

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO – CHILE



BIODEGRADACIÓN DEL HERBICIDA SIMAZINA MEDIANTE LA
BACTERIA *PSEUDOMONAS* SP. ADP EN HOJAS DE UNA
PLANTA MODELO

JOSELYN BREITLER CRUZ

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL AMBIENTAL

Profesores Guía: Michael Seeger Pfeiffer
Daniel Ramírez Livingston
Co-Directora: Lisette Hernández Guerrero

JUNIO 2024

A Flavio Breitler Olivares, mi padre.

Porque pese a su pronta partida, sus enseñanzas siempre guiarán mis pasos.

Agradecimientos

Quisiera comenzar agradeciendo infinitamente a mi madre y a mi hermano, no solo por el amor y apoyo incondicional que siempre me han brindado, sino también porque cerrar este ciclo universitario ha sido posible gracias a la tranquilidad que, día a día, me da saber que mi hija se encuentra bajo el mejor de los cuidados junto a ellos.

Quiero expresar mi agradecimiento al profesor Dr. Michael Seeger, quien me permitió ingresar al laboratorio donde desarrollé este trabajo e integrarme al equipo LabMMBA. Además, ha sido siempre un excelente mentor, con un trato cercano y muy humano, brindando siempre su apoyo y comprensión frente a los desafíos académicos y personales.

Durante mi tiempo en la Universidad, tuve que enfrentar situaciones complejas. En este sentido, debo agradecer al profesor y jefe de carrera, Daniel Ramírez, por su siempre buena disposición y acogida, en esos momentos en los que uno no sabe cómo proceder.

En los últimos años, lo más lindo fue conocer al equipo LabMMBA, personas maravillosas de las cuales aprendí muchísimo, tanto en lo académico como en lo cotidiano. Recordaré siempre con gratitud y cariño a cada uno/a y los invaluable momentos compartidos. Agradezco especialmente a Lisette Hernández, quien me recibió en el laboratorio y fue una guía excepcional a lo largo de todo el proceso. A Lisette le agradezco el tiempo, la dedicación y el apoyo entregado, pero, por sobre todo, su buen gusto musical, clave en esas largas horas que pasábamos en campana haciendo curvas de crecimiento.

Si hablamos de salud mental, debo agradecer a mis amigos, por las juntas de copuchas y juegos de mesa, las largas conversaciones en momentos difíciles, los buenos y malos consejos, los viajes y todas esas excursiones de trekking que me dejan el corazón llenito.

Siempre me han gustado las analogías y puedo decir que mi experiencia universitaria ha sido como subir un cerrito, un proceso largo y a veces arduo, con distintas etapas, desafíos y un objetivo final claro. Agradezco a todos quienes caminaron conmigo por este sendero, porque fue gracias a su apoyo y buena compañía que pude llegar a la cima. Ahora, solo queda respirar profundo, disfrutar del paisaje y planificar nuevas rutas.

Financiamiento

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, Casa Central, Valparaíso, Chile. Fue financiada por Proyecto FONDECYT 1200756, Proyecto CONICYT PIA ACT172128 Anillo Cambio, ANID-Milenio-NCN2023_054, beca ANID Doctorado Nacional Lisette Hernández y becas internas USM (PIIC).

Participación en eventos científicos

Joselyn Breitler-Cruz, Lisette Hernández, Roberto E. Durán, Mario Sepúlveda, Michael Seeger. 2023. Standardization of simazine extraction and leaf pre-processing for environmental monitoring and bioremediation assessment of herbicides at the foliar level. 3er Congreso Latinoamericano de Ecología Microbiana (ISME-Lat 2023). 7-10 agosto 2023. Quilmes, Argentina. Poster.

Joselyn Breitler-Cruz, Lisette Hernández, Roberto E. Durán, Mario Sepúlveda, Michael Seeger. 2023. Biodegradación del herbicida simazina por la bacteria *Pseudomonas* sp. ADP en hojas de una planta modelo. LXVI Reunión anual Sociedad de Biología de Chile. 13-15 diciembre 2023. Valparaíso, Chile. Poster.

Lisette Hernández, Roberto E. Durán, Constanza C. Macaya, **Joselyn Breitler-Cruz**, Francisco Salvá-Serra, Daniel Luchoro-Jaén, Edward R.B. Moore, Michael Seeger. 2023. Genomic-guided characterization of the catabolic potential of the s-triazine-degrading *Pseudomonas* strain QS143 isolated from an agricultural soil of Central Chile. 3rd International Meeting on New Strategies in Bioremediation/Restoration Processes (BioRemid 2023). 29-30 junio 2023. Muttentz, Switzerland. Poster.

Lisette Hernández, Roberto E. Durán, Constanza C. Macaya, **Joselyn Breitler-Cruz**, Francisco Salvá-Serra, Daniel Luchoro-Jaén, Edward R.B. Moore, Michael Seeger. 2023. Genomic-guided characterization of the catabolic potential of *Pseudomonas* strain QS143 a s-triazine-degrading isolated from an agricultural soil of Central Chile. 3er Congreso Latinoamericano de Ecología Microbiana (ISME-Lat 2023). 7-10 agosto 2023. Quilmes, Argentina. Poster.

Michael Seeger, **Joselyn Breitler-Cruz**, Lisette Hernández, Mario Sepúlveda-Mardones, Roberto E. Durán. 2024. Assessment and environmental monitoring of bioremediation in an herbicide-polluted plant leaf model. 19th International Symposium for Microbial Ecology (ISME 19 2024). 18-23 agosto 2024. Cape Town, South Africa. Poster.

Resumen

La simazina es un herbicida altamente contaminante que afecta suelos, aguas, cultivos y sus áreas foliares. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de una bacteria modelo (degradadora de simazina) del género *Pseudomonas* (aislada desde suelo) de biodegradar este herbicida en el área foliar de una planta modelo. De este modo, se podría incluir la filósfera como una matriz no convencional de biodegradación, entendiendo por matrices convencionales suelo y agua. Se utilizaron hojas de palto como modelo debido al frecuente tratamiento con simazina de este cultivo en Chile. Para monitorear el proceso de biorremediación, se estandarizó un método de extracción de simazina desde las hojas y su cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna RP 18e/Chromolith y una fase móvil isocrática compuesta por agua acidificada (70%v/v) y acetonitrilo (30%v/v). El método de extracción consistió en lavar cada hoja con 10 ml de metanol grado analítico aplicando sonicación, midiendo la concentración de simazina en el sobrenadante, con una tasa de recuperación entre 85-99%.

Se contaminaron hojas de palto con simazina y se bioaumentaron con *Pseudomonas* sp. ADP para evaluar la biodegradación de este herbicida en la matriz foliar. En condiciones de control, sin bioaumentación, las concentraciones de simazina permanecieron constantes, lo que indica que no hubo atenuación natural de la simazina en las hojas. En la condición con bioaumentación de *Pseudomonas* sp. ADP se evidenció una clara degradación de la simazina. En cantidades absolutas, se logró una remoción de 0,15 mg simazina g⁻¹ hoja, equivalente a entre 25 y 50 veces la cantidad de simazina aplicada usualmente en un gramo de suelo agrícola. La mayor tasa de degradación se observó durante los primeros siete días, seguida de una disminución gradual pero constante.

Utilizar la superficie de las hojas como matriz de biorremediación mediante bioaumentación representa un enfoque exploratorio innovador. Los resultados obtenidos sugieren la viabilidad de extrapolar y escalar el estudio de biorremediación foliar hacia otros contaminantes de interés, extendiendo su aplicación más allá del ámbito agrícola.

Abstract

Simazine is a highly contaminating herbicide that affects soils, waters, crops, and their foliar areas. The objective of this study was to evaluate whether a model simazine-degrading bacterium of the genus *Pseudomonas* (isolated from soil) can degrade the herbicide in the foliar area of a model plant. Thus, the phyllosphere could be included as a non-conventional biodegradation matrix, being conventional matrices soil and water. Avocado leaves were used as a model due to the frequent simazine treatment of this crop in Chile. To monitor the bioremediation process, a method for simazine extraction from the leaves and its quantification using high-performance liquid chromatography (HPLC) with an RP 18e/Chromolith column and an isocratic mobile phase composed of acidified water (70% v/v) and acetonitrile (30% v/v) was standardized. The extraction method involved washing each leaf with 10 ml of analytical grade methanol using sonication, measuring the simazine concentration in the supernatant, with a recovery rate between 85-99%.

Avocado leaves were contaminated with 1 mg of simazine and bioaugmented with *Pseudomonas* sp. ADP to evaluate the biodegradation of this herbicide in the foliar matrix. Under control conditions, without bioaugmentation, simazine concentrations remained constant, indicating no natural attenuation of simazine in the leaves. In contrast, the condition with bioaugmentation of *Pseudomonas* sp. ADP showed clear degradation of simazine. In absolute quantities, a removal of 0.15 mg simazine g⁻¹ leaf was achieved, equivalent to 25 to 50 times the amount of simazine usually applied in a gram of agricultural soil. The highest degradation rate was observed during the first seven days, followed by a gradual but steady decrease.

Using leaf surfaces as a bioremediation matrix through bioaugmentation represents an innovative exploratory approach. The results suggest the feasibility of extrapolating foliar bioremediation studies to other contaminants of interest, extending their application beyond the agricultural scope.

Índice general

Agradecimientos.....	3
Financiamiento	4
Participación en eventos científicos	5
Resumen	6
Abstract	7
Índice de Figuras.....	10
Índice de Tablas	11
Abreviaturas	12
1. Antecedentes	13
1.1. Biorremediación	13
1.1.1. Tipos de biorremediación: <i>ex situ</i> e <i>in situ</i>	14
1.1.2. Bioaumentación.....	15
1.1.3. Limitaciones en bioaumentación	15
1.1.4. Matrices de biorremediación	16
1.1.5. Filósfera como matriz no convencional de biorremediación	19
1.2. Plaguicidas y agricultura moderna	20
1.2.1. Herbicidas	21
1.2.2. Simazina, una clase de herbicida de s-triazina	24
1.2.3. Impacto ambiental de la simazina.....	27
1.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	28
1.3.1. Identificación y cuantificación de simazina desde suelos agrícolas mediante HPLC	32
1.4. Biodegradación de s-triazinas: bacterias degradadoras	33

1.4.1.	<i>Pseudomonas</i> sp. ADP, cepa modelo degradadora de simazina.....	36
2.	Hipótesis y objetivos	38
2.1	Hipótesis	38
2.2	Objetivo general	38
2.3	Objetivos específicos	38
3.	Materiales y Métodos	39
3.1	Reactivos químicos	39
3.2	Medios de cultivo	39
3.3	Cepa bacteriana degradadora	39
3.4	Muestreo y conservación de hojas.....	40
3.4.1	Muestreo y manipulación de hojas	40
3.4.2	Conservación de hojas.....	41
3.5	Metodología analítica.....	42
3.5.1	Estandarización del método de cuantificación de simazina en HPLC	42
3.5.2	Extracción de simazina desde hojas de palto	45
3.6	Biorremediación de simazina en hojas de palto	46
3.6.1	Contaminación controlada de hojas de palto	46
3.6.2	Preparación inóculo.....	47
3.6.3	Diseño experimental de biorremediación de simazina en hojas de palto ...	48
3.6.4	Cuantificación de simazina y seguimiento de la cepa degradadora	50
4.	Resultados	52
4.1	Conservación de hojas.....	52
4.2	Estandarización del método de cuantificación de simazina en HPLC	53
4.3	Extracción de simazina desde hojas de palto	57

4.4	Biorremediación de simazina en hojas de palto	58
5.	Discusión	62
6.	Conclusiones.....	65
7.	Proyecciones	66
8.	Referencias.....	67
9.	Anexos	72

Índice de Figuras

Figura 1.	Interacciones entre las partes de las plantas y la colonización microbiana..	19
Figura 2.	Mecanismos de acción de herbicidas.....	23
Figura 3.	Herbicidas pertenecientes al grupo 5-C1 (HRAC).	24
Figura 4.	Estructura química de la simazina..	25
Figura 5.	Movilidad e impacto de la simazina en el medio ambiente y la cadena trófica. 28	
Figura 6.	Esquema general de componentes de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	31
Figura 7.	Ruta catabólica bacteriana de simazina.	36
Figura 8.	Degradación de atrazina por Pseudomonas sp. ADP.	37
Figura 9.	Degradación de simazina por Pseudomonas sp. ADP.	40
Figura 10.	Muestreo de hojas de palto.	41
Figura 11.	Diseño experimental de la determinación de conservación de hojas.....	42
Figura 12.	Metodología para la generación de la curva de calibración de simazina.	45
Figura 13.	Diseño experimental para extracción de simazina desde hojas.....	46
Figura 14.	Aplicación de simazina sobre la superficie de las hojas.....	47
Figura 15.	Bioaumentación con Pseudomonas sp. ADP sobre hojas contaminadas con simazina.....	48
Figura 16.	Diseño experimental: Biorremediación del herbicida simazina a nivel foliar mediante bioaumentación con la cepa Pseudomonas sp. ADP.....	50

Figura 17. Conservación de hojas.....	52
Figura 18. Perfil cromatográfico de extracción de simazina desde hojas de palto en metanol y acetonitrilo.	54
Figura 19. Muestras de simazina y hojas de palto en diferentes solventes..	55
Figura 20. Regresión lineal de la curva de calibración.	56
Figura 21. Perfil cromatográfico de la curva de calibración.....	56
Figura 22. Tasa de recuperación de simazina según tratamiento de las hojas..	57
Figura 23. Perfiles cromatográficos obtenidos desde las muestras de extracción de simazina desde hojas de palto bajo diferentes pre-tratamientos de las hojas.....	58
Figura 24. Biorremediación de simazina con Pseudomonas sp. ADP en hojas de palto... 59	
Figura 25. Cinética de crecimiento de Pseudomonas sp. ADP durante biorremediación de simazina en hojas de palto..	61

Índice de Tablas

Tabla 1. Tecnologías de biorremediación y matriz de aplicación.	16
Tabla 2. Clasificación de herbicidas.....	22
Tabla 3. Instrucciones de uso de Simazina 500 SC.....	26
Tabla 4. Aplicaciones comunes de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)....	29
Tabla 5. Microorganismos degradadores de herbicidas s-triazinas en cultivo puro.....	34
Tabla 6. Características técnicas de equipo de cromatografía utilizado.	43
Tabla 7. Método analítico ajustado.	53

Abreviaturas

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)

MM: Medio Mínimo

Ppm: Partes por millón

PTFE: Politetrafluoroetileno

TSA: Agar Triptona Soja

TSB: Tryptic Soy Broth

UFC: Unidad Formadora de Colonias

1. Antecedentes

1.1. Biorremediación

La contaminación ambiental es una preocupación creciente en todo el mundo, siendo los contaminantes persistentes una arista especialmente desafiante dentro de esta problemática. Estas sustancias, resisten a la degradación natural y a los métodos convencionales de tratamiento, persistiendo en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo. Su resistencia a la descomposición los hace especialmente problemáticos, ya que pueden acumularse en distintas matrices como el suelo, agua y aire, alterando los ecosistemas naturales, amenazando la biodiversidad y planteando riesgos significativos para la salud humana (Hyun *et al.*, 2021).

Existe una amplia gama de sustancias químicas que generan preocupación por su impacto en los ecosistemas, entre ellas, algunos pesticidas, compuestos orgánicos persistentes (COPs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), ciertos metales pesados y otros compuestos químicos industriales (Seo *et al.*, 2009; Ahad *et al.*, 2020).

La gestión de contaminantes persistentes es un desafío significativo para la protección del medio ambiente y la salud pública, y requiere enfoques innovadores y tecnologías avanzadas y específicas para su tratamiento y eliminación efectiva. Se han desarrollado y aplicado una variedad de métodos fisicoquímicos para su eliminación, entre ellos; adsorción, filtración por membrana, oxidación, hidrólisis, degradación fotocatalítica, extracción electroquímica con disolventes, coagulación, intercambio iónico, skimming, entre otros (Samuel *et al.*, 2023). La desventaja de estos tratamientos es que pueden ser poco selectivos y costosos, además pueden generar otros tipos de residuo contaminantes. Frente a estas tecnologías, la biorremediación emerge como una herramienta biotecnológica prometedora para dar solución a esta problemática de una manera más sostenible, reduciendo el impacto ambiental y los costos asociados (Macaya *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2021; Mahesh *et al.*, 2022).

La biorremediación es una metodología integral que abarca diferentes enfoques, estrategias y prácticas destinadas a enfrentar la problemática de contaminación ambiental.

Esta técnica aprovecha la capacidad metabólica de seres vivos específicos para biodegradar, transformar, bioacumular y/o neutralizar desechos tóxicos y peligrosos, facilitando así, la restauración de ecosistemas contaminados. Esto es posible ya que los seres vivos utilizados, específicamente los microorganismos, tienen la capacidad de usar un amplio rango de contaminantes como fuente de energía (Singh *et al.*, 2021), ya sea por medio de rutas aeróbicas, anaeróbicas o una combinación de ambas. La biorremediación ocurre naturalmente en los ciclos biogeoquímicos de la Tierra, denominándose en estos casos “biorremediación intrínseca” o “atenuación natural”, sin embargo, el ser humano cada vez juega un papel más activo en la inducción y el control de la biorremediación a través de la manipulación de los factores ambientales y la aplicación de organismos y nutrientes, con el propósito de acelerar y mejorar la descontaminación de sitios afectados (Mahesh *et al.*, 2022), por ejemplo, por derrames de petróleo, vertederos, actividades industriales, uso de agroquímicos y otras fuentes de contaminación.

1.1.1. Tipos de biorremediación: *ex situ* e *in situ*

Existen diferentes formas de categorizar los tipos de biorremediación, uno de los criterios utilizados es según lugar de aplicación. Bajo este criterio, se distinguen dos categorías: la biorremediación “*ex situ*” e “*in situ*” (Megharaj *et al.*, 2014).

La biorremediación *ex situ* es un enfoque de tratamiento que implica la remoción de la matriz contaminada del sitio original, de esta manera, el área contaminada es removida y transportada a instalaciones específicas para su tratamiento. Al llevarse a cabo fuera del sitio original, se reduce el riesgo de que los contaminantes se propaguen en el entorno y se puede tener un mayor control sobre las condiciones del proceso de tratamiento (e.g., temperatura, humedad, disponibilidad de nutrientes). Algunos ejemplos de biorremediación *ex situ* incluyen tratamiento en biorreactores, biofiltración, compostaje, landfarming y biopilas.

La biorremediación *in situ*, por su parte, se lleva a cabo directamente en el sitio contaminado, sin la necesidad de remover la matriz contaminada. Al evitar la remoción de material se reduce el disturbio ambiental y se preserva la integridad del sitio, sin embargo,

se dificulta tener control de los parámetros ambientales y dar seguimiento al tratamiento. Algunos ejemplos de biorremediación *in situ* incluyen las metodologías de bioestimulación, bioaumentación y bioventing.

La biorremediación *ex situ* suele ser más costosa que la biorremediación *in situ* por varias razones, entre las que se puede mencionar el costo asociado a remover y transportar la matriz contaminada, la necesidad de infraestructura especializada, costo asociado a manejo de residuos y necesidad de mayor mano de obra.

1.1.2. Bioaumentación

La bioaumentación es una técnica ampliamente utilizada en biorremediación, especialmente en situaciones donde la microbiota autóctona del medio no es capaz de degradar eficazmente los contaminantes presentes. Esta técnica implica la aplicación de microorganismos exógenos y/o autóctonos en el sitio contaminado, con el propósito de aumentar la capacidad de degradación de los contaminantes (Macaya *et al.*, 2019). De esta manera, se seleccionan microorganismos específicos que tienen la capacidad de degradar/atenuar los contaminantes objetivos (e.g., hidrocarburos, compuestos orgánicos persistentes, metales pesados, pesticidas) (Azubuike *et al.*, 2016). Los microorganismos son aplicados de manera controlada en el sitio contaminado, generalmente mediante la inoculación directa en la matriz mediante la aplicación de soluciones o productos biológicos o por medio de técnicas de inmovilización.

1.1.3. Limitaciones en bioaumentación

Diversos factores inciden en el éxito del proceso de biorremediación. Algunas dificultades asociadas a estos procesos pueden incluir la persistencia de los contaminantes, transformaciones incompletas de los mismos y una tasa de degradación lenta. Respecto a la estrategia de bioaumentación, puede existir disminución en la viabilidad microbiana debido al estrés ocasionado por cambios drásticos en las condiciones ambientales como, por ejemplo, variaciones de pH, temperatura, salinidad, concentración de nutrientes y la propia toxicidad de los contaminantes y sus metabolitos. Puede ocurrir también que exista competencia por nutrientes y depredación entre microorganismos inoculados y autóctonos

(Macaya *et al.*, 2019). De este modo, la implementación de esta biotecnología requiere un cuidadoso diseño, ya que es necesario realizar un seguimiento continuo del proceso para evaluar la efectividad de los microorganismos introducidos, así como su supervivencia y nivel de actividad en el sitio afectado.

1.1.4. Matrices de biorremediación

La biorremediación puede aplicarse en distintas matrices contaminadas, siendo las más convencionales: suelo, aguas subterráneas, aguas superficiales, sedimentos, residuos sólidos y lodos. Cada matriz presenta sus propios desafíos y requiere enfoques específicos de biorremediación adaptados a las características del contaminante, las propiedades del medio y los objetivos de remediación establecidos.

En la Tabla 1 se presenta un resumen con algunas tecnologías de biorremediación, las matrices donde se aplican y los contaminantes objetivo.

Tabla 1. Tecnologías de biorremediación y matriz de aplicación. Principales tecnologías utilizadas en tratamientos de biorremediación, matrices de aplicación y contaminantes objetivos. Manual de tecnologías de remediación de sitios contaminados, CORFO, FSH; Megharaj *et al.*, 2014.

Tecnología	Matriz	Contaminantes objetivos
Bioaumentación		
Promoción de la biodegradación o biotransformación de contaminantes presentes en suelos y/o aguas subterráneas mediante la adición de microorganismos con capacidad de degradación de contaminantes orgánicos. Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado o cuando la microflora nativa es insuficiente en número o capacidad degradadora.	Suelo, lodos, aguas subterráneas	Benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (BTEx); hidrocarburos de petróleo; pesticidas; disolventes
Bioestimulación		
Promoción de la biodegradación, biotransformación y/o aceleración de las reacciones de biodegradación mediante la optimización de las condiciones medioambientales que favorecen el crecimiento de aquellos microorganismos que realicen la metabolización de contaminantes orgánicos presentes en suelos y/o agua subterránea.	Suelo, lodos, aguas subterráneas	BTEx, hidrocarburos de petróleo, pesticidas, disolventes.

Bioventilación

Estimulación de la biodegradación natural de compuestos contaminantes en condiciones aeróbicas, mediante el suministro de aire (enriquecido en O₂) a través de pozos de inyección, suministrando solamente el oxígeno necesario para sostener la actividad de los microorganismos degradadores.

Suelo

Hidrocarburos de petróleo,
hidrocarburos no clorados, pesticidas.

Biorreactores/Lodos biológicos

Degradación en fase acuosa llevada a cabo mediante microorganismos en suspensión o inmovilizados en fase sólida. El tratamiento puede realizarse en lagunas construidas para este fin o bien en reactores sofisticados con control automático de mezclado.

Suelo, lodos,
aguas
subterráneas

Explosivos (TNT),
hidrocarburos (BTEX),
hidrocarburos poliaromáticos (PAH), pesticidas, conservantes de madera

Biolabranza / Land farming

Variación del compostaje en la cual el suelo contaminado es mezclado con agentes de volumen y nutrientes, y es removido periódicamente mediante el arado, favoreciendo su aireación. Las condiciones del suelo (pH, temperatura, aireación) son controladas, optimizando la velocidad de degradación. Generalmente se incorporan cubiertas u otros métodos para el control de lixiviados

Suelo, lodos,
sedimentos

Hidrocarburos totales del petróleo (TPH),
pentaclorofenol (PCP), pesticidas

Compostaje

Estimulación de la actividad biodegradadora, aerobia y anaerobia, de microorganismos nativos bajo condiciones termofílicas (54 a 65 °C), permitiendo transformar compuestos orgánicos tóxicos en sustancias inocuas. El material contaminado es mezclado con sustancias orgánicas sólidas biodegradables (agentes de volumen: paja, aserrín, estiércol, desechos agrícolas), mejorando el balance de nutrientes y asegurando una mejor aireación y generación del calor durante el proceso.

Suelo, lodos,
sedimentos

Explosivos,
hidrocarburos (PAH),
pesticidas, PCP

Biotransformación de metales		
Inmovilización y/o transformación microbiana de metales u otros compuestos inorgánicos presentes en suelos contaminados mediante mecanismos de oxidación, reducción, metilación, dimetilación, formación de complejos, biosorción y/o acumulación intracelular, entre otros	Suelo	Metales pesados
Fitorremediación		
Remoción, transferencia, estabilización, concentración y/o destrucción de contaminantes (orgánicos e inorgánicos) presentes en suelos, lodos y sedimentos, mediante la utilización de especies vegetales. Son mecanismos de fitorremediación la rizodegradación, la fitoextracción, la fitodegradación, la fitovolatilización y la fitoestabilización	Suelos y sedimentos	Metales, pesticidas, solventes, explosivos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, crudo
Biopilas		
Variación del compostaje en la cual, además de agentes de volumen, se adiciona agua y nutrientes. Las pilas de suelo generalmente se cubren con plástico para controlar los lixiviados, la evaporación y la volatilización de contaminantes, además de favorecer su calentamiento.	Suelo	Derivados del petróleo, compuestos orgánicos volátiles halogenados y no halogenados, compuestos orgánicos semivolátiles y pesticidas

Las matrices no convencionales de biorremediación, por su parte, son entornos contaminados que presentan características distintas a las matrices convencionales. Estos entornos pueden requerir enfoques especiales de biorremediación dadas sus propiedades y condiciones ambientales únicas o la presencia de contaminantes difíciles de tratar. Un ejemplo de matriz no convencional para la aplicación de biorremediación es el área foliar de las plantas (filósfera).

1.1.5. Filósfera como matriz no convencional de biorremediación

La filósfera es un término utilizado en ecología para referirse al ecosistema formado en la superficie aérea de la planta, como hojas, tallos y flores, colonizadas por macro y microorganismos. Se considera uno de los hábitats terrestres más grandes, estimándose que su superficie a escala global es mayor a $4 \times 10^8 \text{ km}^2$, lo cual representa aproximadamente el 78% de la superficie total de la tierra (Wei *et al.*, 2017) (Figura 1). Se ha evidenciado que las asociaciones entre plantas y microorganismos promueven el desarrollo de las plantas y, además, aumentan la resiliencia de estas para sobrellevar los factores bióticos y abióticos estresantes. De esta manera, los microorganismos confieren beneficios significativos para que las plantas puedan enfrentar la contaminación y los fenómenos asociados al cambio climático (Franzetti *et al.*, 2020; Mandal *et al.*, 2023).

La colonización microbiana en las hojas puede ocurrir a nivel superficial (epífitos) como también en la parte interna de las hojas (endófitos). Las bacterias epífitas son microorganismos que viven en la superficie externa de plantas, como hojas, tallos o flores, sin causar daño a la planta huésped, formando parte de la comunidad microbiana que habita en la filósfera.

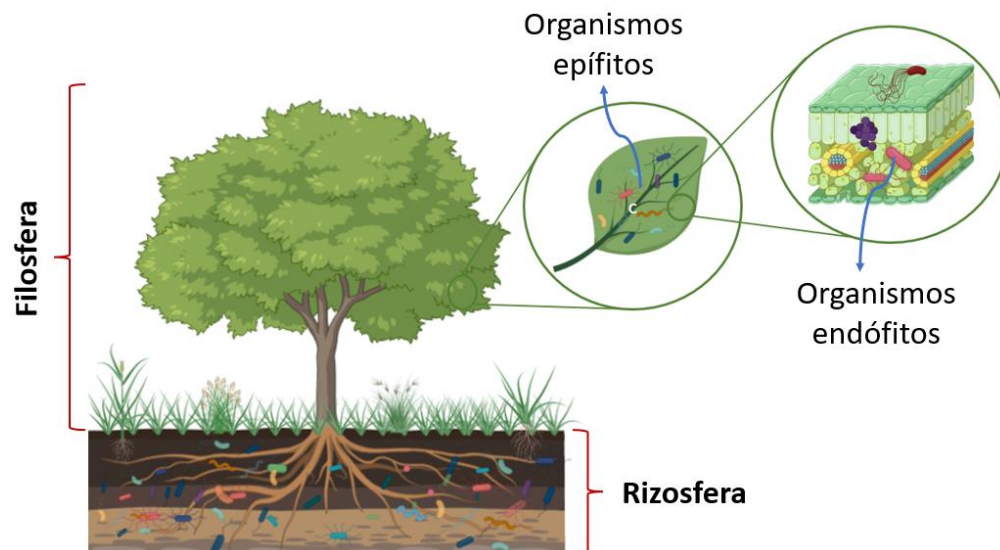


Figura 1. Interacciones entre las partes de las plantas y la colonización microbiana.
Elaboración propia.

La contaminación atmosférica resulta ser una amenaza para diversos ecosistemas. Las plantas, siendo seres sésiles, se hallan particularmente expuestas a este riesgo, pues carecen de movilidad para alejarse de la fuente contaminante. En este contexto, los microorganismos desempeñan un rol crucial, auxiliando a las plantas en la defensa contra los contaminantes (Mandal *et al.*, 2023). Un estudio realizado en Italia (Milán), desarrollado por Franzetti y colaboradores (2020), permitió evidenciar cómo los microorganismos presentes en las hojas pueden contribuir eficazmente a reducir mediante biodegradación los contaminantes atmosféricos. En este estudio se observó que la cantidad de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos en hojas perennes aumenta con el aumento de la concentración de contaminantes atmosféricos, lo que sugiere que la biodegradación en la filósfera podría ayudar a eliminar compuestos como los PAHs del aire urbano, evidenciando los servicios ecosistémicos de los árboles y las plantas. De esta manera, se plantea que la eliminación de contaminantes por atenuación natural en las hojas de los árboles urbanos podría tener enormes impactos a escala de ciudad. Estos hallazgos respaldan la relevancia de la relación entre las plantas y las bacterias epifíticas en la depuración y descomposición de contaminantes, presentándose el área foliar de las plantas como una matriz no convencional de biorremediación con gran potencial y que resulta interesante de explorar.

No sólo los contaminantes atmosféricos pueden afectar el área foliar de plantas, otros contaminantes pueden causar daños en las hojas y otras estructuras vegetales, por ejemplo, metales pesados, residuos de fertilizantes químicos y plaguicidas. Estos últimos resultan de gran interés considerando la naturaleza extractiva intensiva de la agricultura en los tiempos modernos.

1.2. Plaguicidas y agricultura moderna

La agricultura es la principal actividad productora de alimentos. Históricamente los cultivos se han visto amenazados por plagas y enfermedades que generan pérdidas y disminución de valor en la producción. Frente a ello, se han utilizado diversos métodos para controlar las plagas y enfermedades que dañan los cultivos. En un principio, se utilizaban plaguicidas compuestos con alto contenido de azufre, metales pesados y extractos

vegetales. Luego, a mediados del siglo XX, la industria petroquímica desarrolló en forma masiva plaguicidas de síntesis química, como son los compuestos organoclorados, fosforados, carbamatos, piretroides, entre otros.

En Chile, en la Resolución N° 3670 de 1999 que establece normas para la evaluación y autorización de plaguicidas, se define como plaguicida a cualquier “compuesto químico, orgánico o inorgánico, o sustancia natural que se utilice para combatir malezas, enfermedades o plagas potencialmente capaces de causar perjuicios en organismos u objetos. Se entenderá cada producto formulado y las sustancias activas con las que se formulan, con aptitudes insecticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas, rodenticidas, lagomorficidas, avicidas, fungicidas, bactericidas, alguicidas, herbicidas, defoliantes, desecantes, fitorreguladores, coadyuvantes, antitranspirantes, atrayentes, feromonas, repelentes, y otros que se empleen en las actividades agrícolas y forestales”.

Si bien el uso de plaguicidas permitió aumentar el rendimiento de las cosechas significativamente, su aplicación crónica y a largo plazo generó impactos negativos sobre el medio ambiente y la salud de la población. Estos efectos adversos se atribuyen al uso indiscriminado de estos agroquímicos, su inadecuada manipulación y el consumo de alimentos contaminados con plaguicidas (ACHIPIA, 2013).

1.2.1. Herbicidas

Los herbicidas son un tipo de plaguicida que se utiliza ampliamente en la agricultura para el control y eliminación de hierbas. Esto debido a que las malezas compiten con los cultivos de interés frente a los recursos nutricionales, luz y agua, generando pérdidas entre el 30% y el 90% del rendimiento productivo (Quareshy *et al.*, 2017). Los primeros herbicidas se comercializaron a finales de la década de 1940 y se transformaron en la herramienta más eficaz para el control de hierbas no deseadas, eliminando entre el 90% y el 99% de las malezas objetivo (Délye *et al.*, 2013), esto explica que exista un aumento constante en la cantidad de herbicidas utilizados a nivel mundial hoy en día, debido a una creciente demanda alimenticia.

En la Tabla 2 se presenta la clasificación de los herbicidas según su mecanismo de acción, esta clasificación fue creada por el Comité de acción de resistencia a los herbicidas (HRAC) en los años 80 y se encuentra actualizada al año 2024. La Figura 2 presenta los mecanismos de acción de los herbicidas.

Tabla 2. Clasificación de herbicidas. Clasificación según mecanismos de acción del Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas (HRAC). HRAC Europe, 2021.

Clasificación numérica	Clasificación por letras	Modo de acción
1	A	Inhibición de la enzima Acetil CoA carboxilasa
2	B	Inhibición de la enzima ALS (acetolactato sintasa)
3	K1	Inhibición de microtubulinas
4	O	Inhibidores auxínicos
5	C1, C2	Inhibición del fotosistema II (Serina 264)
6	C3	Inhibición del fotosistema II (Histidina 215)
9	G	Inhibición de la enzima enolpyruvil sinkimata fosfato sintetasa (EPSPS)
10	H	Inhibición de la enzima glutamina sintetasa
12	F1	Inhibición de la enzima fitoena desaturasa (PDS)
13	F4	Inhibición de la enzima dosi-xiulosa fosfato sintetasa (DOXP)
14	E	Inhibición de la enzima protoporfirina oxidasa (PPO)
15	K 3	Inhibición de los ácidos grasos de cadena larga
18	I	Inhibición de la enzima dihidropteroata sintasa (DHP)
19	P	Inhibición del transporte de auxinas
22	D	Inhibición del fotosistema I
23	K2	Inhibición de la organización de microtubulinas
24	M	Desacopladores

27	F2	Inhibición de la enzima hidroxifenil piruvato dioxigenada (HPPD)
28	--	Inhibición de la enzima dihidroorotate deshidrogenasa
29	L	Inhibición de la síntesis de celulosa
30	Q	Inhibición de la enzima de ácidos grasos tioesterasa (FAT)
31	R	Inhibición de la proteína serina treonina fosfatasa
32	S	Inhibición de la enzima solanesil difosfato sintasa (SDS)
33	T	Inhibición de la enzima homogentisato solanesiltransferasa
34	F3	Inhibición de la enzima licopene ciclasa
--	Z	Desconocido

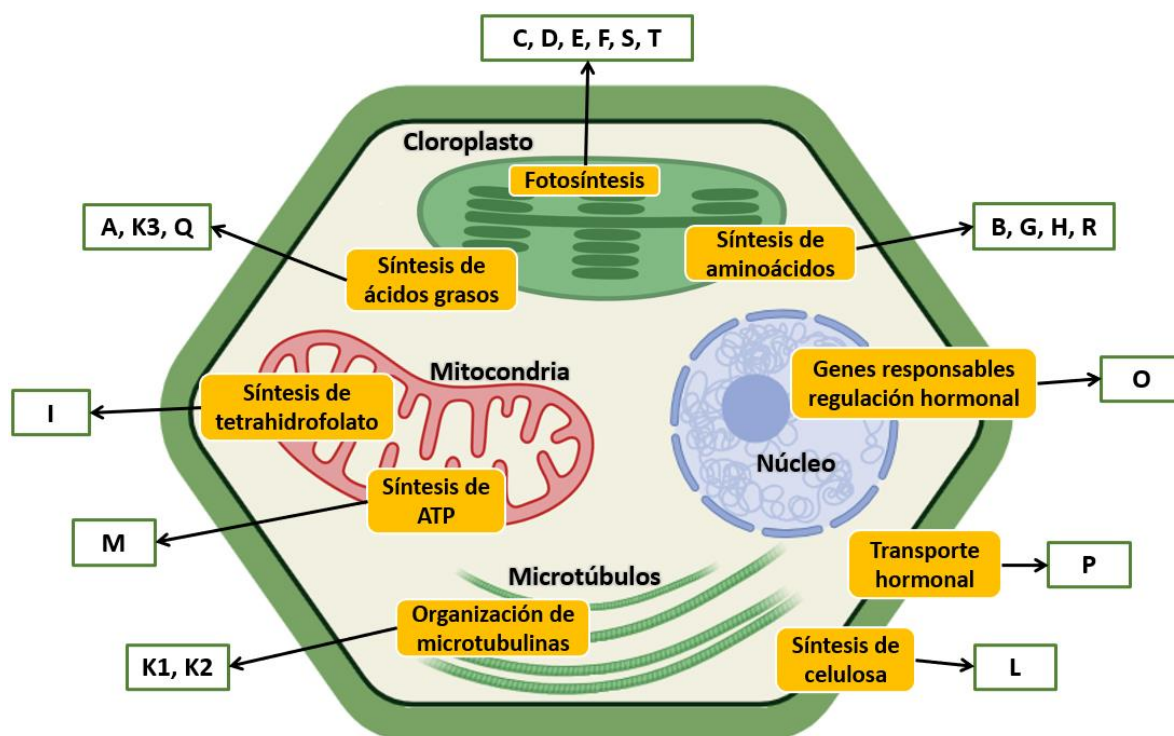


Figura 2. Mecanismos de acción de herbicidas. Objetivos celulares de la acción de herbicidas y clasificación de herbicidas por modo de acción según el Comité de Acción para la Resistencia a Herbicidas (HRAC). Adaptado y actualizado de Délye et al., 2013.

Dentro de los herbicidas más utilizados se encuentran aquellos derivados del grupo químico de las *s*-triazinas (Clasificación 5, C1), debido a que su alta estabilidad estereoquímica les permite permanecer estables y activos en el medio ambiente por tiempos prolongados después de su aplicación (Baranowska *et al.*, 2008). En la Figura 3 se presentan las estructuras químicas de los herbicidas clasificados en el grupo 5-C1 (HRAC) que inhiben la fotosíntesis a nivel de fotosistema II. Se puede apreciar que la mayor parte de estos herbicidas corresponden a triazinas y ureas. Se ha destacado en un recuadro rojo el herbicida simazina, un herbicida clorado perteneciente al grupo de las *s*-triazinas que es ampliamente utilizado en Chile en una gran variedad de cultivos (SAG, 2024).

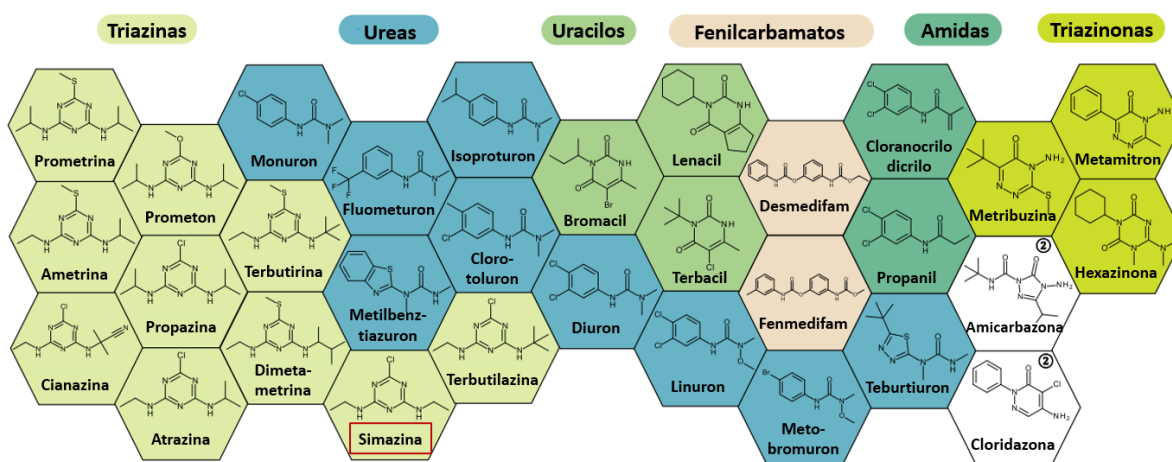


Figura 3. Herbicidas pertenecientes al grupo 5-C1 (HRAC). Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis a nivel de fotosistema II. Se destaca el herbicida simazina en un recuadro rojo. HRAC Europe, 2021.

1.2.2. Simazina, una clase de herbicida de *s*-triazina

La simazina es un herbicida que se ha utilizado ampliamente en campos agrícolas y forestales. Dentro de sus características se puede mencionar que es un herbicida sistémico, selectivo y de acción residual. Un herbicida sistémico es aquel que afecta a todo el conjunto de la planta, debido a que esta lo absorbe y transporta a otros órganos a través de su sistema vascular, de este modo, la simazina impide el transporte fotosintético de electrones en el fotosistema II, por lo que no ocurre la fotólisis del agua ni la liberación de oxígeno en

el proceso fotosintético. Es selectivo ya que elimina tipos específicos de hierba preservando el cultivo de interés sobre el que se aplica. Finalmente, su acción residual se atribuye a que la simazina permanece activa en el suelo por un tiempo prolongado que puede oscilar entre 4 y 12 meses (Montiel & Sánchez, 1996).

En cuanto a su estructura química, la simazina pertenece al grupo de las s-triazinas, siendo un anillo heterocíclico con tres átomos de nitrógeno, un radical cloro en el carbono 6 y en los carbonos 2 y 4 presenta un grupo amino unido a una cadena de 2 carbonos (Figura 4). También se caracteriza por ser un compuesto hidrofóbico con alta tendencia a la lixiviación, por lo que no solo contamina suelos y aguas superficiales, sino que también alcanza las aguas subterráneas (Flores *et al.*, 2009).

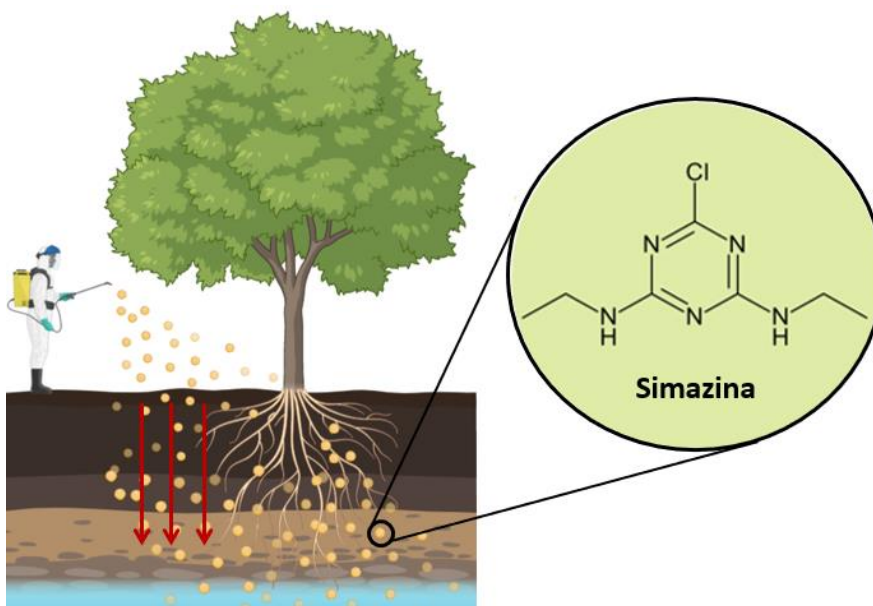


Figura 4. Estructura química de la simazina. Representación de la alta tendencia a lixiviación de la simazina, que ocasiona contaminación de suelos y aguas subterráneas. Elaboración propia.

Si bien es considerado un plaguicida peligroso dado su potencial mutagénico y cancerígeno (Birnbaum & Fenton, 2003; Hayes *et al.*, 2006), en Chile existen nueve marcas de herbicidas con simazina como sustancia activa (Anexo II) que están aprobadas por el SAG

(SAG, 2024) y se utilizan en gran variedad de cultivos, entre ellos, los cultivos de palto (Tabla 3).

Tabla 3. Instrucciones de uso de Simazina 500 SC. Autorización del Servicio Agrícola y Ganadero N° 3459/2003.

Cultivo	Dosis (Lt/ha)	Observaciones
Vides, Manzanos, Perales, Limonero, Naranja, Mandarino, Clementino, Pomelo, Tangelo, Paltos, Olivos, Nogales, Kiwis, Duraznero, Nectarino, Ciruelo, Damasco, Cerezo	4-7	Aplicar en plantas de más de tres años de establecidas. Usar dosis más altas en suelos pesados y de mayor contenido de materia orgánica. Aplicar en período de lluvias a fin de incorporar y activar el herbicida.
Espárragos	4-5	Aplicar antes de la emergencia de los turiones. En espárrago blanco, aplicar lo antes posible después de la aporca y regar si no llueve. El cultivo debe tener a lo menos un año de establecimiento
Arándano, Frambuesa, Mora, Zarparrilla	4-5	Aplicar previo a la germinación de las malezas en período de lluvias.
Lupino	2-4	Aplicar en la pre-emergencia del cultivo y de las malezas
Plantación Eucaliptus	3-7	Aplicar de pre o postplantación, con suelo húmedo, previo a la emergencia de las malezas, en período de lluvias. Usar dosis mayor en suelos con más alto contenido de materia orgánica.

Plantación Pinos	3-5	Aplicar en post-plantación (40 días) y en la preemergencia de las malezas, durante el período de lluvias.
-------------------------	-----	---

1.2.3. Impacto ambiental de la simazina

La simazina se aplica de forma periódica sobre campos destinados a la agricultura y la silvicultura en dosis de 1,12 a 2,24 kg/ha para regular el crecimiento de hierbas no deseadas (Baranowska *et al.*, 2008), sin embargo, se estima que solo el 0,1% aplicado alcanza la plaga objetivo (Flores *et al.*, 2009), mientras que la fracción principal ingresa al ambiente generando una variedad de impactos negativos. Dada su alta tendencia a la lixiviación y baja adsorción, la simazina no solo contamina los suelos donde se aplica, su alta movilidad lo posiciona como uno de los pesticidas más comúnmente detectado en aguas superficiales y subterráneas en Estados Unidos, Europa y Australia (Morgante *et al.*, 2012). Por otra parte, al ser estable químicamente, tiene la capacidad de bioconcentrarse a lo largo de la cadena trófica (Figura 5), siendo absorbida por las plantas (productores primarios) desde el suelo y transferida a niveles tróficos superiores hasta llegar a los consumidores terciarios (Baranowska *et al.*, 2008). De este modo, este herbicida en el medio ambiente resulta tóxico no solo para la plaga objetivo, sino también, para el ecosistema circundante que incluye a los insectos, organismos acuáticos, aves y mamíferos, incluyendo al ser humano (Birnbaum & Fenton, 2003; Hayes *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2023).

Si bien la simazina y otros herbicidas son de uso activo a nivel de suelo, durante su aplicación, también resultan contaminados los cultivos de interés, quedando remanentes de plaguicidas sobre las hojas, tallos y frutos. Diversos estudios han permitido detectar estos agroquímicos no solo en muestras de suelo y agua (superficiales y subterráneas), sino también, en extractos de frutas, jugos y leche (Baranowska *et al.*, 2008).

La vigilancia ambiental de contaminantes persistentes, como la simazina, ha adquirido una importancia crítica a nivel global debido a las amenazas significativas que plantean tanto para el ecosistema como para la salud pública (Hyun *et al.*, 2021). Esta

necesidad imperante ha impulsado el desarrollo de técnicas analíticas de laboratorio que permiten la detección y cuantificación de estos contaminantes para su monitoreo continuo. Entre las tecnologías ampliamente utilizadas para este fin se encuentra la cromatografía.

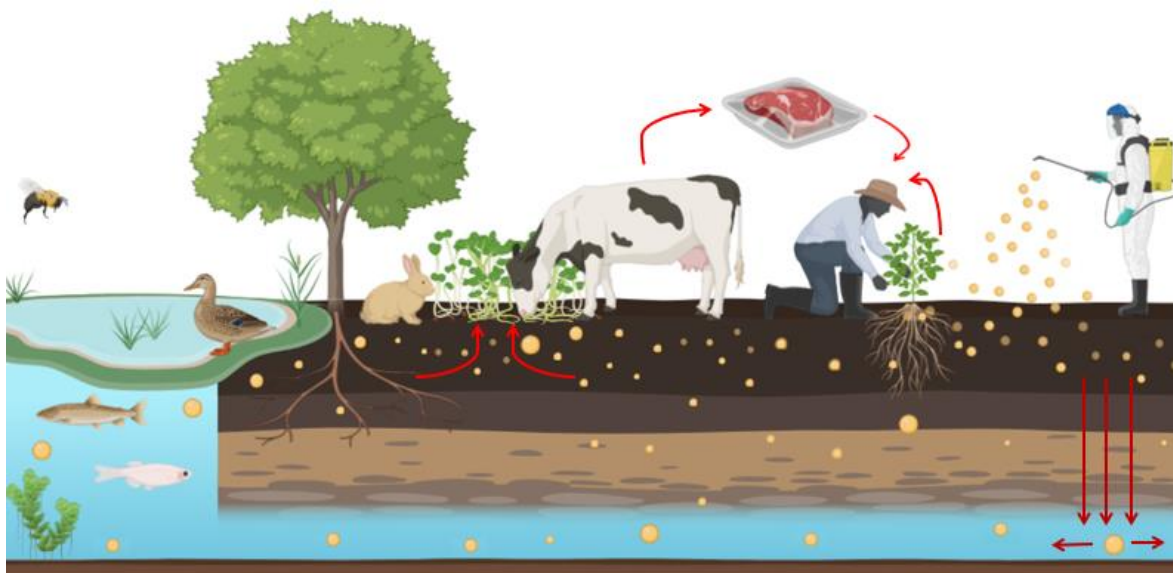


Figura 5. Movilidad e impacto de la simazina en el medio ambiente y la cadena trófica.
Elaboración propia.

1.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alto rendimiento o de alta resolución, HPLC por sus siglas en inglés “High-Performance Liquid Chromatography”, es una técnica analítica que permite separar, identificar y cuantificar compuestos específicos presentes en mezclas complejas. En sus inicios, esta técnica se utilizaba para separar pigmentos vegetales, sin embargo, hoy en día su campo de aplicación se extiende a todas las áreas de investigación a escala macro y micro. Entre sus aplicaciones se encuentran el estudio de fármacos, biomoléculas, componentes de productos alimenticios, química forense, medicina clínica y el estudio de contaminantes como los plaguicidas (Tabla 4). De esta manera, resulta ser una metodología que se caracteriza por su versatilidad, ya que permite separar mezclas de diferente naturaleza como, por ejemplo, macromoléculas, grupos polifuncionales y especies iónicas.

Si bien es considerada una tecnología de alto costo, también es efectiva y de rápida respuesta (Skoog *et al.*, 2008).

Tabla 4. Aplicaciones comunes de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Skoog *et al.*, 2008.

Campo	Mezclas características
Fármacos	Antibióticos, sedantes, esteroides, Analgésicos
Bioquímica	Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos
Productos alimenticios	Edulcorantes artificiales, alimenticios antioxidantes, aflatoxinas, aditivos
Productos de la industria química	Aromáticos condensados, tensoactivos, propulsores, colorantes
Contaminantes	Plaguicidas, herbicidas, fenoles, bifenilos policlorados
Ciencias forenses	Fármacos, venenos, alcohol en sangre, narcóticos
Química clínica	Ácidos biliares, metabolitos de fármacos, extractos de orina, estrógenos

Esta metodología analítica utiliza como mecanismo de separación el reparto, en donde los componentes de una mezcla (muestra) se distribuyen en dos fases en función de su solubilidad relativa en cada una de ellas (Legaz *et al.*, 2011). Una de las fases es estacionaria mientras que la otra se mueve a lo largo del sistema movilizandolos analitos de la muestra. De esta manera, los analitos se desplazan a lo largo del sistema con diferentes velocidades, dependiendo de su afinidad por la fase estacionaria respecto de la fase móvil. La fase estacionaria suele estar contenida en una columna y puede ser un sólido, un líquido sobre base sólida o bien un gel, mientras que, la fase móvil, puede ser gaseosa o líquida dependiendo del equipo cromatográfico (Harris, 2003).

Respecto a la composición de la fase móvil, cuando esta permanece constante durante el análisis, se denomina “sistema de fase móvil isocrático”, sin embargo, existen metodologías que requieren ir variando la composición de la fase móvil a lo largo del análisis, en estos casos se denomina “sistema de fase móvil en gradiente”.

Para permitir que la fase móvil traslade los componentes de la muestra a lo largo del sistema, el equipo presenta un sistema de bombeo que es capaz de generar altas presiones por encima de 400 atm. Por otra parte, existen válvulas que regulan la entrada y salida de la fase móvil en el sistema. Respecto al sistema de inyección, la muestra debe estar en estado líquido o bien en una solución que resulte compatible con la fase móvil y la fase estacionaria, normalmente se inyecta entre 5 μL y 10 μL mediante jeringas de alta presión o con un sistema de válvulas inyectoras (Harris, 2003).

En cromatografía líquida, se denomina “fase reversa” a aquella condición en que la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil del sistema, de este modo, los analitos polares eluyen en primer lugar al tener poca afinidad con la fase estacionaria, mientras que, los analitos apolares, al tener mayor afinidad por la fase estacionaria, demoran mayor tiempo en eluir y, por ende, en ser detectados. El tiempo que tarda un analito específico en pasar a través de la columna de cromatografía desde su introducción hasta su detección, se denomina “tiempo de retención” (Colin, 2003).

Finalmente, a medida que los analitos eluyen de la columna, se mide su concentración mediante un sistema de detección. Los detectores se pueden clasificar en dos categorías: aquellos que responden a propiedades generales del eluyente, como el índice de refracción o la conductividad, y aquellos que responden a propiedades específicas del analito, como la absorbancia UV y fluorescencia. En ambos casos, la señal del detector se ve afectada por la presencia y la concentración del analito en la muestra (LaCourse, 2017). La concentración se representa en función del volumen de la fase móvil o bien según el tiempo que transcurre entre la introducción de la muestra y su elución. Así, se obtiene una gráfica denominada cromatograma en donde cada pico representa la respuesta del detector para un analito diferente. Las aplicaciones cuantitativas de la cromatografía en

columna se basan, por lo general, en la comparación del área bajo la curva del analito, obtenido en el cromatograma, con respecto a los patrones de concentración conocidos previamente mediante la construcción de curvas de calibración. La curva de calibración es una relación matemática que se establece entre la concentración conocida de un analito de interés y la respuesta (pico) entregada por el detector del equipo y debe ser lineal en el rango de concentraciones utilizadas. Una vez se ha establecido esta relación lineal, se puede utilizar para determinar la concentración del analito de interés en muestras desconocidas midiendo su respuesta detectada y utilizando la ecuación de la curva de calibración para calcular su concentración (Legaz *et al.*, 2011). En la Figura 6 se presenta un esquema general con las partes de un equipo HPLC.

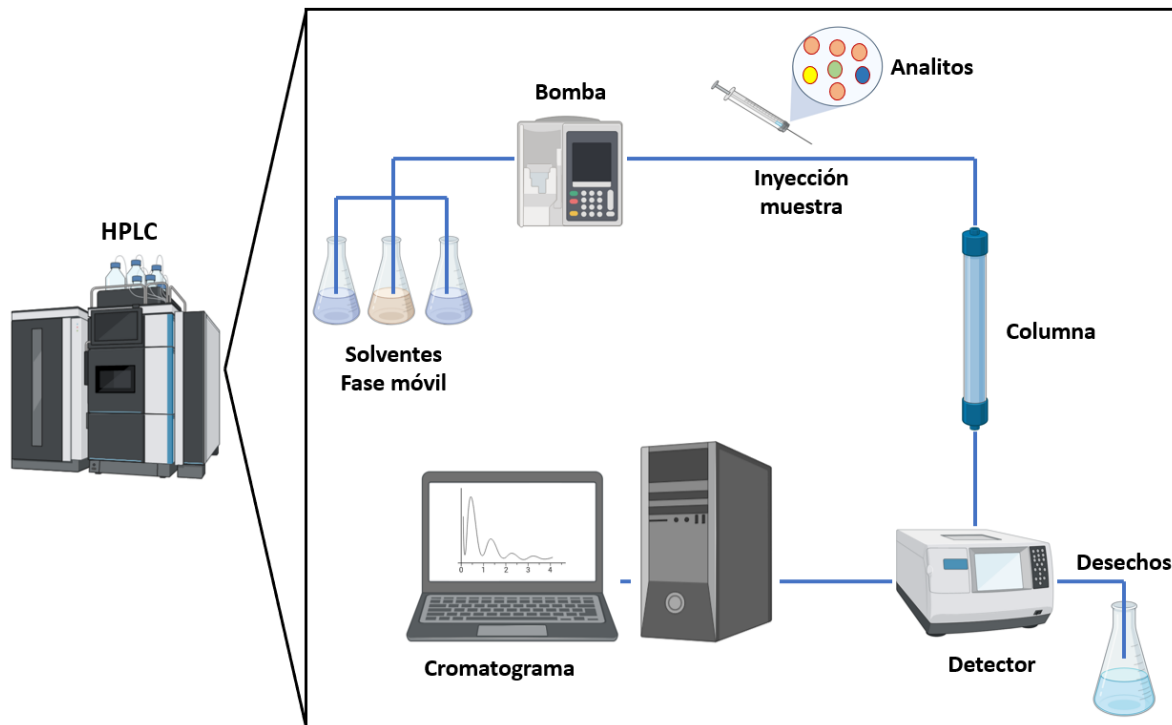


Figura 6. Esquema general de componentes de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Elaboración propia.

1.3.1. Identificación y cuantificación de simazina desde suelos agrícolas mediante HPLC

Hernández y colaboradores (2008) realizaron una investigación cuyo propósito era buscar y aislar cepas bacterianas innovadoras con la capacidad de degradar *s*-triazinas presentes en suelos agrícolas del valle de Quillota, ubicado en el centro de Chile. Para lograr este objetivo, se emplearon suelos tratados de forma crónica con simazina. En este estudio se llevaron a cabo análisis fisiológicos, bioquímicos y moleculares con el fin de caracterizar e identificar los aislamientos bacterianos que podrían representar valiosos biocatalizadores para la biorremediación de suelos. La simazina fue extraída desde las muestras con isooctano y cuantificada utilizando cromatografía líquida de alta resolución. Las muestras fueron analizadas utilizando un cromatógrafo líquido equipado con un detector de matriz de diodos y una columna RP-C18/Lichrospher de 5 μm . El cromatógrafo fue operado a temperatura ambiente y la detección UV/Vis a 230 nm. Las muestras se eluyeron con una velocidad de flujo de 1 ml/min utilizando una fase móvil compuesta por un 67% (v/v) de acetonitrilo y 33% de agua acidulada con ácido fosfórico (pH 2.0).

Dependiendo de la matriz desde la cual se extrae el analito de interés (simazina en este caso) se pueden modificar los métodos para lograr su correcta identificación y cuantificación. Esto ocurre ya que podrían existir otros compuestos en la matriz con estructuras químicas similares al analito de interés que podrían ser detectados por el equipo HPLC e interferir en las lecturas de los cromatogramas obtenidos. La metodología descrita resulta ser un método analítico base que podría ser adaptado a muestras provenientes desde otras matrices.

En la metodología descrita se utiliza un sistema de detección UV/Vis. En los detectores UV/Vis, la fase móvil pasa a través de una celda de flujo donde se encuentra un haz de radiación UV/Vis. Cuando un soluto que absorbe este tipo de radiación atraviesa la celda, se genera una señal eléctrica proporcional a su concentración. Solo se detectan compuestos que absorben UV/Vis, como alquenos, compuestos aromáticos y compuestos con múltiples enlaces entre C y O, N o S. De este modo, los componentes de la fase móvil deben seleccionarse cuidadosamente para evitar la absorción de radiación y que no se

detecten. La absorción de la radiación es una función de la concentración, según lo describe la ley de Beer-Lambert: $A = \epsilon bc$, donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción molar y b es la longitud del camino óptico de la celda del flujo (La Course, 2017).

Existen tres tipos principales de detectores de absorbancia: fijos, variables y de matriz de fotodiodos. Los detectores fijos utilizan una fuente de luz con una longitud de onda específica, mientras que los detectores variables permiten la selección flexible de la longitud de onda. Los detectores de matriz de fotodiodos, por su parte, generan un espectro en tiempo real para cada soluto eluido, lo que facilita su identificación.

Respecto a la columna utilizada, la columna C18 es altamente compatible con compuestos hidrofóbicos (como la simazina) ya que utiliza una fase estacionaria compuesta por cadenas de enlaces silicio-oxígeno (Si-O) que proporciona interacciones hidrofóbicas con este tipo de analitos. Así, la columna C18 es ampliamente utilizada para separar compuestos orgánicos no polares o ligeramente polares. Por otra parte, esta columna es versátil ya que es compatible con distintos solventes (fase móvil) como acetonitrilo, metanol y agua (Harris, 2003).

1.4. Biodegradación de s-triazinas: bacterias degradadoras

Los microorganismos autóctonos del suelo degradan de forma natural gran variedad de pesticidas, pero a veces generan productos de degradación persistentes en el medio ambiente a través de un metabolismo o transformación incompleta (Stelting *et al.*, 2012).

La manera en que los microorganismos intervienen en el destino de las s-triazinas en el medio ambiente es objeto de una intensiva investigación. Se han reportado en detalle enzimas y genes que intervienen en la desalquilación, descloración y mineralización subsiguiente de las s-triazinas en compuestos inofensivos como dióxido de carbono y amoníaco (Mandelbaum *et al.*, 2008).

Se han identificado bacterias capaces de degradar los herbicidas s-triazinas. Estas bacterias suelen ser aisladas de suelos agrícolas que han sido expuestos repetidamente a estos herbicidas, desempeñando un papel importante en la biorremediación de suelos contaminados con agroquímicos (Rousseaux *et al.*, 2003; Morgante *et al.*, 2012).

En la Tabla 5, se presentan microorganismos capaces de degradar herbicidas de s-triazinas.

Tabla 5. Microorganismos degradadores de herbicidas s-triazinas en cultivo puro.
Adaptado de Mandelbaum *et al.*, 2008.

Bacterias/ actinomicetas	s-triazina objetivo	Substratos adicionales	Estructura removida
<i>Acinetobacter junii</i>	Simazina	-	Cadena lateral
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Atrazina	Ametrina, cianazina, prometon, simazina	Anillo y Cadena lateral
<i>Bacillus cereus</i>	Prometrina	Simetrina	Cadena lateral
<i>Bacillus spp.</i>	Atrazina	-	Cadena lateral de etilo
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Deetilatrizona	deisopropilatrizona	cloro y cadena lateral
<i>Nocardia</i>	Atrazina	-	Cadena lateral
<i>Pseudomonas ADP</i>	Atrazina	Propazina, simazina	Mineralización
<i>Pseudomonas sp.</i> MHP41	Simazina	-	-
<i>Pseudomonas strain 26</i>	Prometrina	-	Metiltio y cadena lateral
<i>Pseudomonas strain A</i>	Atrazina	-	Cadena lateral
<i>Pseudomonas spp.</i> strains	Atrazina	-	Cadena lateral
<i>Pseudomonas spp.</i> Strain DMS 93-99 (YAYA6)	Atrazina	-	Mineralización
<i>Pseudomonas fluorescens strains</i>	Atrazina	-	Cadena lateral

LMG 10141 and 10140				
<i>Rhodococcus</i> TEI	Atrazina	Propazina, cianazina	simazina,	Cadena lateral
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Atrazina	-		Cadena lateral
<i>Rhodococcus</i> B-30	Atrazina	Propazina,	simazina	Cadena lateral
<i>Rhodococcus</i> TEI	Atrazina	-		Cadena lateral
<i>Rhodococcus corallinus</i> NRRLB-15444R	Deetilsimazina	Deetilatrizina		Grupos cloro y amina
<i>Rhodococcus corallinus</i> strain 11	Atrazina	Metabolitos de atrazina		Anillo y grupos aminos
<i>Rhodococcus</i> NI86/21	Atrazina	-		Cadena lateral
<i>Rhodococcus corallinus</i>	Atrazina	-		-
<i>Soil bacterium</i>	Atrazina	-		Cadena lateral
<i>Streptomyces</i> strain PS1/5	Atrazina	Cianazina, prometrina	metribuzina,	Cadena lateral
<i>Fungi</i>				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Simazina	-		Cadena lateral
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Atrazina	-		Cadena lateral
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Atrazina	Simazina, terbutilazina	propazina,	-

1.4.1. *Pseudomonas* sp. ADP, cepa modelo degradadora de simazina

La cepa *Pseudomonas* sp. ADP fue aislada originalmente de un sitio fuertemente contaminado con herbicidas s-triazinas (Wackett *et al.*, 2002). Esta bacteria tiene la capacidad de utilizar la simazina como única fuente de nitrógeno mediante una ruta catabólica de seis pasos (Figura 7 y Figura 8), siendo el organismo modelo para la mineralización completa de este herbicida (Stelting *et al.*, 2012). La cepa cuenta con un plásmido catabólico (pADP-1) que codifica todos los genes *atz* asociados a la metabolización de estos compuestos (Mandelbaum *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1998).

Por otra parte, estudios realizados por Clausen y colaboradores (2002) demostraron que *Pseudomonas* sp. ADP puede ser utilizada para la bioaumentación de suelos y aguas contaminadas tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

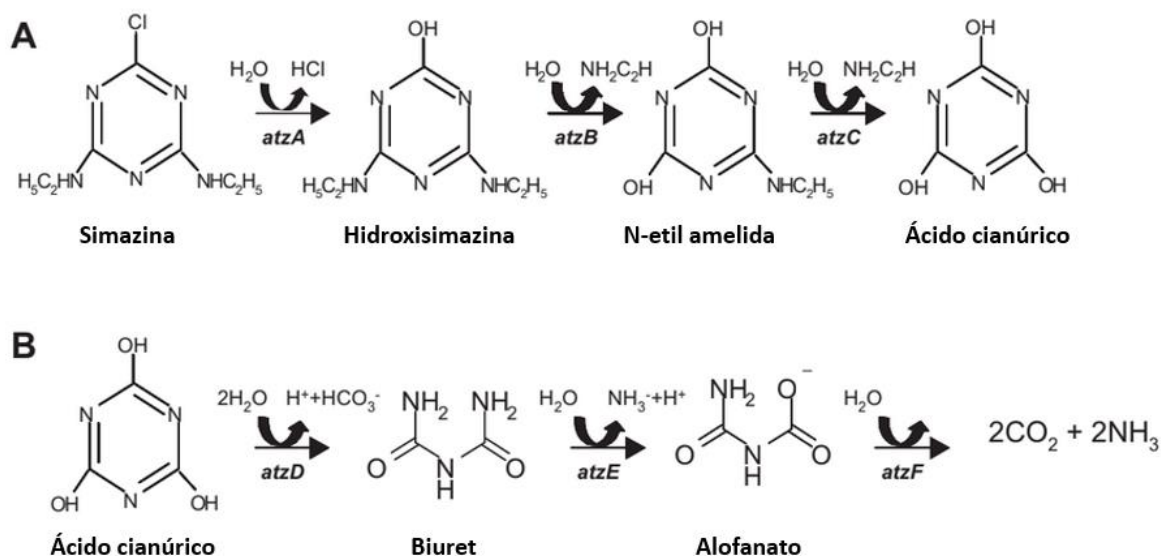


Figura 7. Ruta catabólica bacteriana de simazina. A) Ruta catabólica superior. B) Ruta catabólica inferior. En cada paso se indica el gen catabólico *atz* que codifica la enzima respectiva. Morgante *et al.*, 2012.

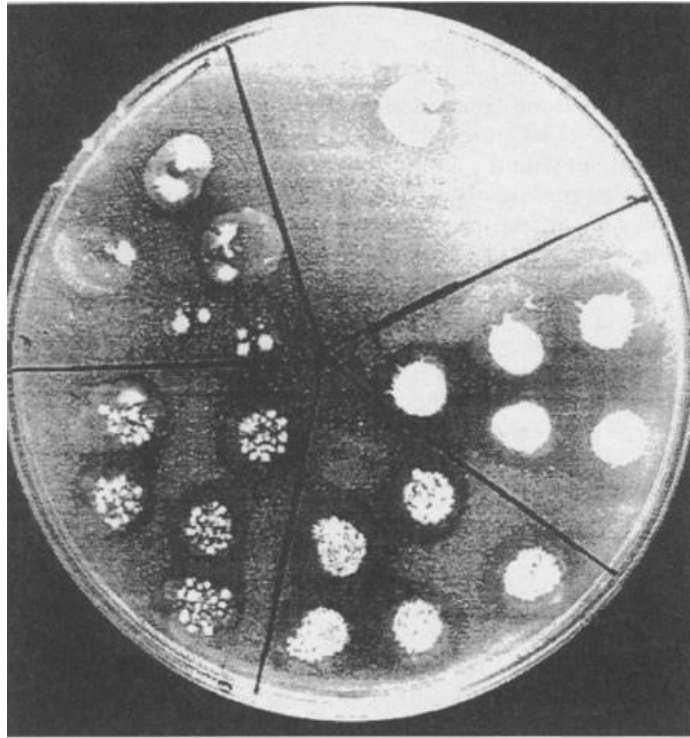


Figura 8. Degradación de atrazina por *Pseudomonas* sp. ADP. Sembrada en medio mínimo suplementado con 700 ppm de atrazina. El halo que rodea las colonias muestra degradación de atrazina. Mandelbaum *et al.*, 2008.

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

La bacteria degradadora de simazina *Pseudomonas* sp. ADP, aislada desde suelo, tiene la capacidad de degradar simazina a nivel foliar en hojas de una planta de interés.

2.2 Objetivo general

Caracterizar la biodegradación de simazina mediante *Pseudomonas* sp. ADP en hojas de una planta modelo.

2.3 Objetivos específicos

1. Estandarizar un método de extracción y cuantificación de simazina desde hojas de una planta modelo.
2. Evaluar la biodegradación de simazina por *Pseudomonas* sp. ADP en hojas de una planta modelo

3. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos químicos

Para el desarrollo de esta tesis se utilizó simazina comercial, Gesatop 90 WG con un 90% de pureza, que es importado y distribuido en Chile por Syngenta Agribusiness S.A. Se utilizó para la preparación de medios de cultivo y la contaminación controlada en hojas.

Las curvas de calibración para la detección y cuantificación de simazina mediante el equipo HPLC, se realizaron con un estándar de simazina Dr. Ehrenstorfer, con pureza de 98.95%.

3.2 Medios de cultivo

Los siguientes medios de cultivo fueron utilizados para el desarrollo de este trabajo:

Medio mínimo suplementado (MM) (Morgante, 2009): 100 ml de MM contiene 10 ml de tampón fosfato 10x; 2,5 ml de solución stock de succinato 1M y 200 µl de solución de microelementos 500x. Un litro de solución tampón fosfato 10x contiene: 70g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 28g de KH_2PO_4 y 5g de NaCl. 100 ml de solución de microelementos 500x contiene: 5g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,25g de $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 0,32g de ZnCl_2 ; 0,033g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,018g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 0,015g de $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,325g H_3BO_3 ; 0,5g EDTA; 7,3 ml de HCl 37%. La concentración de simazina en medios líquidos fue 0,5 mM y en medios sólidos (con agar 1,5% p/v) se adicionó a una concentración de 2,5 mM.

Medio caldo de Soja Trípica (Tryptic Soy Broth, TSB) 30 g L⁻¹ y medio agar de Soja Trípica (Tryptic Soy Agar, TSA) 40 g L⁻¹ según condiciones del fabricante BD Difco™ (Sparks, Maryland, USA). En algunos ensayos este medio fue suplementado con simazina 3,5 mM.

3.3 Cepa bacteriana degradadora

Se utilizó la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. ADP (Figura 9) en los distintos ensayos de biodegradación. La cepa fue cultivada en MM líquido durante 48 horas y almacenada en viales con glicerol 25% v/v a -20°C. Para mantener la presión selectiva sobre la cepa, se

cultiva en un medio con los nutrientes mínimos (MM), con succinato como fuente de carbono y simazina como única fuente de nitrógeno (Morgante, 2009).



Figura 9. Degradación de simazina por *Pseudomonas* sp. ADP. Sembrada en medio mínimo suplementado con 500 ppm de simazina. El halo que rodea a *Pseudomonas* sp. ADP en la parte superior muestra degradación de simazina. En la parte inferior se sembró una bacteria no degradadora de simazina. Fotografía: Lisette Hernández & Dr. Michael Seeger, marzo 2023).

3.4 Muestreo y conservación de hojas

Para el desarrollo de esta tesis se trabajó con hojas de palto. Como se mencionó en antecedentes, los cultivos de paltos son frecuentemente tratados con simazina ya que es un árbol resistente a este herbicida. Además, su elección fue por ser un árbol perenne.

3.4.1 Muestreo y manipulación de hojas

Las hojas utilizadas en los distintos ensayos a lo largo del trabajo experimental fueron recolectadas desde dos árboles ubicados en la comuna de Villa Alemana, región de

Valparaíso, Chile. Ambos árboles muestreados no presentan aplicación de productos químicos de ningún tipo.

Las hojas se seleccionaron de tamaños similares (Figura 10), se cortaron con tijeras desinfectadas con alcohol etílico 70% y se depositaron en bolsas plásticas desinfectadas previamente con radiación UV. Luego de ser recolectadas se almacenaron a 4° C.

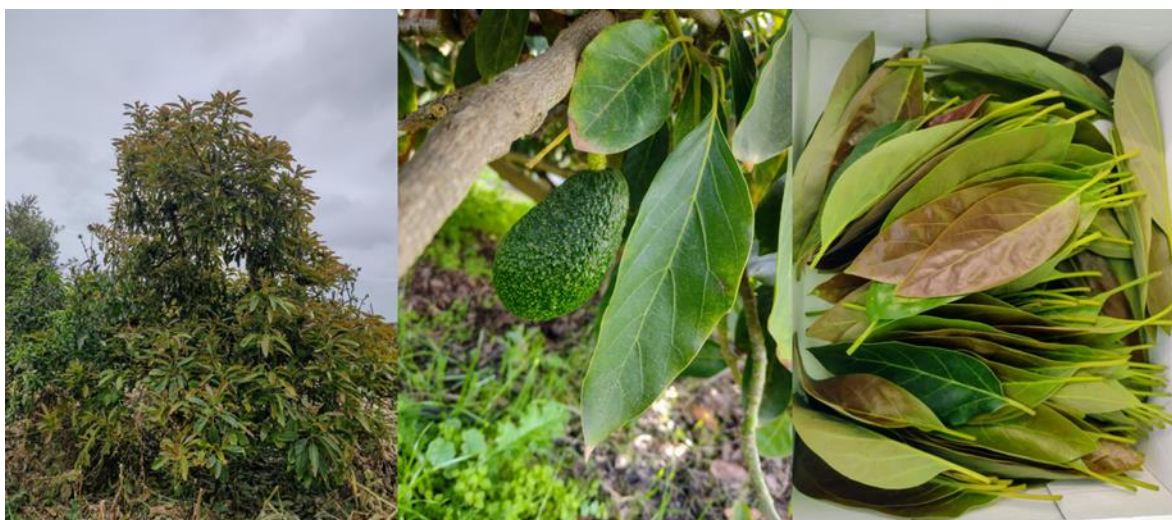


Figura 10. Muestreo de hojas de palto. Elaboración propia.

3.4.2 Conservación de hojas

Para determinar la conservación de las hojas de palto se evaluaron tres condiciones de almacenamiento de las hojas a temperatura ambiente por 30 días: (A) las hojas se conservaron dentro de placas Petri de 15 mm de diámetro y se sellaron herméticamente con parafilm, (B) las hojas se conservaron en placas Petri con adición de 1 ml de agua MiliQ y se sellaron con parafilm para crear una atmósfera húmeda y (C) las hojas se conservaron en tubos de ensayo con el tallo inmerso en agua y la parte superior de la hoja expuesta al aire. Se evaluaron 5 hojas por cada condición (Figura 11).

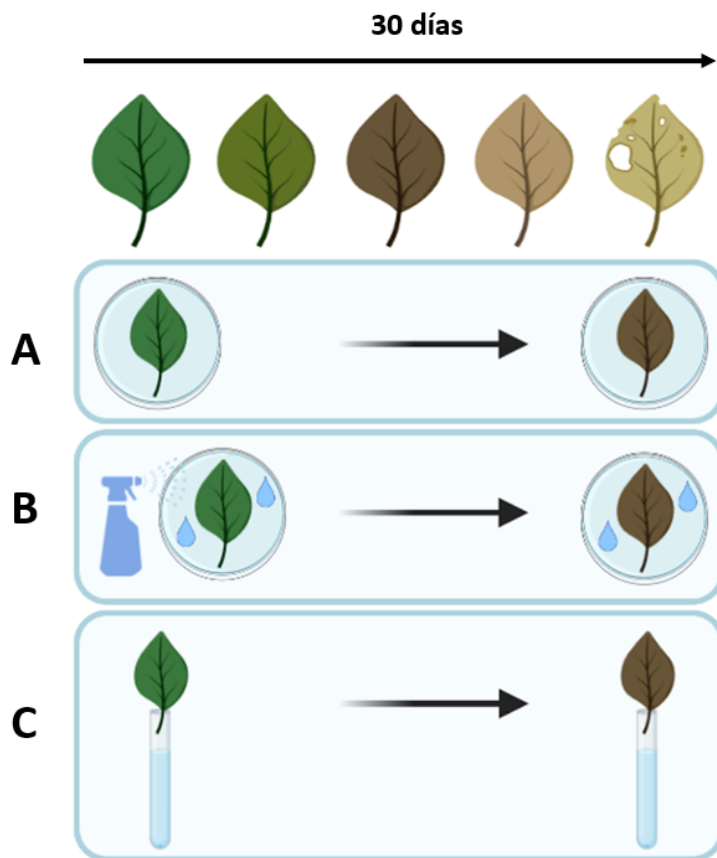


Figura 11. Diseño experimental de la determinación de conservación de hojas. (A) Hoja al interior de placa Petri sellada herméticamente. (B) Hoja con 1ml de agua Mili Q en placa Petri sellada herméticamente (atmósfera húmeda). (C) Hoja expuesta al aire con el tallo inmerso en agua.

3.5 Metodología analítica

3.5.1 Estandarización del método de cuantificación de simazina en HPLC

Para detectar y cuantificar la concentración de simazina en los distintos ensayos de biodegradación, se utiliza un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las características del equipo empleado se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Características técnicas de equipo de cromatografía utilizado.

Equipo de cromatografía		
Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)	Jasco	
Bomba	Jasco PU-2089S Plus Quaternary Gradient Pump	
Fase estacionaria	Columna	C18
	Tipo	Fase reversa (RP)
	Longitud	10 cm
	Diámetro de partícula	5,0 μm
	Diámetro interno	4,6 mm
Detector	UV visible, Jasco MD-2015 Plus	
Sistema de integración	Jasco LC-Net II/ADC	
	Software: ChromNav 2.0	

La estandarización del método analítico se inicia con el método base de Hernández y colaboradores (2008) modificando el solvente de extracción. Se probaron y compararon cualitativamente dos solventes puros: metanol y acetonitrilo (grado analítico), por ser capaces de disolver la simazina y ser afines con la columna cromatográfica utilizada (C18). Para la comparación cualitativa de los solventes, se disuelve 1 mg de simazina (98,95% pureza) en 10 ml de solvente grado analítico (metanol y acetonitrilo). Se filtra 1 ml de muestra utilizando membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) con tamaño de poro de 0,22 μm y se analiza en HPLC bajo el método analítico de Hernández y colaboradores (2008). Esto permite obtener lecturas cromatográficas de las muestras de simazina en cada uno de los solventes estudiados e identificar el pico correspondiente a simazina en cada caso, determinando su tiempo de retención (t_r) característico.

Una vez identificado el pico de simazina, se procede a ajustar la metodología cromatográfica al contexto de esta tesis. Se debe considerar la posible interferencia de los componentes endógenos (celulares) de las hojas de palto en las señales cromatográficas.

Para ello, en un tubo Falcon de 50 ml se disuelve 1 mg de simazina en 10 ml de solvente grado analítico y se sumerge una hoja de palto en la solución obtenida. El tubo sellado se deja en reposo a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este tiempo, el tubo se sonifica durante 30 minutos para facilitar la ruptura de las membranas celulares de la hoja de palto (lisis celular) y homogeneizar la muestra. Se filtra 1 ml de sobrenadante y se analiza en HPLC repetidas veces. Durante este proceso iterativo, se realizan ajustes en la metodología cromatográfica base, tales como modificaciones de la composición porcentual de las fases móviles y los parámetros de temperatura y flujo, según sea necesario, con el fin de evitar que las señales generadas por los componentes celulares de las hojas interfieran en la detección y posterior cuantificación de la simazina. Así, cada iteración implica modificaciones o ajustes basados en los resultados obtenidos en iteraciones anteriores, hasta conseguir un cromatograma en donde el pico de simazina no muestre interferencias.

Aquel solvente que presente mejores resultados es seleccionado como solvente de extracción y se utiliza para elaborar una curva de calibración utilizando la metodología cromatográfica ajustada.

Para construir la curva de calibración (Figura 12), se preparan soluciones estándar de simazina en concentraciones de 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 partes por millón (ppm) utilizando el solvente de extracción seleccionado. Cada una de las concentraciones estándar se realiza en triplicado técnico. Posteriormente, las soluciones se filtran utilizando membranas PTFE con tamaño de poro de 0,22 μm y se analizan en HPLC con el método cromatográfico ajustado. Con los datos obtenidos, se grafica el área de los picos cromatográficos (generalmente en el eje Y) en función de la concentración de las soluciones estándar correspondientes (generalmente en el eje X). Esto permite establecer una relación cuantitativa entre la concentración de simazina y la respuesta cromatográfica, y así obtener la curva de calibración. Con esto, se da inicio a los análisis cuantitativos necesarios para poder definir un método de extracción de simazina desde hoja.

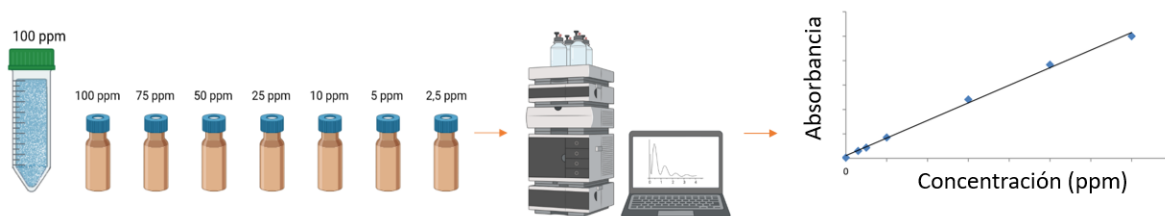


Figura 12. Metodología para la generación de la curva de calibración de simazina.
Elaboración propia.

3.5.2 Extracción de simazina desde hojas de palto

Se evaluaron tres tratamientos de las hojas (antes de añadir el solvente de extracción), con el objetivo de determinar bajo qué condición se obtiene mejores porcentajes de extracción de simazina (Figura 13). En cada tratamiento se contaminaron hojas de forma controlada con 1 mg de simazina y luego fueron tratadas. Tratamiento (A): se fragmentan las hojas utilizando un bisturí, las hojas permanecen a temperatura ambiente. Tratamiento (B): se deshidratan las hojas en una estufa a 60°C durante 24 horas, seguido de la molienda de las hojas secas utilizando una varilla de vidrio. Tratamiento (C): se congelan las hojas a -30°C durante 24 horas. Para todos los tratamientos la extracción se realiza disponiendo las hojas al interior de un tubo Falcon de 15 ml al cual se añaden 10 ml del solvente de extracción seleccionado. Los tubos se cierran y sellan con Parafilm para evitar la volatilización de solvente y permanecen en reposo a temperatura ambiente durante 5 días. Pasado este tiempo, los tubos se someten a sonicación durante 30 minutos. Posteriormente, desde cada tubo se extrae 1 ml de sobrenadante. La muestra es filtrada con membranas de PTFE de 0,22 μm y se transfiere a un vial ámbar de 1,5 ml para ser analizada en el equipo HPLC y determinar la concentración de simazina. Como control de extracción (D) se utilizó una solución de simazina (1 mg) en el solvente de extracción seleccionado, así, la concentración de simazina obtenida desde (D), representa el 100% de tasa de recuperación. Respecto a este valor se comparan las concentraciones obtenidas bajo los tratamientos (A), (B) y (C), y se expresa el resultado en porcentajes de extracción o recuperación de simazina desde las hojas.

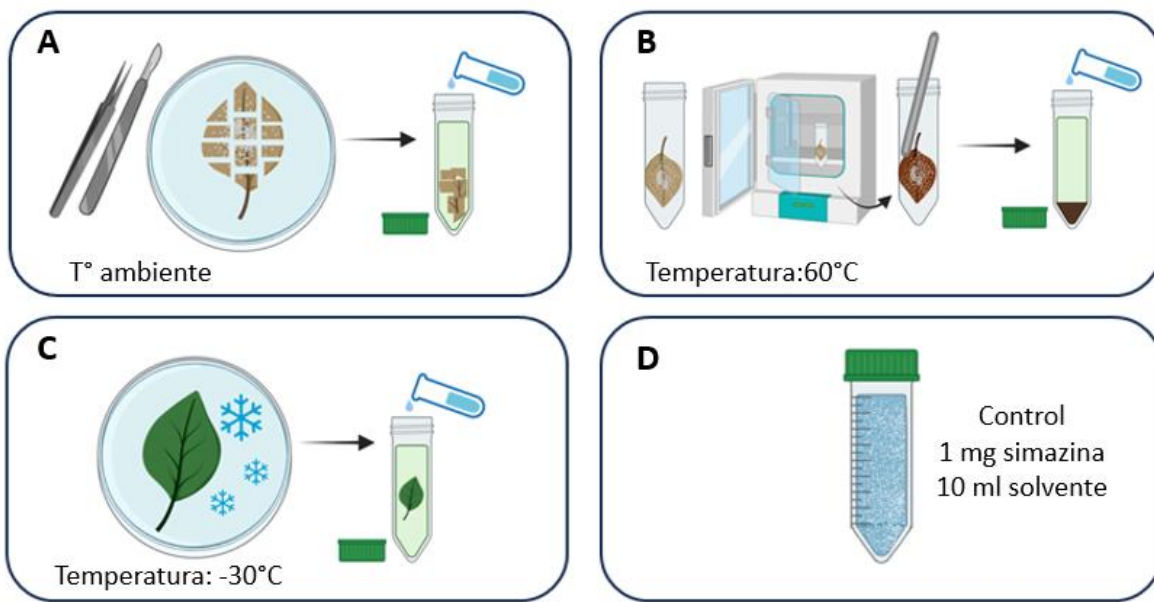


Figura 13. Diseño experimental para extracción de simazina desde hojas. Tratamientos de las hojas para extraer y cuantificar simazina. (A) Las hojas son cortadas en trozos pequeños con bisturí. (B) Las hojas se deshidratan a 60°C por 24 horas y luego se muelen. (C) Las hojas se congelan a -30°C por 24 horas. (D) Muestra control: 1 mg de simazina en 10 ml de solvente.

3.6 Biorremediación de simazina en hojas de palto

3.6.1 Contaminación controlada de hojas de palto

Las hojas de palto son contaminadas de forma controlada con simazina comercial Gesatop (90% de pureza). Esta simazina presenta un formato granulado con aditivos que la hacen soluble en agua. Se disuelve 1 g de simazina granulada en 180 ml de agua Milli Q. Desde la solución acuosa obtenida, se toman 200 µl y se agregan en forma de gotas sobre las hojas como se ilustra en la Figura 14. Después de transcurridas 24 horas, el agua evapora en su totalidad y la simazina queda adherida en la superficie de las hojas. Se estima que cada hoja es contaminada con 1 mg de simazina.

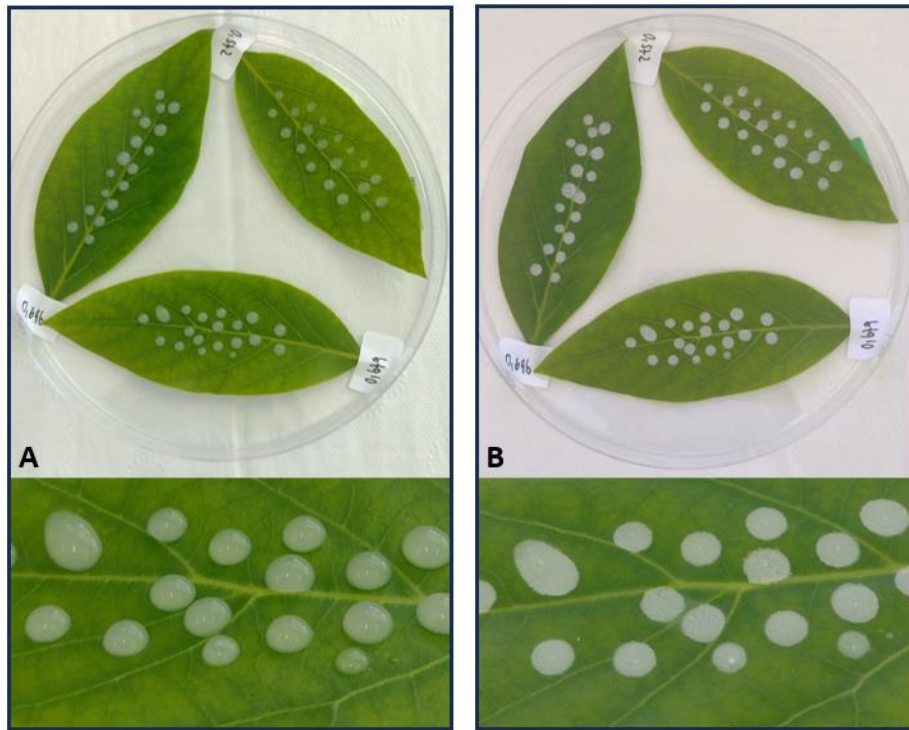


Figura 14. Aplicación de simazina sobre la superficie de las hojas. (A) Solución de simazina y agua aplicada sobre las hojas en forma de pequeñas gotas. (B) Simazina adherida sobre la superficie de las hojas una vez evapora el agua después de 24 horas.

3.6.2 Preparación inóculo

Para aplicar la bacteria degradadora sobre las hojas (previamente contaminadas de forma controlada con simazina) en los ensayos de biorremediación, se prepara un cultivo bacteriano líquido y este es aplicado sobre las hojas con un rociador. Para preparar el cultivo líquido, inicialmente se toman 10 μ l desde los gliceroles de conservación y se cultivan en placas de MM sólido con simazina 2,5 mM. Las placas se incuban durante 48 horas a 30°C. Luego, desde la placa se toman colonias bacterianas y se cultivan en MM líquido suplementado con simazina 0,5 mM durante 60 horas con agitación a 180 rpm a 30°C. Finalmente, este primer cultivo obtenido se centrifuga, se elimina el líquido sobrenadante y se agrega MM líquido fresco sin simazina, ajustando OD a 1,5 (600 nm). Por cada placa Petri (con tres hojas cada una) se estima que se rocía 1 ml de medio de cultivo aproximadamente como se observa en la Figura 15.

En el experimento de biorremediación se evalúa una condición en la cual se aplica la cepa bacteriana inactiva. Para inactivar la bacteria, el medio de cultivo con OD ya ajustada se hierve durante 30 minutos con agitación magnética. Luego se deja enfriar a temperatura ambiente y es aplicada con rociador.

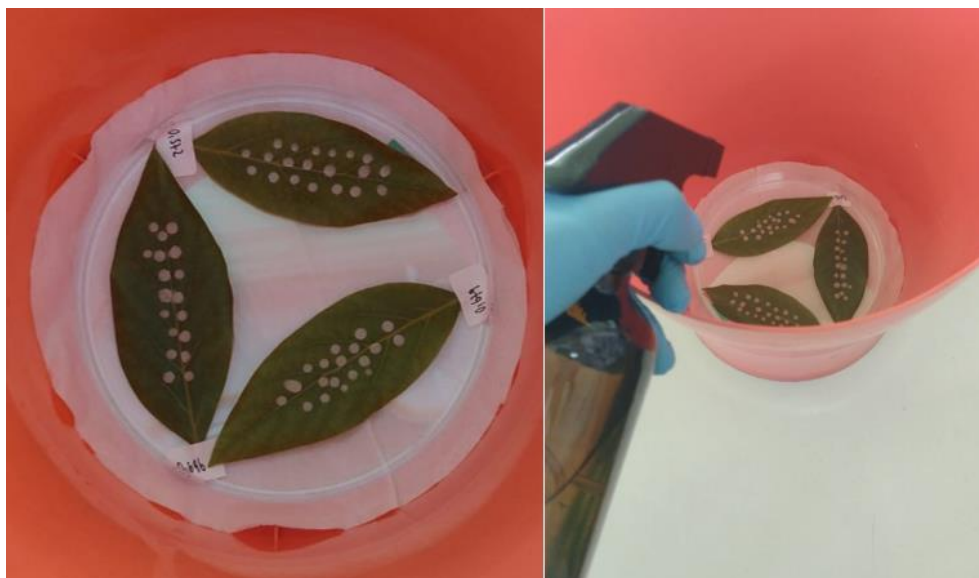


Figura 15. Bioaumentación con *Pseudomonas* sp. ADP sobre hojas contaminadas con simazina. Metodología de aspersión para bioaumentación.

3.6.3 Diseño experimental de biorremediación de simazina en hojas de palto

Para evaluar el proceso de biorremediación de simazina a nivel foliar mediante bioaumentación de la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. ADP, se establecen cuatro condiciones de monitoreo:

- **Control 1 (C1):** En esta condición las hojas no reciben ningún tipo de tratamiento, es decir, se estudian las hojas en las mismas condiciones bajo las cuales son obtenidas del árbol. Los análisis cromatográficos de estas hojas permiten verificar que estas no presentan contaminación previa de simazina.
- **Control 2 (C2):** Corresponden a hojas contaminadas de forma controlada con simazina.

- **Control 3 (C3):** Corresponden a hojas contaminadas de forma controlada con simazina e inoculadas con bacterias *Pseudomonas* sp. ADP inactivas.
- **Bioaumentación (C4):** Corresponden a hojas contaminadas de forma controlada con simazina e inoculadas con bacterias *Pseudomonas* sp. ADP activas.

Las hojas utilizadas para este ensayo son lavadas con agua Milli Q para retirar las partículas de polvo, luego se corta el tallo de las hojas hasta aproximadamente 5 mm y se mide su masa en una balanza analítica. Posteriormente, las hojas en grupos de tres se acomodan en placas Petri de 15 mm de diámetro etiquetadas con su masa en gramos. Se contaminan con simazina aquellas hojas seleccionadas para ser evaluadas bajo las condiciones C2, C3 y C4. Las placas se dejan destapadas durante 24 horas para permitir que el agua evapore y la simazina quede adherida sobre la superficie de las hojas. Finalmente, las hojas de las condiciones C3 y C4 son inoculadas con *Pseudomonas* sp. ADP inactivas y activas respectivamente y las placas son selladas con Parafilm y almacenadas a temperatura ambiente.

El experimento se realizó en invierno de 2023 y tuvo una duración de 30 días. Durante este ensayo se monitorea la concentración de simazina de las hojas en las distintas condiciones. Tanto el proceso de extracción de simazina desde las hojas como la extracción de bacterias para su cuantificación implica la destrucción de la hoja, por lo que se trabaja con muestras sacrificiales para cada punto de monitoreo como se ilustra en la Figura 16. Se trabaja en triplicado técnico. Un set de hojas es destinado a cuantificación de simazina y otro set de hojas es destinado a recuento de bacterias.

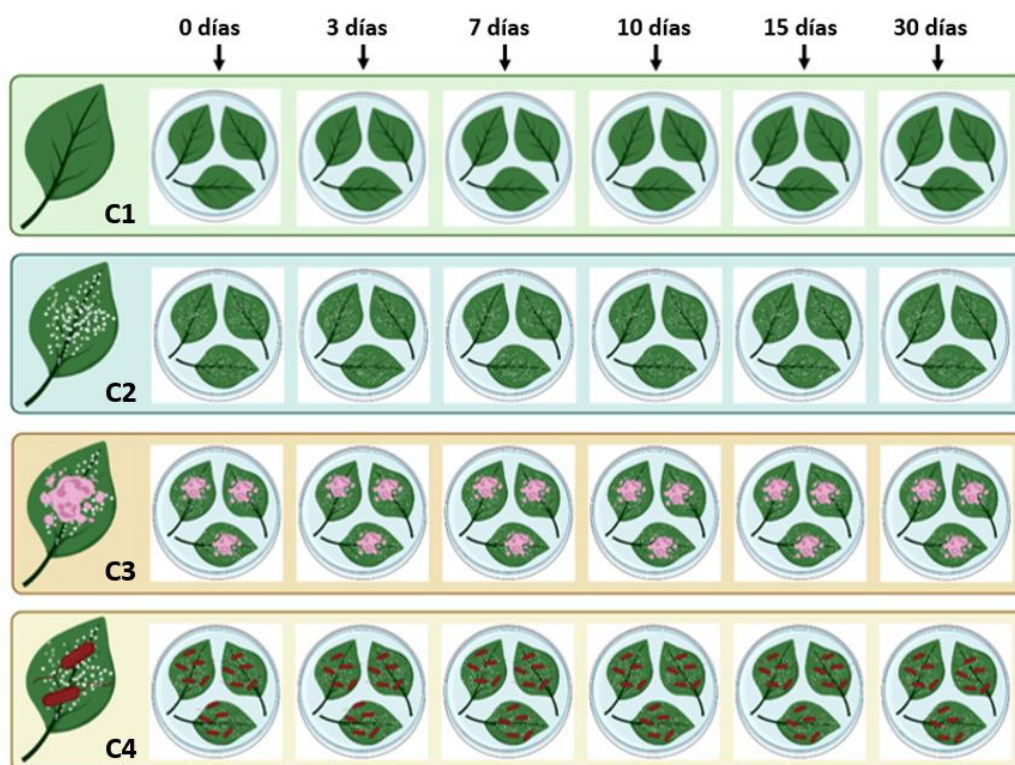


Figura 16. Diseño experimental: Biorremediación del herbicida simazina a nivel foliar mediante bioaumentación con la cepa *Pseudomonas* sp. ADP. (C1) Control 1: hoja sin tratamiento. (C2) Control 2: hoja con simazina. (C3) Control 3: hoja con simazina inoculada con cepa bacteriana inactiva. (C4) Bioaumentación: hoja con simazina inoculada con cepa bacteriana activa. Elaboración propia.

3.6.4 Cuantificación de simazina y seguimiento de la cepa degradadora

La extracción de simazina se realiza de acuerdo al punto 3.5.2 y la cuantificación de simazina se realiza utilizando el método ajustado en el punto 3.5.1.

Para monitorear el crecimiento bacteriano en las hojas durante el proceso de biorremediación, se emplea el método de recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Por cada condición evaluada, se toman 3 hojas y se dejan inmersas en 45 ml de solución NaCl 0,85% en tubos Falcon de 50 ml. Los tubos se agitan por 30 minutos en un equipo Heidolph Multi Reax Vibrating Test Tube Shaker a una velocidad 7,0. Posteriormente se extrae 1 ml del sobrenadante y se realizan seis diluciones seriadas a una proporción de 1:10 (100 µl de muestra en 900 µl de NaCl 0,85%). Se siembran microgotas de 10 µl en triplicado por cada dilución en tres tipos de medios diferentes; MM, TSA y TSA

suplementado con simazina 3,5 mM. Finalmente, las placas se incuban en una estufa a 30°C durante 24 horas. Se realizó el recuento en las placas y se calculó las UFC mL⁻¹ (Madigan *et al.*, 2003), como se muestra en la ecuación 1, donde $\bar{X}$ corresponde al promedio de los recuentos en placas.

$$\frac{UFC}{mL} = \bar{X} \cdot \textit{Factor dilución} \cdot \textit{Factor inóculo} \quad (\text{Ecuación 1})$$

El valor calculado de UFC (UFC en tubo Falcon desde el cual se toma la muestra de sobrenadante) se divide por la masa total de las tres hojas para obtener un valor final expresado en unidades de UFC g⁻¹ hoja.

4. Resultados

4.1 Conservación de hojas

La Figura 17 muestra los resultados obtenidos para el ensayo de almacenamiento de hojas de palto bajo distintas condiciones. Las muestras sometidas a la condición A (hojas en placa Petri sellada herméticamente) exhibieron una conservación óptima durante el periodo de 30 días, manteniendo su tonalidad verde característica y conservando su flexibilidad, lo que permitió su manipulación sin quebrarse. Las hojas almacenadas bajo la condición B (atmósfera húmeda) también conservaron su pigmentación y flexibilidad, observándose la aparición de hongos tal como se evidencia en la imagen. En contraste, las hojas sujetas a la condición C (tallo inmerso en agua y hoja expuesta al aire) experimentaron una rápida pérdida de pigmentación y humedad, volviéndose quebradizas en tan solo 4 días, lo que dificultaba significativamente su manipulación. Por lo tanto, se selecciona la condición A para continuar el desarrollo de esta tesis.

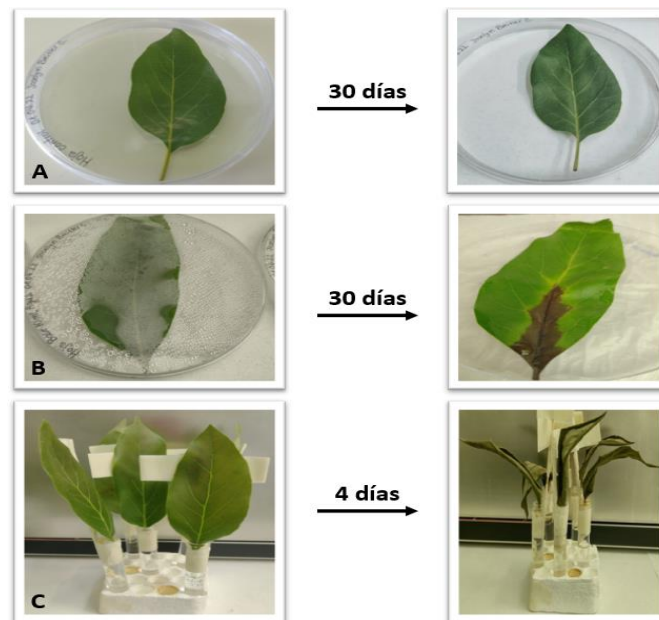


Figura 17. Conservación de hojas. Evolución de hojas de palto bajo distintas condiciones de almacenamiento. (A) Hoja en placa Petri sellada herméticamente. (B) Hoja en placa Petri con atmósfera húmeda. (C) Hoja expuesta al aire con tallo inmerso en agua.

4.2 Estandarización del método de cuantificación de simazina en HPLC

Tras analizar muestras de simazina en metanol y acetonitrilo bajo la metodología analítica de Hernández y colaboradores (2008), se observa con ambos solventes un mismo tiempo de retención (6,0 minutos) y que la forma e intensidad de la señal cromatográfica es bastante similar. Al agregar a las muestras los componentes endógenos (celulares) de las hojas se observó una señal cromatográfica con un tiempo de retención de 3,5 minutos que interfería las señales de simazina. Considerando la hidrofobicidad de la simazina, se aumentó el porcentaje de composición de la fase móvil de agua acidulada para disminuir la afinidad de la simazina con la fase móvil y así aumentar el tiempo de retención de la simazina. En la Tabla 7 se presenta la metodología analítica inicialmente utilizada como base y los resultados de la metodología ajustada para la detección de simazina extraída desde hojas de palto. Como se puede observar en la Figura 18, el ajuste metodológico desplazó los picos de simazina hasta un tiempo de retención cercano a los 6,8 minutos permitiendo la separación de las señales asociadas a los componentes celulares de las hojas de palto.

Tabla 7. Método analítico ajustado. Ajuste de la metodología analítica en HPLC para la detección de simazina en muestras extraídas desde hojas de palto. Elaboración propia.

Método analítico utilizado como base	Método analítico ajustado para detectar simazina en muestras de hojas de palto
Composición fase móvil: ▪ 67% (v/v) Acetonitrile ▪ 33% (v/v) Milli-Q H₂O + H₃PO₄ (1 L: 985 ml miliQ H₂O + 15 ml H₃PO₄ pH 2.0)	Composición fase móvil: ▪ 30% (v/v) Acetonitrile ▪ 70% (v/v) Milli-Q H₂O + H₃PO₄ (1 L: 985 ml miliQ H₂O + 15 ml H₃PO₄ pH 2.0)
Columna: RP-C18/ 5 μ m	Columna: RP-C18/ 5 μ m
Flujo: 1 ml/min	Flujo: 0,7 ml/min
Volumen de inyección: 10 μ L	Volumen de inyección: 10 μ L
Detección UV: 230 nm	Detección UV: 230 nm
Solvente de extracción: Isooctano	Solvente de extracción: Metanol
Temperatura: Ambiente	Temperatura: 30°C

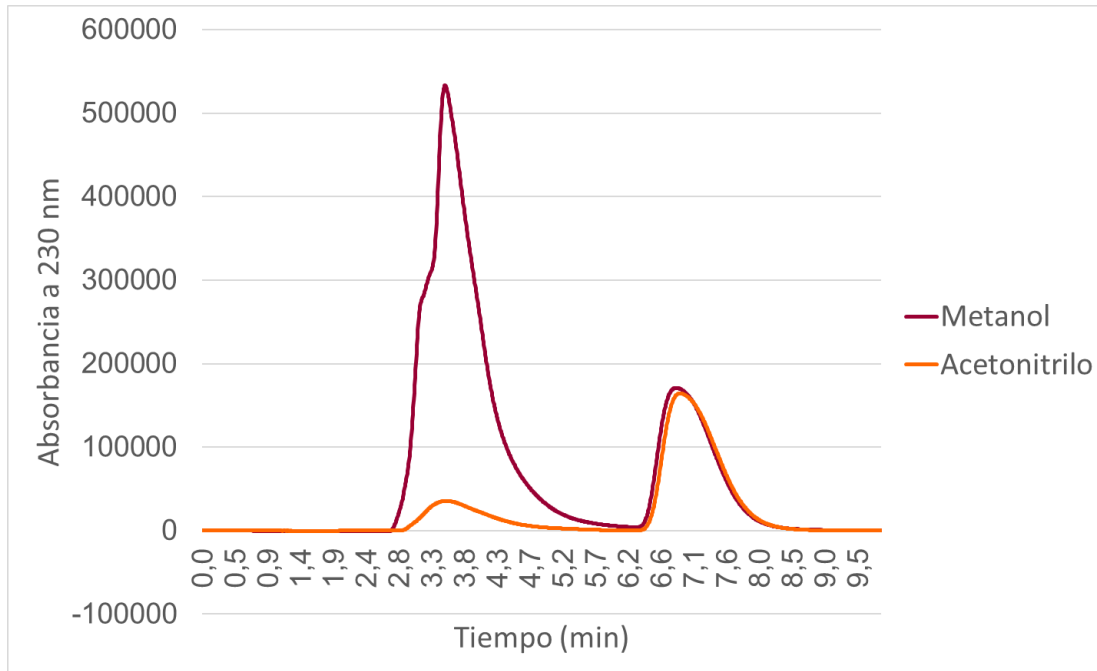


Figura 18. Perfil cromatográfico de extracción de simazina desde hojas de palto en metanol y acetonitrilo.

Adicionalmente, se observa que, aunque la señal de los picos de simazina es similar independientemente del solvente utilizado (metanol o acetonitrilo), existe una diferencia notable en la intensidad de la señal asociada a los componentes celulares de las hojas. Las muestras en las que las hojas de sonicarón en metanol presentan una señal cromatográfica cuya altura supera más del doble la señal de simazina. En contraste, las muestras en que las hojas fueron sonicadas en acetonitrilo exhibieron señales asociadas a los componentes celulares de las hojas significativamente más bajas, con una altura que no alcanza una cuarta parte de la altura de los picos de simazina. Por lo que se sugiere que el metanol permite un mayor grado de lisis celular. Estos resultados analíticos se correlacionan con las observaciones visuales presentadas en la Figura 19, donde se aprecia que las muestras filtradas en metanol exhiben una coloración verde más intensa en comparación con las muestras tratadas con acetonitrilo.

Considerando que la simazina es un herbicida capaz de ingresar en las células vegetales, se selecciona el metanol como solvente de extracción ya que facilita la ruptura de las membranas celulares. Se espera que esta característica permita mayores tasas de recuperación de simazina en los posteriores ensayos de extracción.



Figura 19. Muestras de simazina y hojas de palto en diferentes solventes. Las primeras 6 muestras que se observan a la izquierda con una coloración verde más intensa son obtenidas utilizando metanol como solvente y las siguientes 6 muestras de la derecha son obtenidas utilizando acetonitrilo.

Con respecto a la curva de calibración, los resultados de la regresión muestran una ecuación lineal que modela la relación entre las áreas de los picos de simazina y las concentraciones correspondientes (Figura 20). La ecuación de la recta obtenida es:

$$A = 71.743C - 35.099$$

Donde A es el área de los picos de simazina y C la concentración respectiva de los estándares analizados (Figura 21).

Este modelo lineal describe una fuerte relación entre la concentración de simazina y el área bajo la curva en el rango de concentraciones de 2,5 a 100 ppm. Esto se sustenta

en un coeficiente de correlación r de 0,9985 y un coeficiente de determinación R^2 de 0,9971, indicando que el 99,71% de la variabilidad en las áreas bajo las curvas cromatográficas se pueden atribuir a la variabilidad en las concentraciones de los estándares analizados.

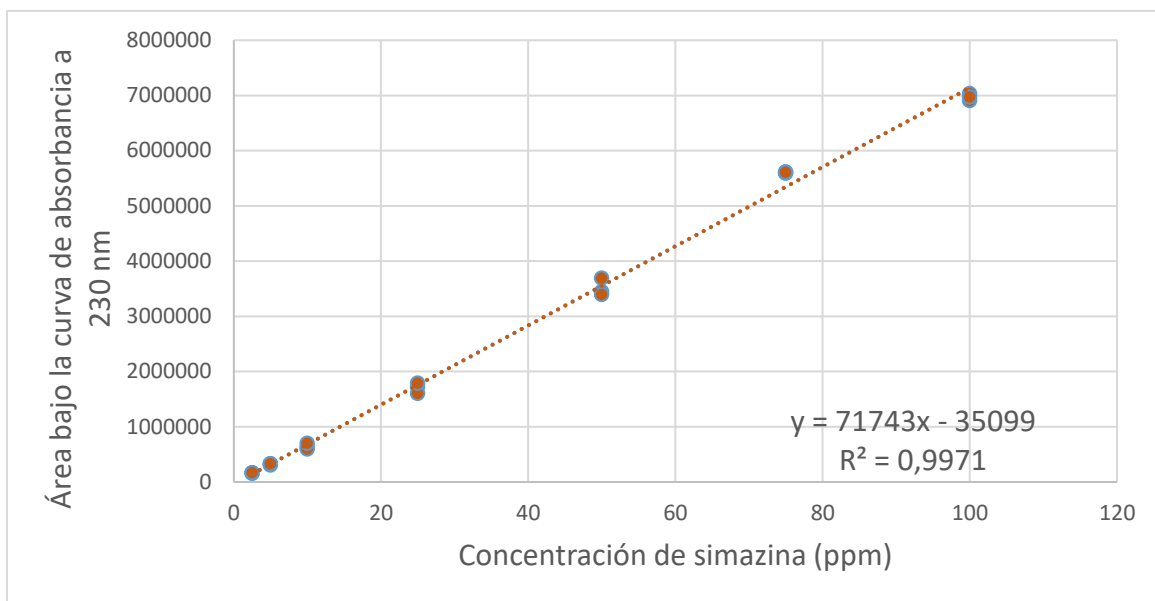


Figura 20. Regresión lineal de la curva de calibración.

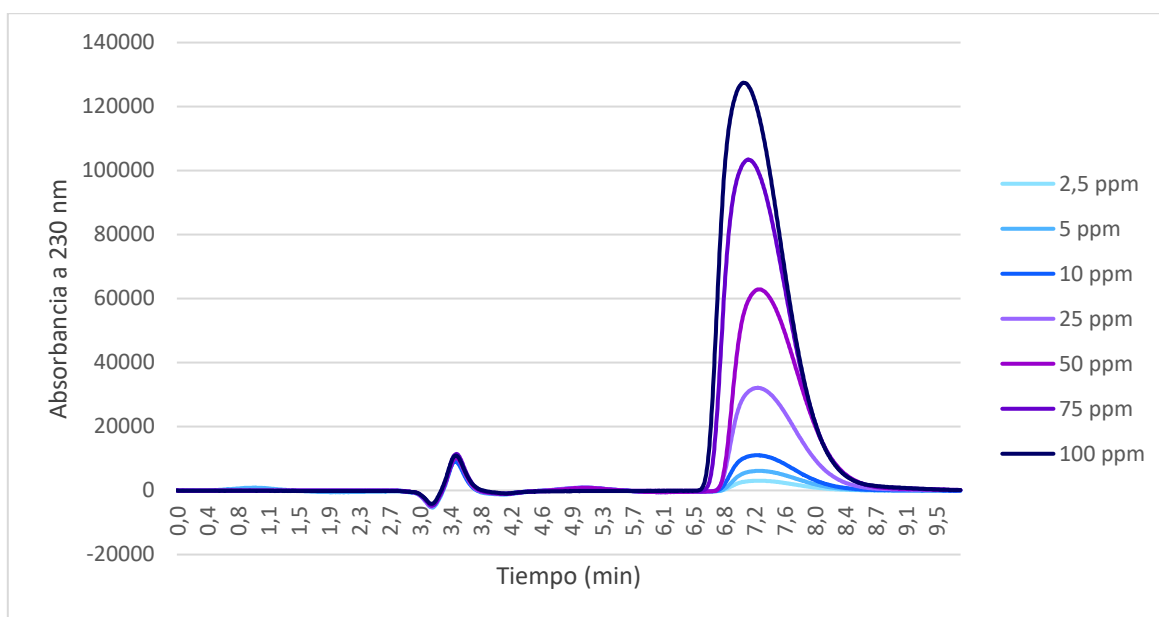


Figura 21. Perfil cromatográfico de la curva de calibración.

4.3 Extracción de simazina desde hojas de palto

La Figura 22 muestra el porcentaje de la tasa de recuperación de simazina en relación a los tres tratamientos aplicados a las hojas. Los gráficos de barra muestran la media de tres muestras analizadas por cada pretratamiento y sus respectivas barras de desviación estándar. Los resultados muestran que el tratamiento en que las hojas permanecen a temperatura ambiente y son cortadas en trozos más pequeños antes de añadir el solvente de extracción (metanol) proporciona los mayores porcentajes de extracción de simazina. Se observó una tasa de recuperación que oscila entre 85 y 99% respecto a la solución control. El segundo mejor resultado es obtenido por el tratamiento en que las hojas son congeladas a -30°C , con tasas de recuperación entre 79 y 87%. En contraste, el tratamiento que implica la deshidratación de las hojas a 60°C presentó las tasas de recuperación de simazina más bajas entre un 71 y 82%.

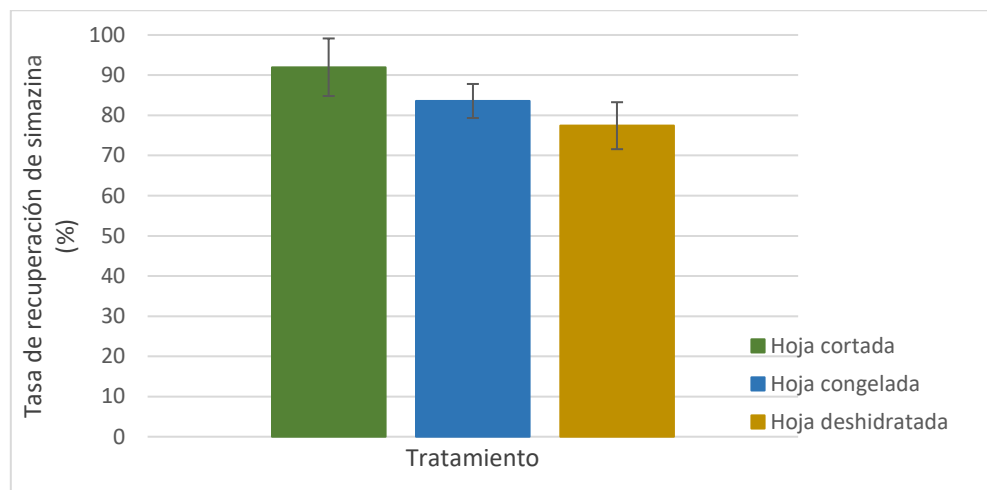


Figura 22. Tasa de recuperación de simazina según tratamiento de las hojas. Los resultados corresponden a la media de tres réplicas técnicas por cada pre-tratamiento evaluado y sus respectivas desviaciones estándar. La extracción de simazina desde las hojas se realiza utilizando metanol como solvente.

Adicionalmente, los perfiles cromatográficos obtenidos permiten visualizar que el tratamiento en que las hojas permanecen a temperatura ambiente y son cortadas, generan muestras de extracción con una concentración de componentes celulares muy superiores a los obtenidos bajo las otras condiciones de extracción (Figura 23).

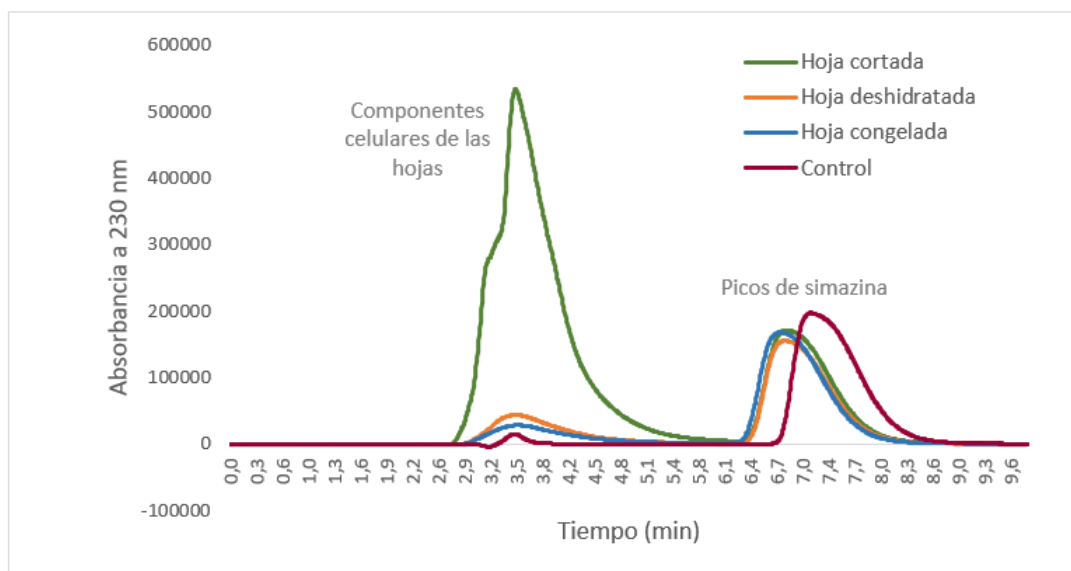


Figura 23. Perfiles cromatográficos obtenidos desde las muestras de extracción de simazina desde hojas de palto bajo diferentes pre-tratamientos de las hojas. Las señales cromatográficas correspondientes a los componentes celulares de las hojas se indican al lado izquierdo de la gráfica con un tiempo de retención (tr) aproximado de 3,5 minutos. Los picos de simazina aparecen a la derecha con un tiempo de retención cercano a los 6,9 minutos.

Por lo tanto, se seleccionó el tratamiento A para continuar con el desarrollo de esta tesis.

4.4 Biorremediación de simazina en hojas de palto

En la Figura 24 se presenta la dinámica de degradación del herbicida simazina en respuesta a la actividad bacteriana en la matriz foliar. El gráfico muestra el promedio de las concentraciones de simazina en unidades de partes por millón (ppm), cuantificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), obtenidas de tres réplicas técnicas (tres hojas) junto a sus respectivas desviaciones estándar.

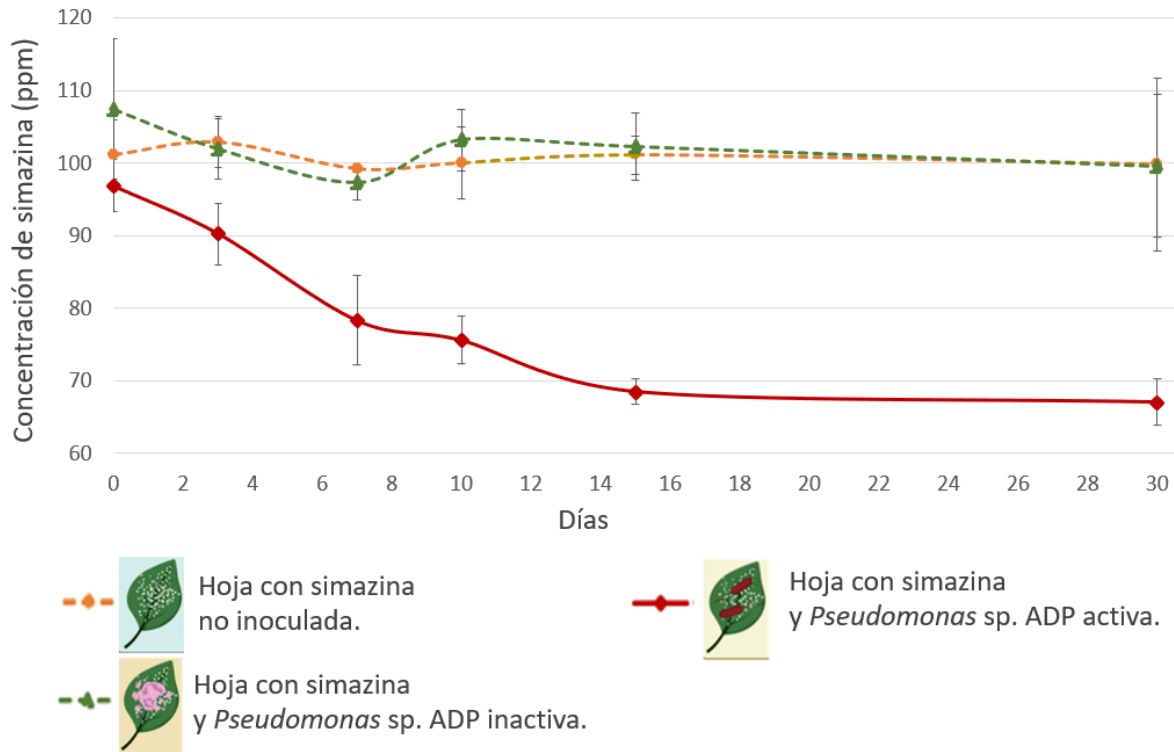


Figura 24. Biorremediación de simazina con *Pseudomonas* sp. ADP en hojas de palto. Cuantificación de simazina. Líneas segmentadas: concentración de simazina en aquellas condiciones donde no hubo bioaumentación (controles negativos). Línea sólida: concentración de simazina en la condición sujeta a bioaumentación con la cepa *Pseudomonas* sp. ADP.

En líneas segmentadas se grafica la concentración de simazina de aquellas condiciones control en las cuales no hubo bioaumentación con *Pseudomonas* sp. ADP activa. Se puede observar que, en estas condiciones de control, la concentración de simazina en el tiempo presenta una tendencia constante. Estos resultados permiten concluir que, en un periodo de 30 días y bajo las condiciones del diseño experimental, no es posible evidenciar atenuación natural de la simazina en la matriz foliar.

Por otra parte, en color rojo y línea sólida, se grafica la dinámica de degradación de simazina en la condición donde se realizó bioaumentación con *Pseudomonas* sp. ADP. Se observa que la curva de degradación presenta una pendiente negativa constante a lo largo de los 30 días. La mayor tasa de degradación ocurre durante los primeros siete días, luego de los cuales, se observa una disminución gradual pero constante en la tasa de degradación. La concentración inicial de simazina en esta condición, en promedio, es de 97 ppm. En el

día 30, el promedio de las concentraciones finales es de 67 ppm, lo que se traduce en un 31% de disminución en la concentración de simazina. En primavera de 2023 se realizó un segundo experimento (réplica biológica) y se obtuvo un 34% de disminución en la concentración de simazina en 30 días, existiendo el mismo comportamiento gráfico en cada una de las condiciones evaluadas (Anexo I).

Estos resultados proporcionan una tendencia y representación gráfica clara de cómo la presencia y actividad de la cepa bacteriana influye en la disminución de la concentración del herbicida en el tejido foliar. Lo anterior respalda la eficacia y viabilidad de implementar técnicas de bioaumentación en matrices foliares como un enfoque innovador dentro de las tecnologías de biorremediación.

En paralelo al monitoreo de la concentración de simazina a lo largo del tiempo, se realizaron cinco monitoreos para cuantificar la cantidad de bacterias presentes en las hojas, a modo de contrastar y correlacionar ambos resultados. La Figura 25 muestra la curva de crecimiento bacteriano obtenida mediante la extracción de bacterias desde la matriz foliar y su posterior cuantificación mediante el método de recuento de UFC. Los resultados se presentan como UFC por gramo de hoja ($\text{UFC}_0 \text{ g}^{-1} \text{ hoja}$) y corresponden a la cuantificación obtenida luego de 24 horas de incubación a 30°C en placas de MM. Los datos graficados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y sus respectivas desviaciones estándar.

Se puede apreciar un claro crecimiento bacteriano en la condición con bioaumentación, existiendo una diferencia neta promedio, entre el primer y último monitoreo, de $3,1 \cdot 10^9 \text{ UFC g}^{-1} \text{ hoja}$. Además, se puede observar una caída en la tasa de crecimiento entre los días 10 y 15, seguida de una tasa de crecimiento positiva y sostenida hasta el día 30.

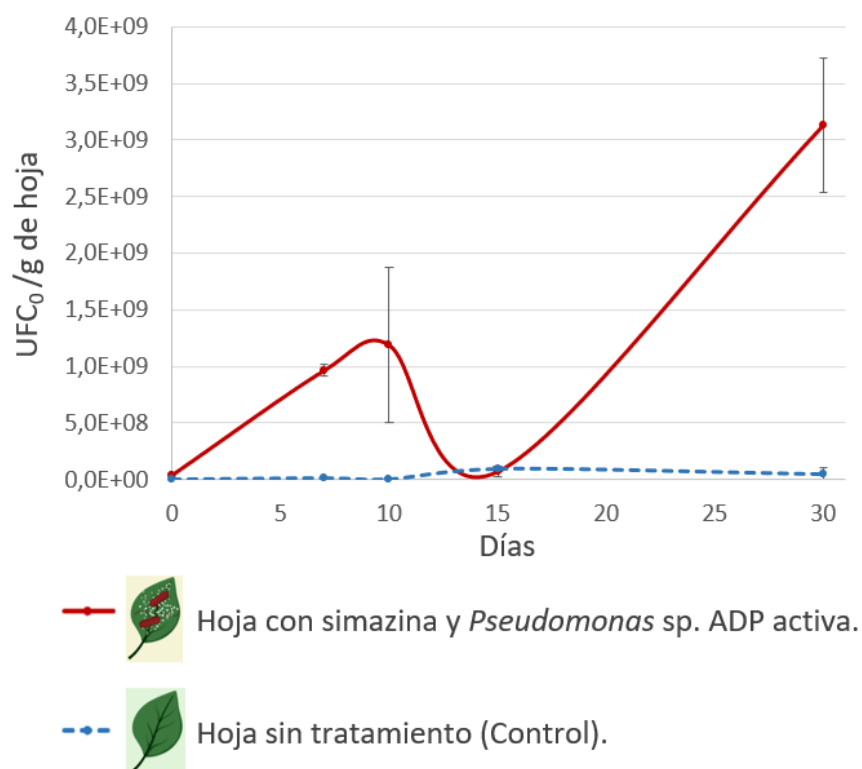


Figura 25. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas* sp. ADP durante biorremediación de simazina en hojas de palto. Línea roja: UFC por gramo de hoja en la condición bioaumentada con *Pseudomonas* sp. ADP. Línea azul fragmentada: UFC por gramo de hoja en la condición control, hojas sin tratamiento.

Analizando los resultados obtenidos desde las hojas control, se puede observar que la cantidad de bacterias extraídas por gramo de hoja, en comparación a la condición con bioaumentación, es menor en dos órdenes de magnitud y se mantiene constante a lo largo del experimento. Cabe señalar que las bacterias cuantificadas en esta condición control corresponden a bacterias autóctonas de las hojas de palto capaces de crecer en MM, donde se dispone de succinato como fuente de carbono y simazina como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, considerando que no se evidenció degradación de simazina en las condiciones controles, se puede atribuir este crecimiento basal a otras fuentes de nitrógeno como, por ejemplo, las células y compuestos vegetales de las hojas de palto que, al igual que las bacterias, quedan suspendidos en el sobrenadante de extracción (NaCl 0,85%).

5. Discusión

En el desarrollo de esta tesis se ajustó un método analítico de extracción y cuantificación de simazina mediante HPLC que fue validado en el experimento de biorremediación de simazina en hojas a través de dos replicas biológicas y tres réplicas técnicas cada uno. Se observó una alta reproducibilidad con respecto a la extracción y cuantificación de simazina. En los dos ensayos experimentales se obtuvieron 31% y 34% de degradación de simazina. Estos resultados indican una alta reproducibilidad experimental, confirmando la fiabilidad y robustez del método utilizado. Por otro lado, el método base que se utilizó en esta tesis, fue descrito por Hernández *et al.* (2008), y utilizaba como solvente isooctano para la extracción de simazina desde suelo, una matriz compleja. Para el desarrollo de esta tesis, se estudiaron dos solventes de menor costo y fácil manipulación, considerando que la matriz de extracción esta vez era una hoja. El solvente seleccionado fue metanol, que también es ampliamente utilizado en química analítica y tiene alta afinidad con la columna cromatográfica utilizada (RP C18) (Harris, 2003).

El diseño experimental desarrollado en este trabajo representa un enfoque innovador en este campo, al presentar la superficie de las hojas como una nueva matriz de biorremediación. En los experimentos, cada hoja fue contaminada de forma controlada con 1 mg de simazina. Considerando que, en promedio, cada hoja tiene una masa de 2 gramos, se puede expresar la aplicación de simazina como 0,5 mg de simazina por gramo de hoja, lo cual representa entre 80 y 160 veces la concentración utilizada en campos agrícolas por gramo de suelo, considerando que los herbicidas como simazina y atrazina suelen aplicarse en los campos de cultivo en concentraciones que oscilan entre 0,003 y 0,006 mg por gramo de suelo (Baranowska *et al.*, 2008). En los experimentos de bioaumentación, se logró una remoción de 0,15 mg simazina g⁻¹ hoja en un mes. Es decir, por cada gramo de hoja se logró remover en 30 días, entre 25 y 50 veces la cantidad de simazina aplicada usualmente en un gramo de suelo agrícola.

De manera análoga, se pueden contrastar los resultados obtenidos en los ensayos de biorremediación de simazina en suelo desarrollado por Morgante *et al.* (2012), en los

cuales se realizó bioaumentación con la cepa *Pseudomonas* sp. MHP41 que, al igual que *Pseudomonas* sp. ADP, cuenta con los seis genes *atz* asociados a la metabolización de simazina. En sus experimentos, contaminaron el suelo con simazina en una concentración de 0,014 mg simazina g⁻¹ suelo, obteniendo una tasa de biodegradación del 87% en 23 días. Es decir, en 23 días se logró remover aproximadamente 0,012 mg simazina g⁻¹ suelo, equivalente a entre 2 a 4 veces la cantidad de simazina aplicada usualmente en un gramo de suelo agrícola.

El objetivo central del análisis presentado es visibilizar que los resultados de este estudio en particular, de biorremediación a nivel foliar, adquieren mayor relevancia cuando se expresan en términos de cantidad absoluta de simazina removida en lugar de porcentaje de remoción.

El diseño experimental de biorremediación a nivel foliar se realizó utilizando una concentración inicial de simazina 35 veces mayor a la utilizada en el experimento de biorremediación de simazina en suelo (en términos de miligramos de simazina por gramo de matriz). A pesar de esta diferencia, los crecimientos bacterianos observados en las condiciones bioaumentadas son comparables en órdenes de magnitud. En los ensayos de biorremediación foliar, el crecimiento bacteriano osciló entre las 10⁷ y 10⁹ UFC g⁻¹ hoja, que representa un crecimiento de dos órdenes de magnitud. Morgante *et al.* (2012) reportó crecimientos bacterianos desde 10⁵ hasta 10⁹ UFC g⁻¹ suelo, lo que representa un crecimiento de 4 órdenes de magnitud.

La disminución de dos órdenes de magnitud en el crecimiento bacteriano entre los días 10 y 15, se correlacionó con una menor tasa de biodegradación de simazina durante ese periodo. Este hallazgo sugiere que, para lograr una mayor tasa de biodegradación bajo las condiciones estudiadas, la reinoculación de la cepa bacteriana en el día 10 podría ser una alternativa interesante.

Pseudomonas sp. ADP, utilizada en esta tesis, ha demostrado una notable plasticidad adaptativa hacia una nueva matriz de biorremediación. Esto es significativo considerando el diseño experimental empleado, donde las hojas son excisadas y

experimentan un proceso de desecación progresivo a lo largo del tiempo. Esta dinámica en la matriz de biorremediación agrega un componente de complejidad en términos de estabilidad en los parámetros del medio, por ejemplo, de humedad y pH, que afectan la actividad microbiana. No obstante, la bacteria logró adaptarse y crecer bajo estas condiciones, alcanzando una tasa de degradación de simazina del ~30% en un mes (tasa de degradación de 0,15 mg simazina g⁻¹ hoja).

Estos ensayos se desarrollaron durante las estaciones de invierno y primavera, sugiriendo que los efectos estacionales no ejercieron una influencia significativa en la tasa de degradación, considerando que los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Se recomienda realizar nuevas replicas, en las distintas estaciones del año, para evaluar de manera cuantitativa el potencial efecto de la temperatura ambiente sobre la tasa de degradación de la simazina a nivel foliar.

El diseño experimental desarrollado y los resultados obtenidos en muestras de hojas excisadas deben interpretarse como un modelo inicial que representa un primer paso para evaluar y cuantificar la biorremediación de herbicidas a nivel foliar en plantas vivas (*in situ*). Para escalar el procedimiento a plantas vivas, se recomienda realizar un estudio preliminar que permita contrastar las curvas de crecimiento bacteriano en ambas condiciones, es decir, hojas excisadas y hojas *in situ*. Esto permitiría conocer el efecto del estado de la hoja en el crecimiento bacteriano y evaluar la necesidad de realizar reinoculación o bioestimulación para obtener mejores tasas de biodegradación del contaminante *in situ*.

6. Conclusiones

1. Esta tesis demostró que *Pseudomonas* sp. ADP posee la capacidad de degradar simazina a nivel foliar, lo que valida la hipótesis planteada.
2. Se validó el método analítico desarrollado para la cuantificación de simazina mediante HPLC, permitiendo monitorear la efectividad del proceso de biorremediación foliar. Esta metodología es robusta, rápida y de alta resolución.
3. Los resultados indicaron que la cepa *Pseudomonas* sp. ADP, que fue aislada desde suelo, degradó simazina en la superficie de hojas de palto, demostrando una notable plasticidad adaptativa en la matriz foliar incluyendo condiciones de desecación progresiva de las hojas. A temperatura ambiente, la biodegradación a los 30 días fue 31% de simazina (tasa de degradación de 0,15 mg simazina g⁻¹ hoja) en ensayos realizados en invierno y de 34% de biodegradación a los 30 días en primavera.
4. El enfoque experimental de utilizar la superficie de las hojas como matriz de biorremediación mediante bioaumentación representó una innovación en el campo de la biorremediación de herbicidas, que tradicionalmente se ha estudiado en suelos y aguas.
5. Este estudio de biorremediación foliar de herbicidas sobre hojas excisadas, se presenta como un modelo exploratorio, proyectando un escalamiento de las metodologías para evaluar la biorremediación foliar sobre hojas en plantas vivas (*in situ*) y la biorremediación foliar de otros contaminantes de interés.

7. Proyecciones

1. Se propone escalar el modelo de biorremediación foliar a hojas en plantas vivas (*in situ*) y estudiar cómo las nuevas variables implicadas modifican los resultados obtenidos.
2. Validar esta tecnología de biorremediación permitiría desarrollar un bioproducto que pueda utilizarse para proteger cultivos en etapas tempranas. Esto se realizaría antes de la aplicación de herbicidas, previniendo que estos agroquímicos, que controlan malezas en el suelo, lleguen a contaminar las matrices foliares y los frutos de los cultivos de interés.
3. Esta biotecnología de biorremediación se podría estudiar para descontaminar plantaciones de cultivos de hojas perennes tratadas crónicamente con agroquímicos, facilitando la transición hacia una agricultura más ecológica.
4. Se propone la evaluación económica y práctica de implementar la biorremediación foliar a gran escala. Esto podría involucrar estudios sobre costos, beneficios y logística para su aplicación en diferentes escenarios ambientales y agrícolas. Lo anterior incluiría el estudio y elaboración de medios de cultivo bacterianos no convencionales que resulten más económicos, evaluando, por ejemplo, desechos de la industria alimentaria como posibles fuentes de carbono y micronutrientes para la proliferación de los microorganismos utilizados.
5. La validación del método de biorremediación foliar mediante la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. ADP sugiere la posibilidad de aplicar este enfoque para contaminantes industriales y urbanos, extendiendo el alcance de la biorremediación foliar. Este enfoque podría integrarse incluso con técnicas de fitorremediación asistida, ampliando la capacidad de biorremediación y abriendo nuevas vías para la biotecnología aplicada en la mitigación de la contaminación ambiental.

8. Referencias

- ACHIPIA (2011-2013). Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria. Programa Nacional Integrado de Plaguicidas de uso Agrícola. Informe de Evaluación de Actividades.
- Ahad, J.M.E., Macdonald, R., Parrot, J., Yang, Z., Zhang, Y., Siddique, T., Kuznetsova, A., Rauert, C., Galarneau, E., Studabaker, W., Evans, M., McMaster, M., & Shang, D. (2020). Polycyclic aromatic compounds (PACs) in the Canadian environment: A review of sampling techniques, strategies and instrumentation, *Environmental Pollution*. 266, 114988.
- Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(11).
- Bang Clausen, G., Larsen, L., Johnsen, K., Radnoti de Lipthay, J., & Aamand Å, J. (2002). Quantification of the atrazine-degrading *Pseudomonas* sp. strain ADP in aquifer sediment by quantitative competitive polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Ecology*. 41, 221-229.
- Baranowska, I., Barchanska, H., Abuknesha, R. A., Price, R. G., & Stalmach, A. (2008). ELISA and HPLC methods for atrazine and simazine determination in trophic chains samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70(2), 341–348.
- Birnbaum, L.S., & Fenton, S.E., (2003). Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ. Health Perspect.* 111, 389e394.
- Colin F. P. (2003). The essence of Chromatography. Chapter 1-General concepts in Column Chromatography. Elsevier Science. pp, 1–78.
- Délye, C., Jasieniuk, M., & Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*. 29(11), 649–658.

- Europe, HRAC. (2021). Nuevo sistema de clasificación de los herbicidas por su modo de acción. Recuperado de: <https://www.hracglobal.com/europe/> en Junio de 2024.
- Flores, C., Morgante, V., González, M., Navia, R., & Seeger, M. (2009). Adsorption studies of the herbicide simazine in agricultural soils of the Aconcagua valley, central Chile. *Chemosphere*. 74(11), 1544–1549.
- Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Padoa, E., Canedoli, C., Brambilla, D., Cappelletti, D., Sebastiani, B., Federici, E., Papacchini, M., & Ambrosini, R. (2020). Plant-microorganisms interaction promotes removal of air pollutants in Milan (Italy) urban área. *Journal of Hazardous Materials*. 384, 121021.
- Gomes, F. B. R., Assunção, T. de O. G. de, Dias, Á. C. L., Castro, S. R., Brandt, E. M. F., & Pereira, R. de O. (2023). Assessment of exposure to simazine through drinking waters in Brazil. *Environmental Advances*. 11, 100336.
- Harris, D. (2003). *Quantitative Chemical Analysis*. Barcelona: Reverté. pp, 608-639.
- Hayes, T.B., Stuart, A.A., Mendoza, M., Collins, A., Noriega, N., Vonk, A., Johnston, G., Liu, R., Kpodzo, D., 2006. Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17b-estradiol): support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environ. Health Perspect.* 114, 134e141.
- Hyun, T., Meshref, M. N. A., & Ranjan, B. (2021). A review and roadmap for developing microbial electrochemical cell-based biosensors for recalcitrant environmental contaminants, emphasis on aromatic compounds. *Chemical Engineering Journal*. 424, 130245.
- LaCourse, W. R. (2017). *HPLC Instrumentation. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. pp, 1-7
- Legaz, M., Sacristán, M., Díaz, E., Alarcón, B., & Córdoba, C. (2011). *Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-*

prácticas. Parte I. Introducción y práctica de laboratorio: cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter. *Reduca (Biología)*. Serie Técnicas y Métodos. 4(3), 1–32.

Macaya, C. C., Durán, R. E., Hernández, L., Rodríguez-Castro, L., Barra-Sanhueza, B., Dorochesi, F., & Seeger, M. (2019). Bioremediation of Petroleum (pp.1–6). In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier.

Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (2023). *Brock Biología de los Microorganismos*. Pearson Educación, Madrid. pp, 137–161.

Mahesh, N., Balakumar, S., Danya, U., Shyamalagowri, S., Babu, P. S., Aravind, J., Kamaraj, M., & Govarthan, M. (2022). A review on mitigation of emerging contaminants in an aqueous environment using microbial bio-machines as sustainable tools: Progress and limitations. *Journal of Water Process Engineering*. 47,102712.

Mandal, M., Das, S., Roy, A., Rakwal, R., Jones, O. A. H., Popek, R., Agrawal, G. K., & Sarkar, A. (2023). Interactive relations between plants, the phyllosphere microbial community, and particulate matter pollution. In *Science of the Total Environment*.890.

Mandelbaum, R. T., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2008). Microbial Degradation of s-Triazine Herbicides. *The Triazine Herbicides*. 301–328.

Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2014). Bioremediation. In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. pp, 485–489.

Montiel, A., & Sanchez, I. (1996). Estudio del comportamiento de la simazina en los suelos del olivar. II. Evolución y distribución de la simazina en diferentes niveles de profundidad de suelo a lo largo del tiempo. *Bol. San. Veg. Plagas*. 22 (3), 543–549.

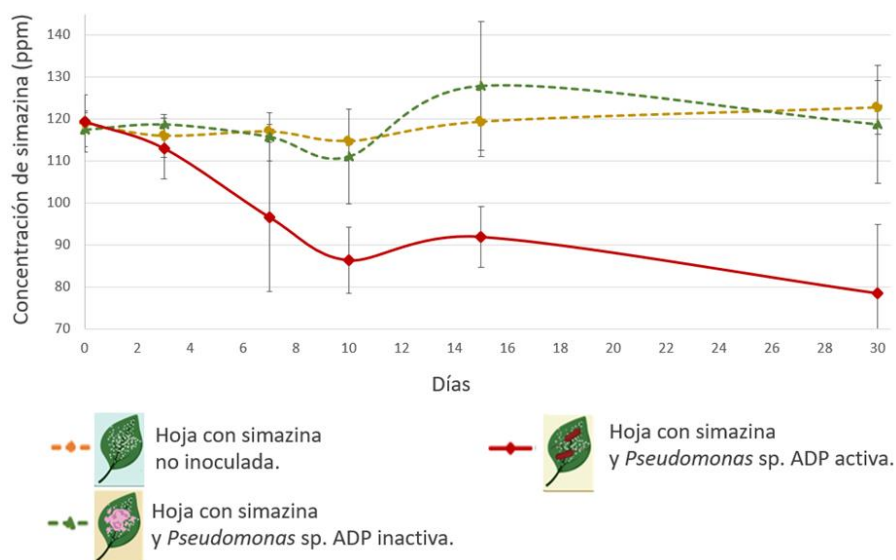
Morgante, V., Flores, C., Fadic, X., González, M., Hernández, M., Cereceda-Balic, F., & Seeger, M. (2012). Influence of microorganisms and leaching on simazine attenuation in an agricultural soil. *Journal of Environmental Management*. 95, S300–S305.

- Quareshy, M., Prusinska, J., Li, J., & Napier, R. (2017). A cheminformatics review of auxins as herbicides. *Journal of Experimental Botany*. 69(2), 265–275.
- Rousseaux, S., Hartmann, A., Lagacherie, B., Piutti, S., Andreux, F., & Soulas, G., (2003). Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: effects of different inoculum densities. *Chemosphere*. 51,569e576.
- SAG (2024). Reporte de Plaguicidas Autorizados en Chile. Recuperado de: <https://n9.cl/6tghg> en Junio de 2024.
- Samuel, Z., Ojemaye, M. O., Okoh, O. O., & Okoh, A. I. (2023). Adsorption of simazine herbicide from aqueous solution by novel pyrene functionalized zinc oxide nanoparticles: Kinetics and isotherm studies. *Materials Today Communications*. 34, 105435.
- Seo, J., Keum, Y., & Li, Q. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 6(1),278–309.
- Singh, A. K., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., & Raj, A. (2021). Trends in predictive biodegradation for sustainable mitigation of environmental pollutants: Recent progress and future outlook. *Science of The Total Environment*. 770, 144561.
- Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. Cengage Learning Editores. pp, 816–855.
- Stelting, S., Burns, R. G., Sunna, A., Visnovsky, G., & Bunt, C. R. (2012). Immobilization of *Pseudomonas* sp. strain ADP: A stable inoculant for the bioremediation of atrazine. *Applied Clay Science*. 64, 90–93.
- Wackett, L., Sadowsky, M., Martinez, B., Shapir, N., (2002). Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58, 39–45.

Wei, X., Lyu, S., Yu, Y., Wang, Z., Liu, H., Pan, D., Chen, J., (2017). Phylloremediation of air pollutants: exploiting the potential of plant leaves and leaf-associated microbes. *Front. Plant Sci.* 8, 1318.

9. Anexos

Anexo I. Réplica biológica: Biorremediación de simazina con *Pseudomonas* sp. ADP en hojas de palto. Cuantificación de simazina. Líneas segmentadas: concentración de simazina en aquellas condiciones donde no hubo bioaumentación (controles negativos). Línea sólida: concentración de simazina en la condición sujeta a bioaumentación con la cepa *Pseudomonas* sp. ADP.



Anexo II. Herbicidas autorizados por el SAG que contienen simazina como sustancia activa. Reporte de plaguicidas autorizados en Chile, 2024.

Producto	N° de Autorización en el Servicio Agrícola Ganadero (SAG)
Gesatop 90 WG	3086
Simanex 90 WG	3451
Simazina 500 SC	3459
Sipcazin	3461
Simazina 90 WG	3474
Simazina 90% WG	3597
Simazina 50 SC	3611
Romazina	3619
Simaclan 90 WG	3625