dE}{dt} = q_{in} \cdot F_R - q_{out} \cdot F_R + \dot{Q}_F + \dot{Q}_{IC} + \dot{Q}_A - \dot{Q}_P$$

$$0 = \dot{Q}_F + \dot{Q}_{IC} - \dot{Q}_P$$

$$\dot{Q}_{IC} = \dot{Q}_P - \dot{Q}_F$$

Para la determinación de la demanda de oxígeno, se utiliza la misma relación anterior relación [85]:

$$N_{O_2} = \frac{\mu_S \cdot X_S}{Y_{X/O}}$$

Donde $Y_{X/O}$ corresponde al rendimiento de crecimiento de biomasa respecto al consumo de oxígeno, el cual se calcula según la siguiente relación [85]:

$$\frac{1}{Y_{X/O}} = \frac{32a + 8b - 16c}{Y_{X/S} \cdot PM_S} + 0,01f - 0,0267d + 0,017414g - 0,08e$$

Reemplazando estos valores en la expresión para el rendimiento de oxígeno, se obtiene

$$Y_{X/O} = 0,357$$

Y con lo anterior, se obtiene la demanda de oxígeno:

$$N_{O_2} = 12,77 \left[\frac{g}{L \cdot h} \right]$$

El aire que se introduce al cultivo se mide usualmente como tasa específica de aireación (VVM), que cumple la siguiente relación [85]:

$$VVM = \frac{F_{aire}}{V_R} = \frac{N_{O_2} \cdot 22,4 \cdot T}{1000 \cdot 0,21 \cdot E \cdot \pi \cdot 273 \cdot 60}$$

Donde T es la temperatura en grados Kelvin, E es la eficiencia de transferencia de oxígeno y π es la presión en atmósferas. El valor de VVM para biorreactores aeróbicos industriales se mueve entre 0,2 y 0,7 [$m^3/m^3\text{-min}$]; se utilizarán los dos valores extremos y el valor de 0,5 [$m^3/m^3\text{-min}$], pero para ejemplos de cálculo se procederá con el valor 0,5. De la ecuación anterior, es posible determinar el flujo de aire y la eficiencia de transferencia de oxígeno asumiendo una temperatura de 310°K y una presión interna de 1 atm:

$$F_{aire} = 1,64 \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

$$E = 5,2\%$$

El rango normal en el cual se encuentra la eficiencia de transferencia de O_2 en escala industrial es entre 3 y 30%, lo que valida la pertinencia de los supuestos anteriormente tomados.

Para el dimensionamiento de los gastos por agitación, se utilizó un rango sugerido de la razón entre el diámetro del *impeller* y el estanque, que se mueve entre 0,3 y 0,6 [85]; se realizó un análisis de sensibilidad para varios valores de esta razón, pero para ejemplos de cálculo se utilizará el valor 0,45. Dado el diámetro del estanque, se determina el diámetro del *impeller*:

$$D_i = 0,45D_R = 1,97 [m]$$

Con el menor valor de diámetro obtenido (razón $D_i/D=0,3$), se calcula el número de Reynolds modificado:

$$Re_i = \frac{N \cdot D_i^2 \rho_R}{\mu_R}$$

Para biorreactores industriales, la velocidad de agitación varía comúnmente entre 50 y 300 rpm [85]; considerando la magnitud del diámetro del *impeller*, se tomó el valor de 50 rpm. Asumiendo que la densidad y viscosidad del caldo son similares a la del agua a 37°C, se obtuvo el valor para Re_i :

$$Re_i = 2,07 \times 10^8$$

Por lo que bajo cualquier razón de diámetros, el flujo en el interior del reactor es turbulento. Dado esto, el cálculo de la presión nominal es como sigue [85]:

$$P_f = K_2 \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D_i^5$$

Tomando el valor $K_2=5,5$ si el *impeller* es de tipo turbina en flujo turbulento [85], la potencia nominal es:

$$P_f = 9,42 \times 10^4 [W]$$

El valor anterior es nominal para cierta geometría de *impeller* tipo turbina, por lo que se debe calcular una potencia corregida mediante la fórmula [85]:

$$P' = P_f \sqrt{\frac{\left(\frac{D}{D_i}\right) \left(\frac{H_R}{D_i}\right)}{\left(\frac{D}{D_i}\right)_f \left(\frac{H_R}{D_i}\right)_f}}$$

Donde

$$\left(\frac{D}{D_i}\right)_f = 3 \quad y \quad \left(\frac{H_R}{D_i}\right)_f = 3$$

La potencia corregida es entonces

$$P' = 1,21 \times 10^5 [W]$$

El valor anterior corresponde a la potencia requerida para un agitador con 1 *impeller* tipo turbina en un estanque sin aireación. La correlación para obtener la potencia necesaria

para el funcionamiento de un agitador con 1 *impeller* tipo turbina en un estanque con el flujo de aireación determinado anteriormente es la que sigue [85]:

$$P_g = \alpha \cdot \left(\frac{P'^2 \cdot N \cdot D_i^3}{F_{aire}^{0,56}} \right)^{0,45}$$

Donde α es una constante que toma el valor 1 si el reactor tiene un estanque de más de 1000L. Luego, la presión corregida para el estanque aireado es:

$$P_g = 7,61 \times 10^4 [W]$$

8.10.5. Dimensionamiento del sedimentador tubular

La velocidad con la que cae una partícula en un medio viscoso se rige por la ecuación de Stokes [85]:

$$V_g = \frac{d_p^2 \cdot \Delta\rho \cdot g_c}{18\mu} = 0,015 \left[\frac{m}{s} \right]$$

El tiempo durante el cual permanece la partícula en el interior de una canaleta es el cociente entre el volumen del recipiente y el flujo [85]:

$$t_g = \frac{\text{Volumen}}{Q} = \frac{H_g \cdot W_g \cdot L_g}{Q}$$

En el caso de una tubería cilíndrica, la altura y el ancho son iguales al radio:

$$t_g = \frac{\pi \cdot R_g^2 \cdot L_g}{Q}$$

Por otra parte, el tiempo de sedimentación de la partícula es el cociente entre la altura de una canaleta de altura 0,5 m y la velocidad de sedimentación [85].

$$t_s = \frac{H}{V_g} = \frac{R_g}{V_g} = 32,96 \text{ [s]}$$

Al igualar el tiempo de residencia con el de sedimentación, se obtiene:

$$\frac{\pi \cdot R_g^2 \cdot L_g}{Q} = t_s = 65,92 \text{ [s]}$$

De la relación anterior se obtiene entonces el largo necesario de la canaleta:

$$L_g = \frac{t_s \cdot Q}{\pi \cdot R_g^2}$$

Recordando que la altura es igual al radio en el caso de un semicilindro, y considerando un margen de seguridad del 20%, el largo de la canaleta es:

$$L_g = 1,2 \frac{t_s \cdot Q}{\pi \cdot R_g^2} = 2,86 \text{ [m]}$$

8.11. Nomenclatura

| SÍMBOLO | PARÁMETRO | UNIDAD |
|-----------|---|---|
| a_P | Superficie unitaria de partícula | [m ²] |
| B | Razón sólido/líquido | [-] |
| C_0 | Concentración celular inicial | [CFU/mL] |
| C_{eq} | Concentración de biomasa en equilibrio | [mg/mL] |
| D_A | Diámetro estanque acondicionador | [m] |
| d_E | Diámetro promedio del bacilo <i>E. coli</i> | [m] |
| D_E | Diámetro de estanque | [m] |
| D_i | Diámetro de <i>impeller</i> | [m] |
| d_P | Diámetro de partícula | [m] |
| D_R | Diámetro del biorreactor | [m] |
| E | Eficiencia de transferencia de O ₂ | [%] |
| F_a | Flujo de aire | [m ³ /s] |
| F_R | Flujo de salida del biorreactor | [m ³ /s] |
| G | Factor G para centrifugación de <i>E. coli</i> | [-] |
| g_c | Aceleración de gravedad | [m/s ²] |
| h_c | Ancho del bacilo <i>E. coli</i> | [m] |
| H_E | Altura del estanque | [m] |
| H_R | Altura del biorreactor | [m] |
| K_2 | Constante de potencia para rotor tipo turbina | [-] |
| K_F | Constante de Freundlich | [mmol·L ^m /g·mmol ^m] |
| K_H | Constante de Henry | [mL/g] |
| kl_a | Coefficiente volumétrico de transferencia de O ₂ | [h ⁻¹] |
| K_s | Constante de saturación de Monod | [mg/mL] |
| L | Flujo de acondicionamiento | [m ³ /s] |
| L_c | Largo del bacilo <i>E. coli</i> | [m] |
| L_g | Largo de la canaleta | [m] |
| L_M | Flujo másico de acondicionamiento | [kg/s] |
| m | Coefficiente de Freunlich | [-] |
| M_A | Flujo másico de partículas recubiertas | [kg/s] |
| M_{AL} | Flujo másico de partículas limpias | [kg/s] |
| M_B | Flujo másico de biomasa | [kg/s] |
| m_c | Masa del bacilo <i>E. coli</i> | [kg/CFU] |
| m_P | Masa unitaria partícula | [kg/partícula] |
| M_{PLS} | Flujo másico PLS | [kg/s] |
| n | Número de discos | [-] |
| N | Velocidad de rotación | [s ⁻¹] |
| N_c | Velocidad crítica agitador | [s ⁻¹] |
| N_{CP} | Cantidad de células por partícula recubierta | [CFU/partícula] |
| N_{MC} | Masa de células por partícula recubierta | [kg/partícula] |
| N_{O_2} | Demanda de oxígeno | [g/L-h] |
| N_P | Número de potencia | [-] |
| P | Potencia consumida | [MW] |

| | | |
|-------------------------|---|---------------------------------------|
| P' | Potencia corregida unitaria | [MW] |
| P_C | Potencia consumida por centrifugación | [MW] |
| P_f | Potencia nominal unitaria | [MW] |
| P_g | Potencia con aireación | [MW] |
| PM_{GLU} | Peso molar de glucosa | [g/mol] |
| P_N | Número de partículas requeridas | [partículas/s] |
| Q | Flujo PLS | [m ³ /s] |
| Q_A | Flujo volumétrico de partículas | [m ³ /s] |
| q_{eq} | Concentración de biomasa en equilibrio | [CFU/g] |
| Q_T | Flujo volumétrico total | [m ³ /s] |
| R₀ | Radio externo de centrífuga de discos | [m] |
| R₁ | Radio interno de centrífuga de discos | [m] |
| Re | Número de Reynolds | [-] |
| Re_i | Número de Reynolds modificado | [-] |
| R_g | Radio de canaleta | [m] |
| S | Concentración final de sustrato | [mg/mL] |
| S₀ | Concentración inicial de sustrato | [mg/mL] |
| S_C | Superficie bacilar <i>E. coli</i> | [m ² /CFU] |
| T | Temperatura de operación | [K] |
| t_s | Tiempo de sedimentación de partícula | [s] |
| V_A | Volumen estanque acondicionador | [m ³] |
| V_{AL} | Flujo volumétrico de partículas | [m ³ /s] |
| v_c | Volumen unitario del bacilo <i>E. coli</i> | [m ³ /CFU] |
| V_E | Volumen de estanque acondicionador | [m ³] |
| v_g | Velocidad de sedimentación | [m/s] |
| v_P | Volumen unitario partícula | [m ³] |
| V_R | Volumen de biorreactor | [m ³] |
| VVM | Tasa específica de aireación | [m ³ /m ³ -min] |
| x₀ | Concentración inicial As | [mM] |
| x_{eq} | Concentración final As | [mM] |
| X_S | Densidad celular en el biorreactor | [CFU/mL] |
| Y_{X/O2} | Rendimiento de biomasa respecto al O ₂ | [-] |
| Y_{X/S} | Rendimiento de biomasa respecto al sustrato | [-] |
| Δρ | Diferencia de densidades | [kg/m ³] |
| ε | Porosidad del lecho empacado | [-] |
| η | Eficiencia | [-] |
| θ | Ángulo de cono | [rad] |
| μ | Viscosidad dinámica PLS | [kg/m-s] |
| μ_{MAX} | Tasa máxima de crecimiento <i>E. coli</i> | [h ⁻¹] |
| μ_R | Viscosidad del cultivo a 37°C | [kg/m-s] |
| μ_S | Velocidad específica de crecimiento | [h ⁻¹] |
| ν | Viscosidad cinemática PLS | [m ² /s] |
| π | Presión atmosférica | [atm] |
| ρ_B | Densidad del lecho empacado | [kg/m ³] |
| ρ_C | Densidad de una célula de <i>E. coli</i> | [kg/m ³] |
| ρ_F | Densidad PLS | [kg/m ³] |

| | | |
|-------------|---|----------------------|
| ρ_P | Densidad de partícula | [kg/m ³] |
| ρ_{PT} | Densidad ponderada total | [kg/m ³] |
| ρ_R | Densidad del cultivo a 37°C | [kg/m ³] |
| Σ | Factor sigma de centrifuga | [m ²] |
| τ | Tiempo de residencia | [s] |
| τ_A | Tiempo de operación estanque acondicionador | [s] |
| Φ_S | Esfericidad de partículas | [-] |
| Ω | Velocidad angular | [rad/s] |
| Π | Productividad del biorreactor | [g/L-h] |