

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