



ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
DE LA USC

María Zoe
Chaos Carballo

Tesis doctoral

Contaminación histórica por
hexaclorociclohexano: monitorización
ambiental y alternativas de
descontaminación

Santiago de Compostela, 2025

TESIS DOCTORAL

**CONTAMINACIÓN HISTÓRICA POR
HEXACLOROCICLOHEXANO:
MONITORIZACIÓN AMBIENTAL Y
ALTERNATIVAS DE
DESCONTAMINACIÓN**

Autora

María Zoe Chaos Carballo

Directora: María del Carmen Monterroso Martínez

Tutora: María del Carmen Monterroso Martínez

María Zoe Chaos Carballo declara no tener ningún conflicto de interés
en relación con la presente tesis doctoral.

Esta tesis doctoral fue llevada a cabo en el marco de un contrato de investigación predoctoral dentro del proyecto “Contaminación histórica en una zona impactada por la producción de lindano: evaluación, monitorización y modelización en el sistema suelo-planta-aire-agua // (EvaLind)”, financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España (PID2019-107879RB-100) y fondos FEDER (UE). El desarrollo de esta tesis se realizó con el grupo de investigación AMBIOSOL (GI-1245) en CRETUS y en el Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Santiago de Compostela. Además, una beca predoctoral otorgada por CRETUS (convocatoria de 2023) hizo posible la realización de una estancia de investigación en Luleå Tekniska Universitet (Luleå, Suecia).

PUBLICACIONES

La tesis adopta un formato monográfico e integra contenidos derivados de dos publicaciones realizadas durante el desarrollo de la etapa doctoral, ambas publicadas en *Open Access* y con permiso para su inclusión en la presente tesis conforme a la política de la editorial Elsevier: <https://www.elsevier.com/about/policies-and-standards/copyright/permissions>

Con el fin de cumplir los requisitos para la obtención de la Mención Internacional, los trabajos asociados a dichas publicaciones, así como un tercer trabajo actualmente en revisión editorial y las conclusiones finales de la tesis, se presentan en inglés.

A continuación, se detalla la información relativa a dichas contribuciones y su vinculación con los contenidos de esta tesis.

1. WHAT POTENTIAL DO MOSSES HAVE AS BIOMONITORS OF POPS? A COMPARATIVE STUDY OF HEXACHLOROCYCLOHEXANE SORPTION

Autoría: Z. Chaos ^{a,*}, J.A. Fernández ^b, M. Balseiro-Romero ^a, M. Celeiro ^c, C. García-Jares ^c, A. Méndez ^a, P. Pérez-Alonso ^a, B. Estébanez ^d, J. Kaal ^e, K.G.J. Nierop ^f, J.R. Aboal ^b, C. Monterroso ^a

Afiliación: ^a CRETUS, Depto. Edafología e Química Agrícola, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España ^b CRETUS, Depto. Ecoloxía, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España ^c CRETUS, Depto. Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España ^d Depto. Biología, Unidad de Botánica, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, España ^e Pyrolyscience, 15707 Santiago de Compostela, España ^f Geolab, Faculty of Geosciences, Utrecht University, Princetonlaan 8, 3584 CB Utrecht, The Netherlands

Datos de publicación: *Science of the Total Environment* (Vol. 934, artículo 173021), 15 de julio 2024, Elsevier; <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173021>

Indicadores de calidad (2024): 1. JCR: Journal Impact Factor 8,0; Q1 (ciencias ambientales); 2. Scopus: CiteScore 16,4; Q1 (ciencias ambientales, contaminación); Q1 (ciencias ambientales, química ambiental)

Relación con la tesis: Biosorción de HCH en musgos (*Biosorption of HCH in mosses*)

Contribución individual: Análisis formal y tratamiento de datos, redacción del borrador original

2. ENHANCING HEXACHLOROCYCLOHEXANE SOLUBILITY WITH SURFACTANTS AND IONIC LIQUIDS

Autoría: Z. Chaos ^{a,*}, M. Balseiro-Romero ^{a,b}, B. Calviño-Vázquez ^a, A. Somoza ^c, A. Soto ^c, C. Monterroso ^a

Afiliación: ^a CRETUS, Dpto. Edafología e Química Agrícola, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España ^b Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), 41012 Sevilla, España ^c CRETUS, Dpto. Enxeñaría Química, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, España

Datos de publicación: *Journal of Molecular Liquids* (Vol. 399, artículo 124329), 1 de abril 2024, Elsevier; <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124329>

Indicadores de calidad (2024): 1. JCR: Journal Impact Factor 5,2; Q1 (física atómica, molecular y química), Q2 (química física); 2. Scopus: CiteScore 10,5; Q1 (física de la materia condensada, espectroscopía, física atómica y molecular, y óptica, química de materiales)

Relación con la tesis: Efecto de surfactantes y líquidos iónicos sobre la solubilidad de HCH (*Effect of surfactants and ionic liquids on the solubility of HCH*)

Contribución individual: Investigación, análisis formal y tratamiento de datos, redacción del borrador original

A mis abuelos:
Amadeo y Celsa, María y Venancio, Pelao y Rosa

AGRADECIMENTOS

Concluyo esta tesis doctoral con nuevos conocimientos, vivencias y, sobre todo, con una profunda emoción y satisfacción. En estas líneas quiero agradecer a quienes me han acompañado, apoyado y animado a lo largo de este tiempo.

En primer lugar, gracias Carmela por darme la oportunidad de realizar esta tesis. Ha sido una experiencia enriquecedora, intensa y que, sin duda, volvería a repetir. Gracias por la formación que me has brindado, por fomentar en mí el pensamiento crítico y por el optimismo con el que siempre me has guiado.

También quiero agradecer a mis vecinos de laboratorio, Juan y Sara, por estar siempre dispuestos a ayudar. A Eduardo, por sus incalculables enseñanzas sobre el cromatógrafo de gases. Y, en general, a todas las personas del laboratorio de Edafología y Química Agrícola y de CRETUS: a Paco y María, por su apoyo en los experimentos; a Carmen, por alegrarme tantos días; a Marc, compañero y futuro doctor (¡ya casi!); y a Ana, Sofía y Aldara que, aunque estuvieron menos tiempo, también dejaron su huella.

Agradezco también a los compañeros de Luleå, que hicieron de mi estancia doctoral una experiencia inolvidable. En especial a Iván, por acogerme como a una más de la familia y por tantos *fikas* llenos de consejos, enseñanzas y risas.

Gracias a los investigadores e investigadoras con los que colaboré durante la tesis doctoral: María Balseiro, María Celeiro, Carmen Jares, Ana Soto, Jesús Aboal, Ángel Escribano, me llevo un aprendizaje de cada uno de vosotros.

A mi familia: mamá, papá, Josu, Alexandra y Joaquín, gracias por estar siempre. A Pulga, mi perrita y compañera de tantas tardes de estudio. A Miguel, mi pareja, mi mayor apoyo y mi ejemplo diario. A mi familia política, Lola, Secundino y todos los perolos, gracias por tanto cariño.

A mis amigos, gracias por todos los buenos momentos, las risas y el amor que me habéis dado. A mis niñas, las tolas do tropi, Virginia, Paula, y Sara; y sus tolos, Rúa, Martín y Facu. A Iria, Vera, Pablo, Meri, Flo y Tere, por ser siempre luz. Vichu, Ignacio y Juan, por tantas charlas compartidas. A mis bio-compañeros Alex, Ahinara, Diego, Joseru y Pablo. Y a la gente de Carballiño: Chechu, Óscar, Lupe, Kinchi, por hacerme sentir una más.

Finalmente, agradecer a mis abuelos, siempre presentes. Sois eternos.

RESUMEN

El gamma-hexaclorociclohexano (γ -HCH), conocido como lindano, fue un pesticida ampliamente utilizado durante la segunda mitad del siglo XX. Su producción es un proceso altamente ineficiente que genera grandes cantidades de residuos de otros isómeros (entre 8 y 12 t por 1 t de lindano), lo que ha dado lugar a la acumulación global de entre 4,8 y 7,2 Mt. Actualmente se conocen bien su toxicidad, persistencia, capacidad de bioacumulación y transporte a larga distancia; por estas razones, α -, β -, y γ -HCH fueron incluidos en la lista de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en el Convenio de Estocolmo de 2009. Sin embargo, durante décadas estos impactos eran desconocidos y los residuos se depositaron sin control en vertederos a cielo abierto. Como consecuencia, y debido a su alta persistencia, el HCH sigue presente en el medio ambiente incluso 20 años después de su prohibición, constituyendo el mayor legado de contaminación por un COP.

Ante esta situación, es imperativo seguir identificando áreas contaminadas, monitorizar la evolución del HCH y comprender su comportamiento ambiental para diseñar estrategias de descontaminación efectivas y sostenibles.

En este contexto, la presente tesis llevó a cabo un programa de monitorización ambiental basado en muestreos de suelo y vegetación en el área de O Porriño (Galicia, NO España), zona afectada históricamente por el vertido de residuos de fabricación de lindano, con el objetivo de determinar los niveles actuales de HCH y analizar su evolución espacio-temporal. Los resultados confirmaron la presencia actual del contaminante y mostraron una reducción de entre 2 y 3 órdenes de magnitud en un emplazamiento afectado durante las dos últimas décadas. Paralelamente, se evaluó el potencial de los musgos *Fontinalis antypiretica* Hedw. (musgo acuático) y *Sphagnum palustre* L. (musgo terrestre) como biomonitores de HCH en condiciones controladas de laboratorio, tanto en fase acuosa como gaseosa. Estos ensayos proporcionaron datos novedosos sobre los factores moleculares e histoquímicos que influyen en la acumulación de HCH en clones de musgos desvitalizados. Por otra parte, se exploraron tres líneas de investigación centradas en estrategias de descontaminación: (i) la movilización del HCH mediante surfactantes y líquidos iónicos con actividad surfactante en medio acuoso (incluyendo el estudio de posibles sinergias), destacando la eficacia de SDBS, Sarkosyl, [N₁₁₁₂Bz]Cl y TritonX-100; (ii) la inmovilización de HCH con enmiendas edáficas (compost, biocarbones y ceniza de biomasa) aplicadas a distintas dosis en los sistemas suelo-aire y suelo-agua, con resultados prometedores en suelos tratados con biocarbón de corteza de pino y compost; y (iii) la oxidación electroquímica del HCH, evaluando la influencia de los parámetros operativos (densidad de corriente, concentración inicial del electrolito y del HCH), cinética de degradación y la validación del proceso en lixiviados de suelo, donde se observó una degradación casi completa del contaminante.

Los resultados de esta tesis contribuyen a profundizar en el conocimiento sobre la monitorización del HCH y sobre diversas estrategias para la descontaminación de suelos, abriendo nuevas perspectivas para investigaciones futuras en este campo.

PALABRAS CLAVE

Hexaclorociclohexano, lindano, contaminantes orgánicos persistentes, remediación de suelos, biomonitorización

RESUMO

O gamma-hexaclorociclohexano (γ -HCH), coñecido como lindano, foi un pesticida amplamente utilizado durante a segunda metade do século XX. A súa produción é un proceso altamente ineficiente que xera grandes cantidades de residuos doutros isómeros (entre 8 e 12 t por 1 t de lindano), o que deu lugar á acumulación global de entre 4,8 e 7,2 Mt. Actualmente coñécense ben a súa persistencia, toxicidade, capacidade de bioacumulación e transporte a longa distancia; por estas razóns, α -, β -, e γ -HCH foron incluídos na lista de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) no Convenio de Estocolmo de 2009. Con todo, durante décadas estes impactos eran descoñecidos e os residuos depositáronse sen control en vertedoiros a ceo aberto. Como consecuencia, e debido á súa alta persistencia, o HCH segue presente no medio ambiente ata 20 anos despois da súa prohibición, constituíndo o maior legado de contaminación por un COP.

Ante esta situación, é imperativo seguir identificando áreas contaminadas, monitorizar a evolución do HCH e comprender o seu comportamento ambiental para deseñar estratexias de descontaminación efectivas e sustentables.

Neste contexto, a presente tese levou a cabo un programa de monitorización ambiental baseado en mostraxes de solo e vexetación na área do Porriño (Galicia, NO España), zona afectada historicamente polo vertido de residuos de fabricación de lindano, co obxectivo de determinar os niveis actuais de HCH e analizar a súa evolución espazo-temporal. Os resultados confirmaron a presenza actual do contaminante e mostraron unha redución de entre 2 e 3 ordes de magnitude nun emprazamento afectado durante as dúas últimas décadas. Paralelamente, avalíouse o potencial dos musgos *Fontinalis antipyretica* Hedw. (musgo acuático) e *Sphagnum palustre* L. (musgo terrestre) como biomonitores de HCH en condicións controladas de laboratorio, tanto en fase acuosa como gasosa. Estes ensaios proporcionaron datos novos sobre os factores moleculares e histoquímicos que inflúen na acumulación de HCH en clons de musgos desvitalizados. Por outra banda, exploráronse tres liñas de investigación centradas en estratexias de descontaminación: (i) a mobilización do HCH mediante surfactantes e líquidos iónicos con actividade surfactante no medio acuoso (incluíndo o estudo de posibles sinerxías), destacando a eficacia de SDBS, Sarkosyl, [N 1 1 12 Bz] Cl e TritonX-100; (ii) a inmovilización de HCH con emendas edáficas (compost, biocarbóns e cinza de biomasa) aplicadas a distintas doses nos sistemas solo-auga e solo-aire, con resultados prometedores en solos tratados con biocarbón de pino e compost; e (iii) a oxidación electroquímica do HCH, avaliando a influencia dos parámetros operativos (densidade de corrente, concentración inicial do electrólito e do HCH), cinética de degradación e a validación do proceso en lixiviados de solo, onde se observou unha degradación case completa do contaminante.

Os resultados desta tese contribúen a afondar no coñecemento sobre a monitorización do HCH e sobre diversas estratexias para a descontaminación de solos, abrindo novas perspectivas para futuras investigacións neste campo.

PALABRAS CHAVE

Hexaclorociclohexano, lindano, contaminantes orgánicos persistentes, remediación de solos, biomonitorización

ABSTRACT

Gamma-hexachlorocyclohexane (γ -HCH), known as lindane, was a widely used pesticide during the second half of the 20th century. Its production is a highly inefficient process that generates large amounts of waste from other isomers (between 8 and 12 t of waste per 1 t of lindane), which has led to a global accumulation of between 4.8 and 7.2 Mt. Its toxicity, persistence, bioaccumulation capacity, and long-range transport are now well known; for these reasons α -, β -, and γ -HCH were included in the list of persistent organic pollutants (POPs) in the 2009 Stockholm Convention. However, for decades these impacts were unknown and the waste was dumped in uncontrolled open dumps. As a result, and due to its high persistence, HCH is still present in the environment even 20 years after its ban, constituting the largest legacy of contamination by a POP.

Given this situation, it is imperative to continue identifying contaminated areas, monitor the evolution of HCH pollution, and understand its environmental behaviour in order to develop effective and sustainable remediation strategies.

In this context, this thesis carried out an environmental monitoring through soil and vegetation samplings in the area of O Porriño (Galicia, NW Spain), a site with a history of lindane production waste dumping, with the aim of determining current HCH levels and analysing their spatial-temporal evolution. The results confirmed the current presence of the contaminant and showed a reduction of between 2 and 3 orders of magnitude at an affected site over the last two decades. Simultaneously, the potential of *Fontinalis antipyretica* Hedw. (aquatic moss) and *Sphagnum palustre* L. (terrestrial moss) as biomonitors of HCH was evaluated under controlled laboratory condition, both in aqueous and gaseous phases. These tests provided new insights into the molecular and histochemical factors influencing HCH accumulation in devitalised moss clones. Furthermore, three lines of research focused on remediation strategies were explored: (i) the mobilisation of HCH using surfactant and surface-active ionic liquids in aqueous media (including the study of possible synergies), highlighting the efficiency of SDBS, Sarkosyl, [N₁₁₁₂Bz]Cl, and TritonX-100; (ii) the immobilisation of HCH with soil amendments (compost, biochar and biomass ash) applied at different doses in soil-air and soil-water systems, with encouraging outcomes in soils treated with pine bark biochar and compost; and (iii) the electrochemical oxidation of HCH, evaluating the influence of operating parameters (current density, initial concentration of electrolyte and HCH), degradation kinetics and process validation in soil leachates, where almost complete degradation of the contaminant was observed.

These findings contribute to the understanding of HCH monitoring and soil remediation techniques, opening new perspectives for future research in this field.

KEYWORDS

Hexachlorocyclohexane, lindane, persistent organic pollutants, soil remediation, biomonitoring

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 DESCRIPCIÓN DEL HEXACLOROCICLOHEXANO (HCH).....	2
1.2 ORIGEN, PRODUCCIÓN Y USO DEL HCH.....	4
1.3 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y DISTRIBUCIÓN DEL HCH.....	5
1.3.1 Dispersión en el sistema suelo-atmósfera.....	8
1.3.2 Dispersión en el sistema suelo-agua.....	9
1.3.3 Dispersión en el sistema suelo-planta.....	9
1.4 BIODEGRADACIÓN DEL HCH.....	10
1.5 TOXICIDAD DEL HCH Y RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA.....	12
1.6 CONTAMINACIÓN HISTÓRICA POR HCH EN EUROPA.....	13
1.7 CONTAMINACIÓN HISTÓRICA POR HCH EN GALICIA.....	16
1.8 MONITORIZACIÓN AMBIENTAL DE HCH.....	19
1.8.1 Biomonitorización con musgos.....	21
1.9 ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO Y DESCONTAMINACIÓN DE SUELOS CON HCH.....	22
1.9.1 Movilización con surfactantes.....	26
1.9.2 Inmovilización con enmiendas edáficas.....	27
1.9.3 Oxidación electroquímica.....	29
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
3 METODOLOGÍA	33
3.1 MONITORIZACIÓN AMBIENTAL DE HCH EN O PORRIÑO.....	33
3.1.1 Área de estudio y estrategia de muestreo.....	33
3.1.2 Recogida de muestras de suelo y material vegetal.....	36
3.2 BIOSORCIÓN DE HCH EN MUSGOS.....	37
3.2.1 Musgos seleccionados.....	37
3.2.2 Ensayos de biosorción.....	38

3.3 EFECTO DE SURFACTANTES Y LÍQUIDOS IÓNICOS SOBRE LA SOLUBILIDAD DE HCH	40
3.3.1 Surfactantes y líquidos iónicos seleccionados.....	40
3.3.2 Ensayo de solubilización	40
3.4 EFECTO DE ENMIENDAS EDÁFICAS SOBRE LA MOVILIDAD DE HCH	45
3.4.1 Enmiendas y preparación de muestras.....	45
3.4.2 Ensayos de lixiviación y volatilización	47
3.5 OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA Y CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE HCH	48
3.5.1 Configuración electroquímica	48
3.5.2 Determinación de las condiciones operativas.....	49
3.5.3 Estudio cinético de degradación	50
3.5.4 Aplicación en lixiviados de suelos contaminados	50
3.6 EXTRACCIÓN DE HCH EN LAS MUESTRAS OBTENIDAS	51
3.6.1 Muestras de suelo	51
3.6.2 Muestras vegetales y adsorbentes.....	51
3.6.3 Muestras acuosas	52
3.7 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HCH.....	53
3.7.1 Análisis de extractos en hexano.....	53
3.7.2 Análisis de extractos en acetato de etilo	53
3.7.3 Análisis de fibra PDMS.....	54
3.8 REACTIVOS.....	54
3.9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	55
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1 MONITORIZACIÓN AMBIENTAL DE HCH EN O PORRIÑO.....	57
4.1.1 Niveles de HCH en el muestreo extensivo	57
4.1.2 Niveles de HCH en un emplazamiento históricamente contaminado	60
4.1.3 Discusión	65

4.2 BIOSORPTION OF HCH IN MOSSES.....	69
4.2.1 Liquid phase batch biosorption experiment	69
4.2.2 Gas phase biosorption experiment	71
4.2.3 Discussion	71
4.3 EFFECT OF SURFACTANTS AND IONIC LIQUIDS ON THE SOLUBILITY OF HCH.....	74
4.3.1 Effect of cationic surface-active compounds	74
4.3.2 Effect of anionic surface-active compounds	77
4.3.3 Effect of nonionic surfactants	79
4.3.4 Synergistic effects in mixed systems	81
4.3.5 Discussion	82
4.4 EFECTOS DE ENMIENDAS EDÁFICAS SOBRE LA MOVILIDAD DE HCH.....	84
4.4.1 Efectos sobre las propiedades del suelo	84
4.4.2 Efectos sobre la lixiviación de HCH.....	88
4.4.3 Efectos sobre la volatilización de HCH	90
4.4.4 Discusión.....	91
4.5 ELECTROCHEMICAL OXIDATION AND DEGRADATION KINETICS OF HCH	95
4.5.1 Setting operating parameters.....	95
4.5.2 Kinetic degradation study	101
4.5.3 Electrochemical oxidation of HCH in soil leachates	104
4.5.4 Degradation products	107
5 CONCLUSIONES	109
6 BIBLIOGRAFÍA	111
7 APÉNDICES	137

1 INTRODUCCIÓN

El suelo constituye la base de la vida terrestre. Es un sistema complejo y dinámico que desempeña funciones esenciales para la sostenibilidad de los ecosistemas terrestres y el sustento de la vida. Participa en una amplia variedad de funciones y servicios ecosistémicos, incluidos los relacionados con la producción de biomasa, la regulación de los ciclos de carbono y nutrientes, y la regulación de los recursos hídricos y la calidad del aire.

En las últimas décadas, la creciente industrialización, urbanización, agricultura intensiva y operaciones mineras han liberado enormes cantidades y tipos de contaminantes al suelo, afectando notablemente a su funcionalidad y suministro de servicios ecosistémicos. Sólo en Europa, se estima que hay más de 2,5 millones de emplazamientos potencialmente contaminados, de los que el 14% podrían estar severamente contaminados (Payá-Pérez y Rodríguez-Eugenio, 2018). La contaminación edáfica es reconocida internacionalmente como una amenaza para la calidad del agua y del aire, la vegetación y los alimentos, la salud humana y la biodiversidad.

Desde la Revolución Verde a finales del siglo XX, el uso de productos fitosanitarios ha sido clave para aumentar el rendimiento agrícola, controlar plagas y enfermedades, y mejorar la calidad de los alimentos. No obstante, su uso extensivo también ha generado serios impactos ambientales. Los primeros pesticidas empleados a gran escala fueron compuestos organoclorados, caracterizados por su alta persistencia ambiental. La contaminación actual por pesticidas refleja tanto aplicaciones recientes de pesticidas modernos como el legado de pesticidas persistentes utilizados en el pasado. En Europa, por ejemplo, el 74,5 % de los suelos agrícolas contiene residuos de pesticidas, incluyendo sustancias actualmente prohibidas (Vieira et al., 2023).

La publicación de *Silent spring* (1962), de Rachel Carson, marcó un punto de inflexión al alertar sobre los efectos del pesticida organoclorado DDT en la salud humana y los ecosistemas. Este libro impulsó una nueva conciencia ambiental y condujo al desarrollo de regulaciones más estrictas a nivel global. Actualmente, la mayoría de los pesticidas organoclorados se consideran contaminantes orgánicos persistentes (COPs) bajo el Convenio de Estocolmo (United Nations Environment Programme, 2009), debido a su alta toxicidad, capacidad de bioacumulación, transporte a larga distancia, y persistencia ambiental. Su inclusión en dicho convenio implica la regulación de su uso y producción, así como la gestión sostenible y definitiva de los suelos contaminados.

El mayor legado conocido de contaminación por un único COP es el del hexaclorociclohexano (HCH) (Vijgen et al., 2022). A pesar de las medidas internacionales adoptadas, el uso intensivo de HCH durante décadas y la gestión deficiente de los residuos generados en su fabricación, ha dado lugar a una contaminación histórica de suelos a nivel global, especialmente en zonas industriales donde fue fabricado, almacenado o vertido.

Ante la degradación progresiva de los suelos, la Unión Europea implementó en 2021 la Estrategia para la Protección del Suelo dentro del Pacto Verde Europeo, con el objetivo de alcanzar suelos sanos para 2030. Esta acción se enmarca en la Década de las Naciones Unidas sobre la Restauración de los Ecosistemas (2021-2030), orientada a recuperar ecosistemas degradados y sus funciones esenciales. La restauración del suelo es clave para conservar la biodiversidad, mejorar la seguridad alimentaria y mitigar el cambio climático, en consonancia con los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2, 13 y 15.

En este contexto, es prioritario intensificar la investigación y promover la gestión sostenible de los suelos contaminados por pesticidas persistentes como el HCH, contribuyendo así al cumplimiento de los compromisos internacionales en materia de protección y restauración del suelo.

1.1 DESCRIPCIÓN DEL HEXACLOROCICLOHEXANO (HCH)

1,2,3,4,5,6-hexachlorociclohexano (HCH) es un hidrocarburo monocíclico clorado de seis carbonos, con un átomo de cloro y uno de hidrógeno unidos a cada posición del anillo. El HCH ($C_6H_6Cl_6$; $M = 290,9 \text{ g mol}^{-1}$) se presenta en forma de 8 isómeros (α - a θ -HCH; α -HCH con dos formas enantioméricas), pero sólo α -, β -, γ -, δ - y ϵ -HCH son estables, los cuales adoptan una conformación silla. En esta estructura, los átomos de cloro pueden ocupar posiciones axiales o ecuatoriales, es decir, paralelas al eje del anillo o en el plano ecuatorial de la molécula, siendo las primeras menos estables por las repulsiones estéricas (Fig. 11) (Waclawek et al., 2019; Willett et al., 1998). La disposición espacial de los cloros determina la existencia y las propiedades de cada uno de los isómeros. Los isómeros α -, β -, y γ -HCH, y en menor medida δ -HCH, son los más relevantes tanto por su abundancia como por su impacto ambiental.

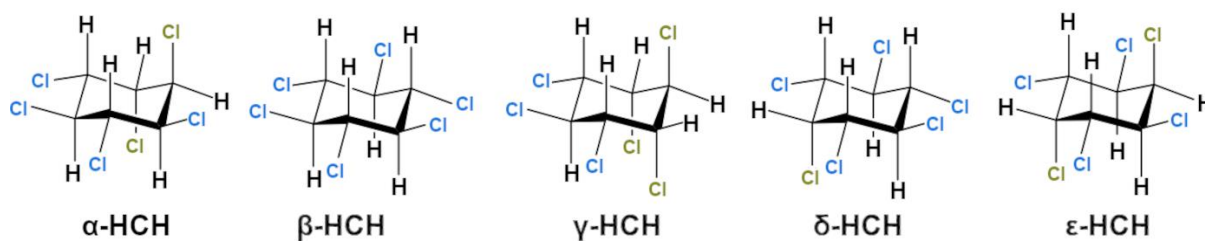


Fig. 11 Estructuras de los isómeros del hexaclorociclohexano (HCH) con los átomos de cloro en posición axial indicados en azul y los cloros en posición ecuatorial en verde.

En general, los isómeros de HCH son semivolátiles y presentan baja solubilidad en agua. Además, muestran alta estabilidad química, ya que resisten la luz, las altas temperaturas, el agua caliente y los ácidos. Sin embargo, las sustancias alcalinas pueden provocar su descloración (Waclawek et al., 2019). Esta inestabilidad frente a compuestos alcalinos fue documentada por primera vez en 1912 por Van der Linden, y estudios posteriores confirmaron que el γ -HCH se descompone más rápidamente en condiciones básicas (pH 7–12) (Liu et al., 2003).

Los valores citados en la literatura para las propiedades fisicoquímicas de los isómeros de HCH varían entre estudios debido a diferencias metodológicas y experimentales, aunque existe

consenso en los patrones generales de comportamiento. En la tabla I1 se resumen los valores usados en los trabajos desarrollados en esta tesis.

Tabla I1 Propiedades fisicoquímicas de los isómeros de HCH utilizados en los estudios.

	α -HCH	β -HCH	γ -HCH	δ -HCH
CAS	319-84-6	319-85-7	58-89-9	319-86-8
Punto de fusión (°C) ^{a,b}	158-160	309-315	112-113	138-139
Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20-30 °C) ^b	1,5-10	0,2-5	6-17	9-31
Presión de vapor (Pa, 20 °C) ^c	$(1,6 \pm 0,9) \times 10^{-2}$	$(4,2 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(5,3 \pm 1,4) \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$
log K _{ow} ^{1,a,b}	3,8-3,81	3,78-3,84	3,61-3,72	4,14
log K _{oc} ^{2,a}	3-3,57	3,57	3,57	3,8
log K _{oa} ^{3,a,b}	7,25-7,61	8,09-8,88	7,85-7,99	8,66-8,84

^a (Calvelo Pereira et al., 2006), ^b (Wactawek et al., 2019), ^c (Willett et al., 1998); ¹ coeficiente de partición octanol/agua; ² coeficiente de sorción; ³ coeficiente de partición octanol/aire

Las propiedades fisicoquímicas varían entre los isómeros. El α -HCH es el que presenta la mayor presión de vapor, lo que refleja una mayor tendencia a volatilizarse. El δ -HCH es el más soluble en agua y el γ -HCH muestra valores intermedios tanto de solubilidad como de volatilidad. El β -HCH es el isómero menos soluble y menos volátil. Además, es altamente lipofílico y muy poco reactivo, consecuencia de la disposición ecuatorial de sus seis átomos de cloro, que le confiere una estructura compacta y estable (Mrema et al., 2013). Esta combinación de lipofilidad y persistencia hacen que siga rutas ambientales distintas a las de los demás isómeros: es el más recalcitrante en suelos y el que presenta mayor bioacumulación (Xiao et al., 2004). Su factor de bioacumulación en humanos es casi 30 veces mayor que el de los demás isómeros, con un valor de 527 ± 140 (Willett et al., 1998). A pesar de estas diferencias entre isómeros, en conjunto son más volátiles y solubles que otros pesticidas organoclorados incluidos en la lista del Convenio de Estocolmo (Tabla I2).

La capacidad de isomerización del HCH ha sido debatida. La OMS aseguró que no existían pruebas de la conversión de γ -HCH a α -HCH (Willett et al., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que γ -HCH puede convertirse en α -HCH por acción microbiana en medios de cultivo con coenzima NAD y en suelos de manera anaeróbica (Wactawek et al., 2019). También se ha reportado la fotoisomerización de γ -HCH a α -HCH (Walker et al., 1999; Willett et al., 1998) y de β -HCH a α -HCH (Xue et al., 2021), aunque no hay evidencia de que ocurra en condiciones ambientales reales.

Tabla 12 Solubilidad en agua y presión de vapor de diez pesticidas organoclorados incluidos en la lista inicial del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (Shen y Wania, 2005).

	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20-30 °C)	Presión de vapor (Pa, 20 °C)
Aldrina	4,7 - 73	3,1 × 10 ⁻³
Clordano	3,2 × 10 ⁻² - 1,8	2,9 × 10 ⁻³ - 3,9 × 10 ⁻³ (estimado)
Dieldrina	3,2 × 10 ⁻² - 0,25	1,0 × 10 ⁻⁴ - 3,9 × 10 ⁻⁴
DDT	1,7 × 10 ⁻² - 13,1	1,7 × 10 ⁻⁵ - 4,3 × 10 ⁻⁵
Endrina	2,4 × 10 ⁻² - 0,26	5,2 × 10 ⁻³ (estimado, 25°C)
Heptacloro	3,0 × 10 ⁻² - 0,18	2,1 × 10 ⁻³ (25°C)
HCB	4,0 × 10 ⁻³ - 4,3	4.6 × 10 ⁻⁴ - 2.6 × 10 ⁻³

1.2 ORIGEN, PRODUCCIÓN Y USO DEL HCH

El HCH fue sintetizado por primera vez en 1825 por Michael Faraday, mediante la fotocloración del benceno, obteniendo una mezcla sólida de isómeros de HCH con otros productos relacionados. En la reacción se forman los isómeros en la siguiente proporción: α , 55-80 %; β , 5-14 %; γ , 8-15 %; δ , 2-16 %, y ϵ , 3-5 % (Breivik et al., 1999; Vijgen et al., 2011).

Las propiedades insecticidas de la mezcla de isómeros fueron descubiertas en 1936 por Harry Bender y posteriormente, en 1942, Roland Slade demostró que únicamente el isómero γ -HCH era responsable de la actividad insecticida (Rodríguez-Garrido, 2009). En los años posteriores, tras la Segunda Guerra Mundial, se produce una expansión de la agricultura industrializada y crece la oferta de productos fitosanitarios muy efectivos, pero con efectos negativos todavía desconocidos, como el HCH. Hasta los años 50 se comercializó como HCH técnico, una mezcla de isómeros, pero debido a problemas de toxicidad y efectos sobre las propiedades organolépticas de los cultivos, fue sustituido progresivamente por el lindano, compuesto únicamente por γ -HCH (99 % de pureza), el único isómero con propiedades insecticidas. En los años 70 empezó a restringirse la producción y uso del HCH técnico en todo el mundo y aumentó la demanda de lindano (Vijgen, 2006).

La producción de lindano conlleva un proceso de aislamiento y purificación del isómero γ -HCH, un proceso muy ineficiente que genera grandes volúmenes de residuos constituidos por otros isómeros contaminados con disolventes empleados en el proceso. El aislamiento empieza por el enfriamiento de la mezcla técnica para separar el isómero α -HCH, obteniéndose un producto enriquecido con un 40 % del γ -HCH. Posteriormente, este material se somete a ciclos sucesivos de cristalización fraccionada en metanol (15-25 °C) y a una destilación final (80-100 °C), hasta obtener un sólido con una pureza del 99 % en γ -HCH (Calvelo Pereira et al., 2008b).

El lindano se utilizó principalmente en agricultura, pero también en ganadería, silvicultura y en el ámbito de la salud humana para tratar piojos y sarna (Vijgen, 2006). Durante la segunda mitad del siglo XX, se consolidó como uno de los insecticidas de amplio espectro más producidos a nivel global y especialmente en Europa, Asia y América (Vijgen et al., 2019). Sin

embargo, debido a su alta toxicidad y su persistencia en el medio ambiente, finalmente fue prohibido en casi todos los países.

Se estima que entre 1948 y 1997 el consumo mundial acumulado de HCH técnico alcanzó aproximadamente 10 Mt (Li, 1999). Por su parte, entre 1950 y 2000, el consumo de lindano ascendió a 600.000 t, alcanzando su máximo en la década de 1960, antes de la prohibición progresiva del HCH técnico. (Vijgen, 2006). Además, dado que por cada tonelada de lindano producido se generan entre 8 y 12 t de residuos (Vijgen et al., 2011), se estima que este proceso liberó entre 4,8 y 7,2 Mt de residuos, compuestos en su mayoría por los isómeros α - y β -HCH.

A medida que avanzaron las investigaciones científicas que evidenciaban el transporte a larga distancia, bioacumulación, toxicidad y persistencia de los pesticidas organoclorados, el lindano fue progresivamente incorporado a diferentes marcos legislativos internacionales (Vijgen et al., 2011). Entre ellos uno de los más relevantes fue el Convenio sobre la Contaminación Atmosférica Transfronteriza a Larga Distancia (CLRTAP, *Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution*), cuyo objetivo es reducir la contaminación atmosférica transfronteriza. Este convenio incluye ocho protocolos, entre ellos el Protocolo de Aarhus sobre contaminantes orgánicos persistentes (COPs), precursor del posterior Convenio de Estocolmo sobre COPs. El lindano también se incluyó en el Convenio de Basilea (1989), que controla los movimientos transfronterizos de residuos peligrosos y su eliminación; en el Convenio OSPAR (1998), para la protección del medio marino del Atlántico Nororiental; y el Convenio de Rotterdam (1998), que regula la importación y exportación de determinados pesticidas y productos químicos peligrosos.

No obstante, no fue hasta 2009 cuando el lindano y sus principales subproductos de síntesis, los isómeros α - y β -HCH, se incorporaron al Convenio de Estocolmo sobre COPs. Estos compuestos fueron incluidos en el Anexo A, que obliga a los Estados Parte a eliminar su producción y uso mediante Planes Nacionales de Aplicación (PNA) (United Nations Environment Programme, 2009). El lindano fue incluido en esta lista con la excepción de su uso como tratamiento farmacéutico para el control de piojos y de sarna.

Hoy en día, India es el único productor de HCH, con una capacidad anual de 1.300 t (Vijgen et al., 2011). Aunque la producción y el uso agrícola del HCH técnico fueron prohibidos en 1997, el gobierno todavía permite su aplicación en ciertos cultivos y en el ámbito sanitario (Yadav et al., 2015).

1.3 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y DISTRIBUCIÓN DEL HCH

El uso intensivo de HCH ha dejado una huella ambiental significativa tanto en las zonas agrícolas donde fue aplicado como en las áreas industriales vinculadas a su fabricación, manejo y vertido. En estas últimas, las concentraciones de HCH pueden llegar a ser extremadamente elevadas, constituyendo importantes focos de contaminación que requieren una gestión urgente.

Los emplazamientos afectados por HCH se pueden clasificar como: los sitios de producción, donde se sintetizaba el HCH; los sitios de formulación, destinados a preparar el producto para su comercialización; los vertederos exclusivos de HCH, próximos a las plantas

de fabricación, y los vertederos con residuos varios; los sitios de tratamiento, como incineradoras, centros de reciclaje o plantas de descontaminación de suelos; los sitios de almacenamiento, donde se acumulaban tanto HCH como otros pesticidas obsoletos; y, finalmente, los sitios de uso, vinculados a la aplicación de HCH técnico o lindano en la agricultura, la medicina, la silvicultura, el tratamiento de madera y plásticos o en usos militares (Vijgen et al., 2022).

En las áreas vinculadas a la producción de HCH técnico y lindano se generaron residuos líquidos y sólidos. Los residuos líquidos consistían en una mezcla de clorobenceno, policlorobencenos, policlorofenoles, así como benceno y metanol que no reaccionaron en el proceso de producción. Esta mezcla líquida puede migrar hacia horizontes profundos del suelo hasta alcanzar una capa impermeable, donde forma una pluma de contaminación en forma de líquidos densos en fase no acuosa (DNAPL, *dense-non aqueous phase liquid*) (Fig. I2-B,D). El DNAPL queda atrapado en los poros más finos del suelo, lo que dificulta su eliminación, y además puede alcanzar la capa freática contaminando las aguas subterráneas. Por otro lado, el HCH sólido se depositaba generalmente a cielo abierto cerca de las fábricas, sólo o mezclado con otros residuos, acumulándose en grandes cantidades en puntos específicos (Fig. I2-A, C, E) (Fernández et al., 2013; Leal-Duaso et al., 2025).



Fig. 12 Una antigua fábrica de HCH en Países Bajos (Vijgen et al., 2019) (A); un lixiviado de DNAPL en España (Fernández et al., 2013) (B); un sitio de almacenamiento de HCH en España (Vijgen et al., 2022) (C); HCH en forma de DNAPL (D) y residuo sólido (E).

En el suelo, el HCH puede experimentar procesos físicos, químicos y biológicos. Puede adsorberse/desorberse del suelo, volatilizarse y transportarse a largas distancias, lixivarse con el agua y también puede ser transformado por microorganismos degradadores (Tripathi et al., 2019) (Fig. I3). Estos procesos determinan la dispersión y el movimiento del HCH en el ambiente y están influenciados por numerosos factores, entre ellos las propiedades fisicoquímicas de los diferentes isómeros, el clima, la topografía, las características del suelo y la actividad biológica (Morillo and Villaverde, 2017; Waławek et al., 2019).

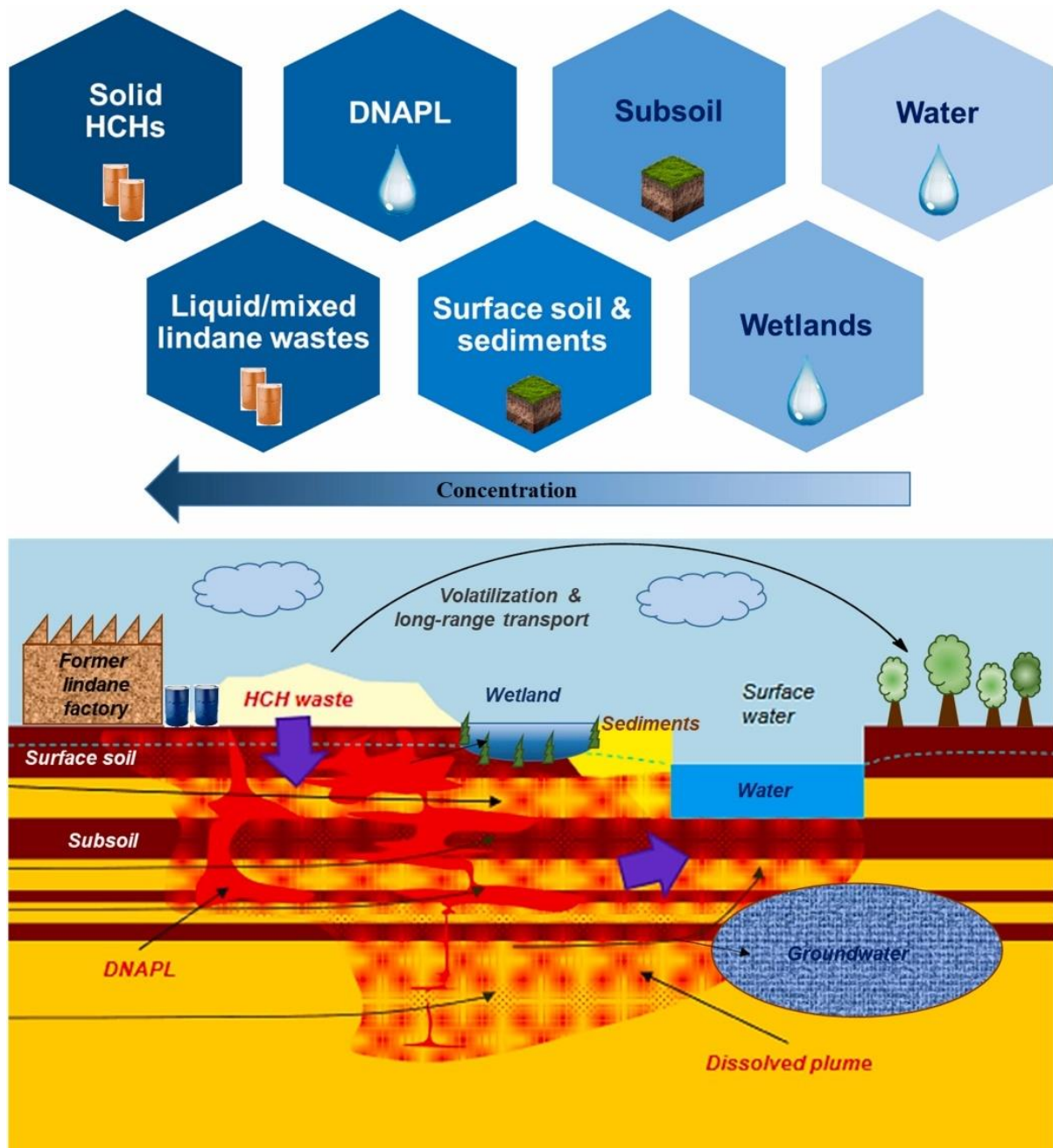


Fig. I3 Contaminación por HCH en sus distintas formas y su dispersión en aire, suelo y agua (Leal-Duaso et al., 2025).

Así pues, el HCH puede encontrarse en el medio ambiente bajo tres formas: (i) como compuesto puro, presente en residuos sin uso o en la atmósfera; (ii) adsorbido en suelos o sedimentos; o (iii) en fase líquida, ya sea como DNAPL o disuelto en aguas subterráneas (Leal-Duaso et al., 2025). Esta capacidad para distribuirse entre las fases sólida, líquida y gaseosa, explica que el HCH se haya detectado en suelos, aguas (superficiales y subterráneas) y aire en numerosas regiones del mundo (Fuscoletti et al., 2015; Lammel et al., 2007; Łozowicka et al., 2016; Ma et al., 2020), incluidos entornos remotos como el Ártico, la Antártida y zonas de alta montaña (Borghini et al., 2005; Estellano et al., 2008; Hermanson et al., 2021).

Una vez presente en el agua o la atmósfera, el HCH puede incorporarse a la cadena trófica. Su naturaleza lipofílica favorece su bioacumulación y biomagnificación, llegando a afectar a organismos superiores, incluidos los seres humanos. La bioacumulación de HCH ha sido documentada en numerosos grupos animales, desde invertebrados, peces y aves (Kolaříková et al., 2013; Nakata et al., 2005) hasta especies de áreas alejadas de los focos de emisión, como osos polares (Verreault et al., 2005), pingüinos (Corsolini et al., 2006), focas (Addison et al., 2009) y delfines (Durante et al., 2016). En humanos también se han detectado residuos, especialmente en tejidos (Chu et al., 2003), leche materna (Yu et al., 2009) y sangre (Porta et al., 2008). Entre los isómeros, el β -HCH suele ser el predominante debido a su baja reactividad metabólica y elevada capacidad de bioacumulación.

1.3.1 Dispersión en el sistema suelo-atmósfera

Los pesticidas pueden incorporarse a la atmósfera de diversas formas: a través de aerosoles generados durante su aplicación; como gas, tras su volatilización desde suelos y plantas; o bien adsorbido a las partículas en suspensión. Una vez en el aire, estos compuestos pueden transportarse a largas distancias, depositarse nuevamente sobre la superficie terrestre o acuática, o degradarse parcialmente por fotólisis.

El HCH es muy estable y resistente a la degradación, de modo que la mayor parte del compuesto es sometido a procesos de transporte atmosférico a larga distancia (El-Shahawi et al., 2010). Durante este desplazamiento, sus isómeros siguen las corrientes atmosféricas dominantes y experimentan el fenómeno de destilación global o “efecto saltamontes”, caracterizado por la volatilización en regiones cálidas de latitudes bajas, el transporte a través de la atmósfera y su condensación y acumulación en regiones frías de latitudes altas (Walker et al., 1999). Desde la atmósfera, el HCH puede regresar al medio terrestre o acuático mediante deposición seca (sedimentación de partículas contaminadas sobre el suelo o la vegetación) o deposición húmeda (incorporación a las gotas de lluvia o nieve).

Desde la inclusión del HCH en el Convenio de Estocolmo, los niveles atmosféricos globales han mostrado una tendencia general decreciente (Wöhrnschimmel et al., 2012). Aunque aún existen depósitos de HCH que actúan como fuentes primarias de emisión, en la actualidad, las fuentes secundarias (suelos y océanos) tienen una importancia similar en la emisión del contaminante (Wöhrnschimmel et al., 2012). En regiones contaminadas por HCH se ha detectado su volatilización desde los suelos contaminados (Fang et al., 2017; Qu et al., 2019; Zhu et al., 2017).

Un caso particular es el Ártico, una región que fue sumidero de HCH durante décadas debido al efecto saltamontes mencionado antes, pero que se ha transformado en fuente secundaria de este contaminante como resultado del incremento de temperatura. El calentamiento y el retroceso del hielo marino favorecen la revolatilización de α -HCH desde reservorios antiguos acumulados en el agua, el hielo y el suelo (Ma et al., 2011).

Este desequilibrio entre las fuentes primarias y secundarias, junto con la persistencia en zonas con uso histórico de HCH, ralentizan el descenso de los niveles de HCH atmosféricos (Wöhrensimmel et al., 2016). Además, se observa que α -HCH y γ -HCH disminuyen, pero β -HCH permanece estable. Es esperable que con el tiempo β -HCH sea el isómero dominante en la atmósfera (Wöhrensimmel et al., 2016, 2012). En el Ártico ya se ha observado un aumento relativo de β -HCH sobre α -HCH (Hao et al., 2021; Wöhrensimmel et al., 2016).

1.3.2 Dispersión en el sistema suelo-agua

Se han documentado numerosos casos de contaminación por HCH en aguas superficiales y subterráneas (Ara et al., 2021; Aravind Kumar et al., 2022; Han y Currell, 2017). Desde el suelo, este compuesto puede lixiviar hacia capas más profundas, alcanzando los acuíferos y contaminando pozos de agua potable, o bien transportarse por escorrentía hacia ríos, lagos y embalses. Desde las aguas continentales, el HCH puede alcanzar los océanos, donde parte del compuesto puede revolatilizarse y reincorporarse a la atmósfera, como se ha observado en el océano Pacífico (Li et al., 2020; Wu et al., 2020).

La movilidad del HCH en el medio acuático depende de sus propiedades fisicoquímicas, principalmente de su solubilidad y el coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}). A mayor solubilidad y menor K_{ow} , mayor es su tendencia a permanecer en la fase acuosa. Sin embargo, esta movilidad puede verse limitada por la adsorción en el suelo, especialmente en sistemas con alto contenido de materia orgánica o minerales de arcilla (Rodríguez-Garrido, 2009; Vega et al., 2007). En estas condiciones, el coeficiente de sorción (K_{oc}) es el indicador de la afinidad del HCH por las partículas del suelo, reflejando su potencial de retención.

Aunque las concentraciones de HCH en aguas suelen ser bajas, son ambientalmente y sanitariamente relevantes. Este compuesto se ha detectado en niveles preocupantes en aguas destinadas al consumo humano en países como España o Alemania (Adithya et al., 2021; Vega et al., 2016). Además, el compuesto puede bioacumularse en organismos acuáticos e incorporarse a la cadena alimentaria (Lukyanova et al., 2016).

1.3.3 Dispersión en el sistema suelo-planta

La vegetación desempeña un papel clave en la distribución ambiental del HCH, ya que puede actuar como sumidero, transformarlo parcialmente y, al mismo tiempo, constituir una vía de dispersión a través de la ingestión por herbívoros, la volatilización o la descomposición de biomasa. El contaminante puede incorporarse a las plantas por dos vías principales: (i) desde el suelo, mediante absorción por las raíces y translocación a los órganos aéreos, o mediante adsorción en los tejidos radiculares; y (ii) desde el aire, a través de la transferencia directa desde la fase gaseosa o por adsorción de partículas contaminadas (Calvelo Pereira et al., 2008a). La

entrada radicular depende del coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}) y en pesticidas hidrófobos ($\log K_{ow} > 3$), como el HCH, esta vía resulta limitada (Calvelo Pereira et al., 2006). En línea con ello, se ha observado mayor acumulación en la biomasa aérea que en las raíces (Calvelo Pereira et al., 2008a, 2006). No obstante, otros estudios han mostrado que la absorción radicular también puede contribuir a la entrada de HCH en la planta (Abhilash et al., 2008; Liu et al., 2022).

La absorción de los compuestos orgánicos en las hojas está condicionada por el coeficiente de partición octanol/aire (K_{oa}). Compuestos con $\log K_{oa} < 8,5$ pueden difundirse desde la fase gaseosa hasta alcanzar el equilibrio aire-hoja; para $8,5 < \log K_{oa} < 11$ la difusión es limitada, y si $\log K_{oa} > 11$ la captación se produce principalmente por deposición de partículas (Cousins y Mackay, 2001). En este contexto, α -HCH y γ -HCH presentan valores de $\log K_{oa} < 8,5$, lo que facilita su difusión foliar, mientras que β -HCH y δ -HCH muestran valores intermedios que limitan su entrada, favorecida en este caso por su carácter lipofílico y su afinidad por las ceras cuticulares.

La acumulación final en la vegetación depende no solo del mecanismo de entrada, sino también de la solubilidad, volatilidad y persistencia de cada isómero, así como de factores externos como la especie vegetal, el estado fenológico y las condiciones meteorológicas (temperatura, viento o precipitaciones). Se han descrito diferencias de acumulación entre estaciones, entre especies y según la edad de las plantas (Abhilash et al., 2008; Liu et al., 2022; Wu et al., 2019). En general, la acumulación tiende a ser isómero-selectiva, con predominio de β -HCH por su elevada estabilidad y capacidad de bioacumulación, aunque el origen de la contaminación también condiciona la distribución isomérica (Calvelo Pereira et al., 2008a).

El sistema suelo-planta constituye, además, un medio dinámico en el que las plantas no solo acumulan HCH, sino que también pueden transformarlo mediante enzimas y microorganismos endófitos, o favorecer su movilidad y biodisponibilidad en la rizosfera a través de exudados (Becerra-Castro et al., 2013b). Finalmente, la caída de hojas y restos vegetales contaminados y su descomposición reincorporan HCH al suelo, donde puede experimentar procesos físicos, químicos y biológicos dentro del ciclo del contaminante.

1.4 BIODEGRADACIÓN DEL HCH

La biodegradación constituye el principal mecanismo de atenuación natural del HCH en el medio ambiente. Esta puede ocurrir tanto en condiciones anaerobias como en condiciones aerobias. En condiciones anaerobias se identificaron bacterias degradadoras del género *Clostridium*, así como del género *Desulfovibrio*, *Desulfococcus* y una especie *Dehalobacter*. Bajo condiciones aerobias, destacan los miembros de la familia *Sphingomonadaceae*, con alrededor de 30 especies degradadoras de HCH, aunque la mayoría de los estudios se centran en las cepas *S. paucimobilis*, UT26, B90A y Sp⁺ (de las especies *Sphingobium japonicum* UT26, *Sphingobium indicum* B90A y *Sphingobium francense* Sp[†]) (Lal et al., 2010).

El proceso de degradación se asocia principalmente a enzimas codificadas por los genes Lin: linA-linC intervienen en la vía superior y linD-linJ, en la vía inferior (Lal et al., 2010) (Fig.

I4). La descloración del lindano ocurre gradualmente, comienza con una fase rápida al inicio y continúa con una fase más lenta que genera compuestos más resistentes a la degradación (Kumar et al., 2024).

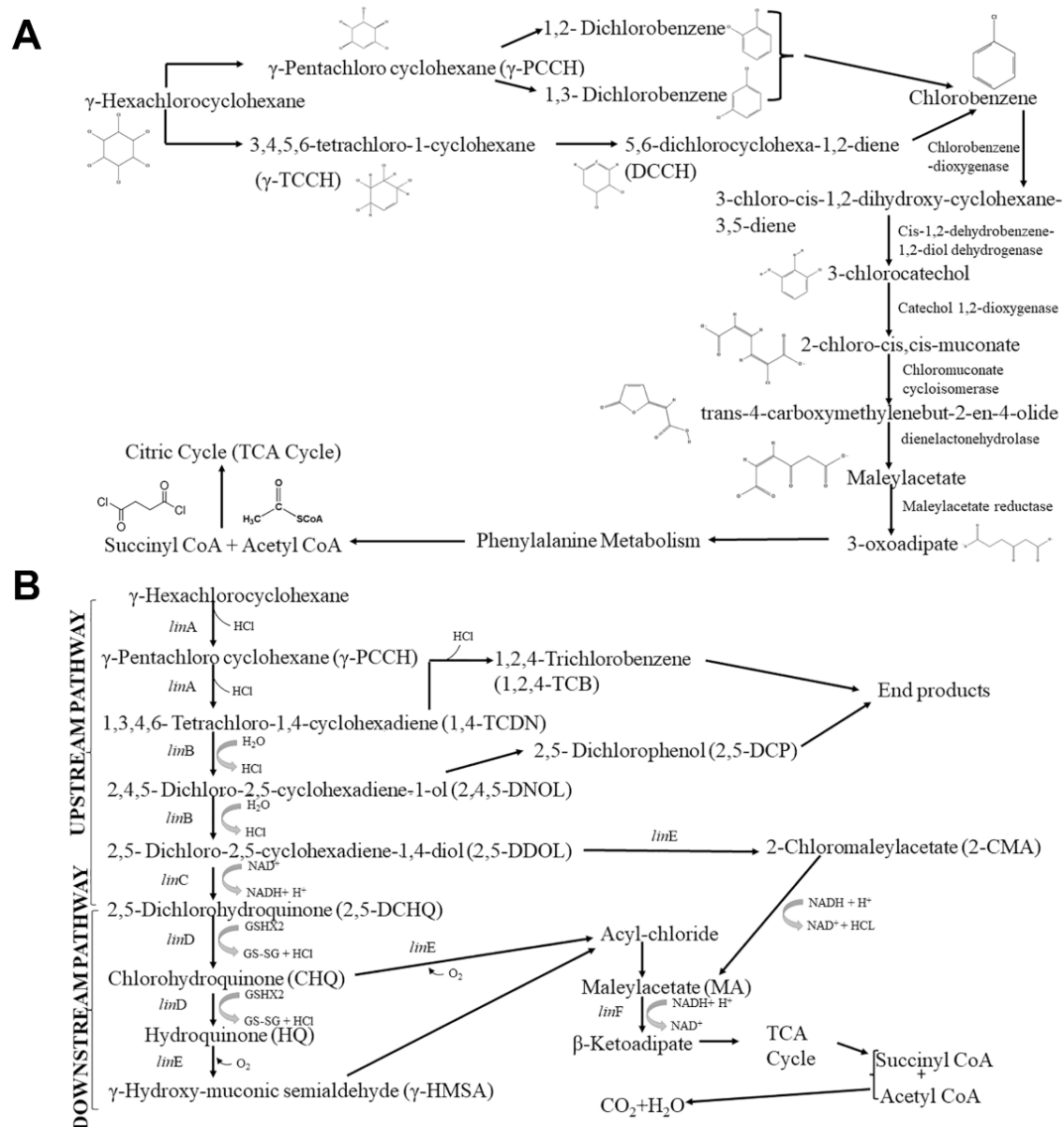


Fig. I4 Rutas de biodegradación de γ -HCH en condiciones anaerobias (A) y aerobias (B) (Roy et al., 2023).

La biodisponibilidad de los isómeros de HCH constituye el principal factor limitante de su degradación en el suelo. Los contaminantes orgánicos pueden quedar retenidos en la materia orgánica o en los minerales de arcilla, lo que reduce su accesibilidad para los microorganismos y, en consecuencia, su degradación. Estas interacciones se intensifican con el tiempo, fenómeno conocido como efecto *aging* (Alexander, 2000). La afinidad del HCH por la materia orgánica varía según el isómero, siendo β -HCH el más recalcitrante. La liberación de biosurfactantes microbianos o de exudados de raíces puede mejorar la biodisponibilidad del HCH y, en consecuencia, facilitar su degradación (Semple et al., 2007).

Aunque el HCH es muy tóxico, su presencia en el suelo puede hacer que aparezcan bacterias capaces de degradarlo. En suelos con largo historial de contaminación, el HCH moldeó las comunidades bacterianas, identificándose bacterias tolerantes al HCH, como *Sphingomonas* y *Altererythrobacter* (Balázs et al., 2021). En horizontes profundos del suelo altamente contaminados se han observado interacciones microbianas más estrechas y complejas que en el suelo superficial ligeramente contaminado (Liu et al., 2024). Además, las plantas pueden influir positivamente en el microbioma del suelo: en el suelo rizosférico hay mayor riqueza y biodiversidad microbiana que en el suelo no rizosférico (Kaur et al., 2021).

Los procesos de atenuación natural en suelos contaminados por HCH son lentos y, por sí solos, resultan ineficientes para una recuperación ambiental eficaz. Aunque las regulaciones internacionales hayan contribuido a reducir las emisiones desde fuentes primarias, aún existen numerosos depósitos de HCH sin gestionar, lo que permite que el compuesto persista en el medio ambiente y se siga dispersando entre el suelo, agua y aire. Además, el cambio climático podría intensificar esta movilidad debido al aumento de temperaturas, inundaciones, deshielos o monzones (Halvorsen et al., 2023; Ma et al., 2011; Wöhrnschimmel et al., 2016). Por todo ello, es fundamental continuar investigando técnicas de descontaminación que complementen los procesos de biodegradación, así como desarrollar alternativas eficaces, pero igualmente sostenibles.

1.5 TOXICIDAD DEL HCH Y RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA

El HCH es un compuesto altamente tóxico para los humanos y su exposición, ya sea por contacto, inhalación o ingestión, puede causar efectos adversos en la salud. Este riesgo fue especialmente significativo en las personas que trabajaron en su producción, quienes sufrieron problemas como cloracné y trastornos respiratorios (Rani et al., 2021; Vega et al., 2016), aunque también afectó a quienes estuvieron expuestos durante su uso. En 1953, un incidente relacionado con el uso doméstico del γ -HCH constituyó la primera evidencia documentada de su toxicidad, manifestándose en síntomas iniciales como cefalea, vértigo, fatiga y dolores musculares, que luego evolucionaron hacia alteraciones gastrointestinales y neurológicas; se registró un caso mortal asociado a fallo hepático y renal (Wacławek et al., 2019). En las últimas décadas, los efectos negativos del HCH para la salud humana han sido cada vez más evidentes.

La carcinogenicidad del lindano fue evaluada por primera vez por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) en 1974 en el Volumen 5 de las Monografías de la IARC, y fue incluido en la clase de los hexaclorociclohexanos como posiblemente carcinógenos para los humanos (Grupo 2B) (International Agency for Research on Cancer, 1974). Posteriormente, en los 80, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, *U.S. Environmental Protection Agency*) clasificó el HCH técnico y el α -HCH como carcinógeno B2 (carcinógeno humano probable), el β -HCH como C (carcinógeno humano posible), γ -HCH como B2/C (existen evidencias que sugieren su carcinogenicidad, pero no es suficiente como para establecer el potencial cancerígeno) y el δ -HCH como carcinógeno D (no clasificado) (Willett et al., 1998). Estudios más recientes, han asociado el β -HCH con el cáncer de pulmón, estómago, mama y próstata

(Mrema et al., 2013; Rani et al., 2021). También se ha demostrado que α -HCH induce tumores hepáticos en ratas y ratones mediante mitogénesis y no el daño directo al ADN, por lo que se considera un cancerígeno no genotóxico con un mecanismo de acción dependiente de un umbral dosis-efecto, estimado en $0,002 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en humanos (Bradley et al., 2016). Finalmente, la exposición al γ -HCH se ha vinculado con un incremento del riesgo de linfoma no Hodgkin, un tipo de cáncer que se origina en las células del sistema linfático (Vega et al., 2016).

Los isómeros de HCH también se han asociado con trastornos neurológicos, alteraciones endocrinas, disfunciones reproductivas, efectos teratogénicos y alteraciones respiratorias. En el norte de India, la exposición al β -HCH se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (Singh et al., 2013). Recientemente, se ha informado que este isómero podría activar rutas neuroinflamatorias e inducir cambios epigenéticos y alteraciones en proteínas clave para la neuroplasticidad (Grieco et al., 2024). Asimismo, se ha observado una mayor concentración de β -HCH en pacientes con Parkinson, en los que promueve la producción de especies reactivas de oxígeno en neuronas dopaminérgicas y células microgliales contribuyendo así al desarrollo de la enfermedad. La exposición a β -HCH puede aumentar hasta 4,4 veces el riesgo de desarrollar Parkinson (Rani et al., 2021; Richardson et al., 2011). La exposición materna al α -HCH se ha vinculado positivamente con defectos del tubo neural en recién nacidos (Rani et al., 2021).

El HCH puede interferir con el sistema hormonal de los organismos al actuar como disruptor endocrino, y los efectos resultantes varían según el tipo de isómero. El β -HCH puede inducir respuestas similares a las del estrógeno, la hormona sexual femenina. Esto puede causar feminización en animales, como en algunos peces y mamíferos, alterando características sexuales y el comportamiento reproductivo (Willett et al., 1998). Por otro lado, el γ -HCH afecta al desarrollo del sistema reproductor femenino (Maranghi et al., 2007). La exposición prenatal al β -HCH puede transferirse de la madre al feto afectando negativamente el sistema hormonal del recién nacido (Li et al., 2014). En el caso del γ -HCH, la exposición prenatal también afecta la producción de espermatozoides en ratones machos, aunque estos efectos son en su mayoría reversibles y no alteran permanentemente la estructura del espermatozoide (Traina, 2003).

1.6 CONTAMINACIÓN HISTÓRICA POR HCH EN EUROPA

En Europa se usaron aproximadamente 382.000 t de HCH técnico y 280.000 t de lindano (Breivik et al., 1999; Vijgen, 2006). De los países europeos, Checoslovaquia (actualmente la República Checa y Eslovaquia), Alemania, Italia, Francia y Hungría fueron los cinco con mayor consumo de lindano (Vijgen, 2006).

Algunos casos destacados de contaminación por HCH incluyen Hamburgo (Alemania), en donde 5.780 t de residuos se depositaron en Georgswerder, uno de los vertederos más grandes de Europa, actualmente encapsulado (Vega et al., 2016); la cuenca del río Elba (Alemania y República Checa), afectada por cuatro plantas de producción de lindano (Bitterfeld, Magdeburgo, Hamburgo y Spolana), donde se registró un fuerte aumento de HCH en peces tras las inundaciones de 2002 (Vega et al., 2016; Weber et al., 2025); y Colleferro (Italia), cerca del

río Sacco, donde se detectó HCH en pozos de agua, leche y carne (Fuscoletti et al., 2015; Vega et al., 2016).

España ocupa el sexto lugar de consumo de HCH dentro del continente europeo. Las áreas históricamente afectadas están en Aragón, País Vasco y Galicia. En Aragón la contaminación afecta al área de Sabiñánigo, con más de 150.000 t de HCH acumuladas y los vertederos de Sardas y Bailín, con alrededor de 900.000 m³ de suelos contaminados (Leal-Duaso et al., 2025). También se detectaron residuos en forma de DNAPL y una pluma de contaminación en aguas subterráneas cerca del río Gállego (Fernández et al., 2013). En el País Vasco se generaron entre 500.000 y 1.000.000 t de residuos, que fueron gestionados en los años 90 mediante la construcción de dos vertederos y la primera planta de Descloración Catalizada por Bases (BCD, *Base Catalyzed Dechlorination*) (Vijgen et al., 2019). La contaminación en Galicia se describe detalladamente en la sección 1.7.

A finales de los años 70, la antigua Comunidad Económica Europea desarrolló un marco jurídico para restringir y eliminar el HCH. La Directiva 79/117/CEE (1978) (Consejo de las Comunidades Europeas, 1978) prohibió la comercialización del HCH técnico; más tarde, la Directiva 91/414/CEE (1991) (Consejo de las Comunidades Europeas, 1991) estableció un sistema armonizado de autorización de fitosanitarios, en el que el lindano fue finalmente excluido en el año 2000. La Directiva 98/8/CE (1998) (Consejo de las Comunidades Europeas, 1998) reguló los usos no agrícolas (biocidas), donde también quedó prohibido. Posteriormente, el Reglamento (CE) 850/2004, actualmente sustituido por el Reglamento (UE) 2019/1021 (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2019), trasladó al marco comunitario las decisiones del Convenio de Estocolmo, incorporando al HCH entre los contaminantes orgánicos persistentes a eliminar. De forma paralela, el Reglamento (CE) 396/2005 (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2005) fijó los límites máximos de residuos en alimentos y piensos, incluyendo al HCH (Calvelo Pereira et al., 2008b; Leal-Duaso et al., 2025; Vijgen et al., 2022).

Desde la introducción de las regulaciones, en Europa se llevaron a cabo labores de reciclaje de HCH en las plantas de fabricación. Asimismo, se realizaron varios intentos de inventariar las zonas europeas afectadas: inicialmente, antes del Convenio de Estocolmo, por la Asociación Internacional de HCH y Pesticidas (IHPA, *International HCH & Pesticides Association*) (Vijgen, 2006), y posteriormente por el Parlamento Europeo, que elaboró un documento de investigación sobre los sitios contaminados y las técnicas de remediación (Vega et al., 2016). Este documento fue actualizado y plasmado en un mapa dentro del proyecto europeo *HCH in EU* en el que participaron la IHPA y varios países europeos (Fig. 15; Vijgen et al., 2022). En algunos de los sitios afectados se gestionaron los residuos y suelos contaminados a nivel nacional, como ocurrió en Países Bajos, España o Francia (Vijgen et al., 2019).

Por otra parte, se han impulsado varios proyectos para abordar la contaminación histórica por HCH desde la colaboración y cooperación de los países europeos. El proyecto LIFE DISCOVERED (2013-2017) sobre la aplicación *in situ* de una técnica de oxidación química de DNAPL en el acuífero de Bailín (Sabiñanigo, Huesca). Esta técnica (ISCO, *In Situ Chemical*

Oxidation) alcanzó la degradación > 90 % de residuos de HCH y otros metabolitos intermediarios a escala piloto. El proyecto LIFE SURFING (2019–2023) continúa la línea de trabajo anterior combinando técnicas de oxidación química con la acción de surfactantes (SISCO, *Surfactant In Situ Chemical Oxidation*; <http://www.lifesurfing.eu/en/life-surfing-project>). En el proyecto HCH in EU (2020–2021) se elaboró un inventario del legado de lindano en Europa, con 299 sitios potencialmente afectados por HCH identificados (Fig. 15) y una estrategia de gestión a escala europea; también elaboraron informes para inventariar y remediar seis regiones afectadas (Aragón, Galicia, Alsacia, Sajonia-Anhalt, República Checa y Valle del Sacco). Por último, el proyecto EU LINDANET (2019-2023) forma una red de cooperación europea de regiones afectadas por HCH (Aragón, Galicia, Bohemia Meridional, Sajonia-Anhalt, Silesia y Lacio) (<https://www.interregeurope.eu/lindanet/>) (Vijgen et al., 2022).

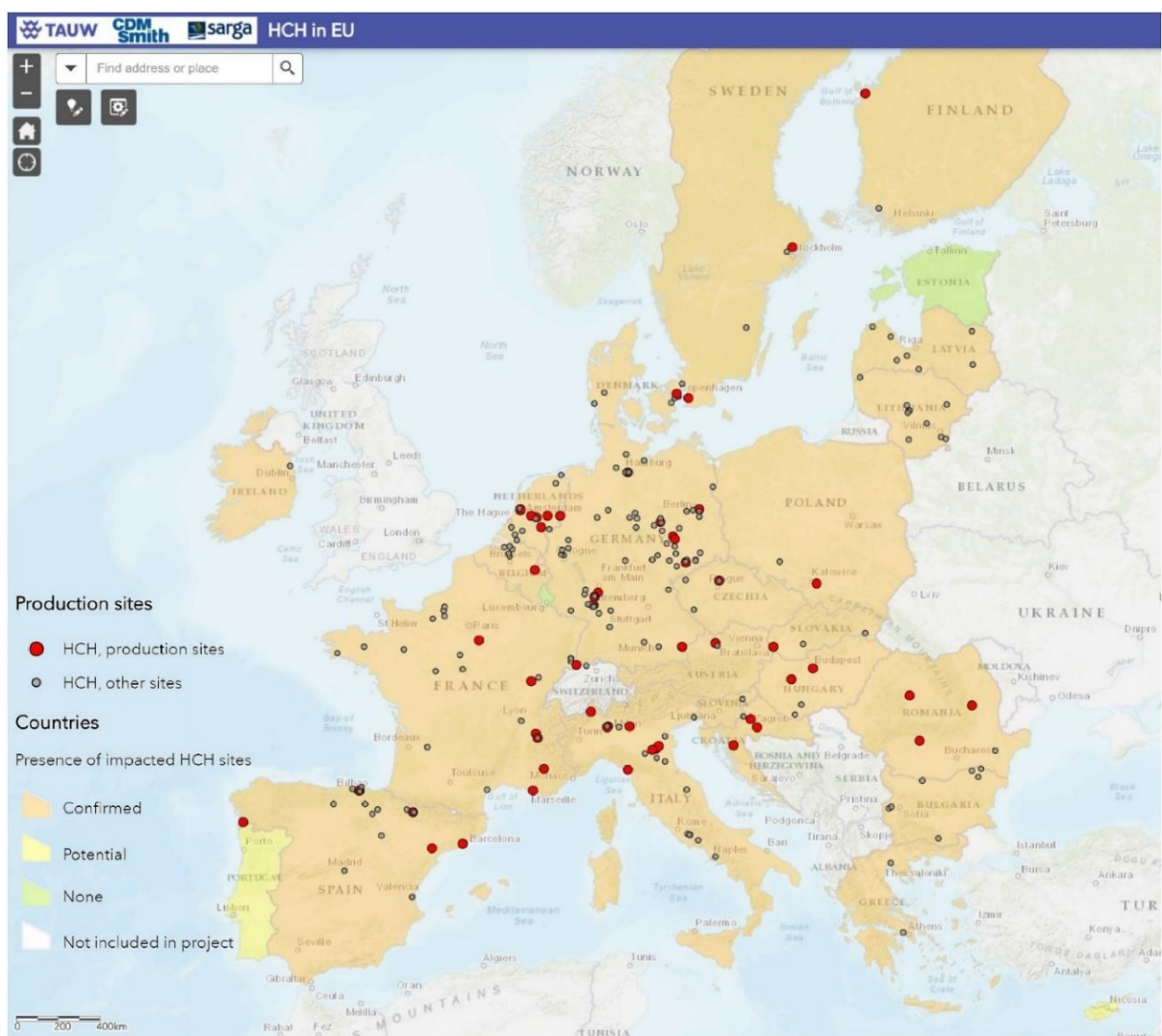


Fig. 15 Mapa de los sitios afectados por HCH en la Unión Europea identificados en el proyecto *HCH in EU*, que contabiliza un total de 299 emplazamientos (Vijgen et al., 2022).

1.7 CONTAMINACIÓN HISTÓRICA POR HCH EN GALICIA

En Galicia, la producción de lindano se inició en 1947 por la empresa Zeltia S.A., ubicada en O Porriño (SO Pontevedra). Durante las décadas de 1950 y 1960, la empresa Zeltia S.A. se expandió mediante alianzas con grandes empresas y creó filiales especializadas, como Xylazel, que también utilizó HCH en productos para el tratamiento de la madera. En años posteriores, la empresa se reestructuró y se interrumpió la síntesis de lindano. Se crearon nuevas empresas, Zelnova Zeltia y Syngenta Agro S.A., que heredaron parte de las instalaciones originales. A pesar del fin de la producción de lindano, la contaminación medioambiental provocada por casi dos décadas de actividad dejó un impacto histórico en la zona (Calvelo Pereira et al., 2008b)

El principal vertedero de residuos de HCH se encontraba en un terreno municipal que anteriormente se había utilizado para la extracción de áridos. Más tarde, este terreno se usó como vertedero municipal y, finalmente, se urbanizó sin tomar las precauciones adecuadas considerando que en la zona había residuos tóxicos de HCH. Debido a las propiedades hidrófugas de este compuesto es posible que los materiales contaminados se reutilizaran para la construcción contribuyendo así a su dispersión (Calvelo Pereira, R. et al., 2008; Crespo González et al., 2001).

En 1997, la Xunta de Galicia publicó el Inventario de Suelos Potencialmente Contaminados, en el que se alertaba de la presencia de HCH en los suelos de O Porriño. Un año después, España aprobó la Ley 10/1998 sobre Residuos, que regulaba la gestión de residuos y los suelos contaminados. En este contexto, la Xunta encargó una investigación detallada de las zonas afectadas y, en 1999, la empresa de ingeniería EPTISA realizó un estudio en el Polígono de Torneiros, donde se localizaba el principal vertedero. Este trabajo incluyó una evaluación de riesgos que condujo al establecimiento de límites legales para las concentraciones de HCH: 2 mg kg⁻¹ en suelos y 1 µg L⁻¹ en aguas subterráneas, formalizados en el Decreto 263/1999 (DOGA, 1999).

En el estudio de EPTISA delimitaron cuatro parcelas con posible presencia de residuos de HCH (PV1-PV4), incluido el vertedero (PV1), así como las dos antiguas plantas industriales (EMP1 y EMP2) (Varela-Castejón y Martínez-Lozano, 2008). Los resultados indicaron que PV2 no presentaba contaminación; que en PV3 se detectaron concentraciones de cientos de µg L⁻¹ de isómeros de HCH en aguas subterráneas que motivaron la clausura de pozos; y que en PV4 había trazas de HCH por debajo de los límites legales, salvo en una parcela con relleno superficial. PV1 (160.000 m²) se identificó como la principal fuente de contaminación, con concentraciones de hasta 1 g kg⁻¹ en la superficie que disminuían progresivamente en profundidad hasta los 6 m. Asimismo, el análisis de aguas de pozos y manantiales mostró niveles superiores a 1 µg L⁻¹ y, en algunos casos, por encima de 50 µg L⁻¹ (Calvelo Pereira et al., 2008b; Crespo González et al., 2001).

Tras estas investigaciones, la parcela PV1 se dividió en dos zonas: una altamente contaminada (30.000 m² de superficie) y otra con concentraciones por debajo del umbral legal. La zona altamente contaminada se confinó *in situ* en una celda de seguridad, mientras que la zona con bajas concentraciones de HCH se excavó y se sustituyó por suelo limpio. La celda de

seguridad se construyó utilizando una barrera perimetral de cemento-bentonita y un sellado superficial multicapa, y posteriormente se integró en el entorno urbano mediante la instalación de un parque infantil y pistas deportivas (Varela-Castejón et al., 2008). Las imágenes aéreas documentan la transformación de esta zona (Fig. I6).

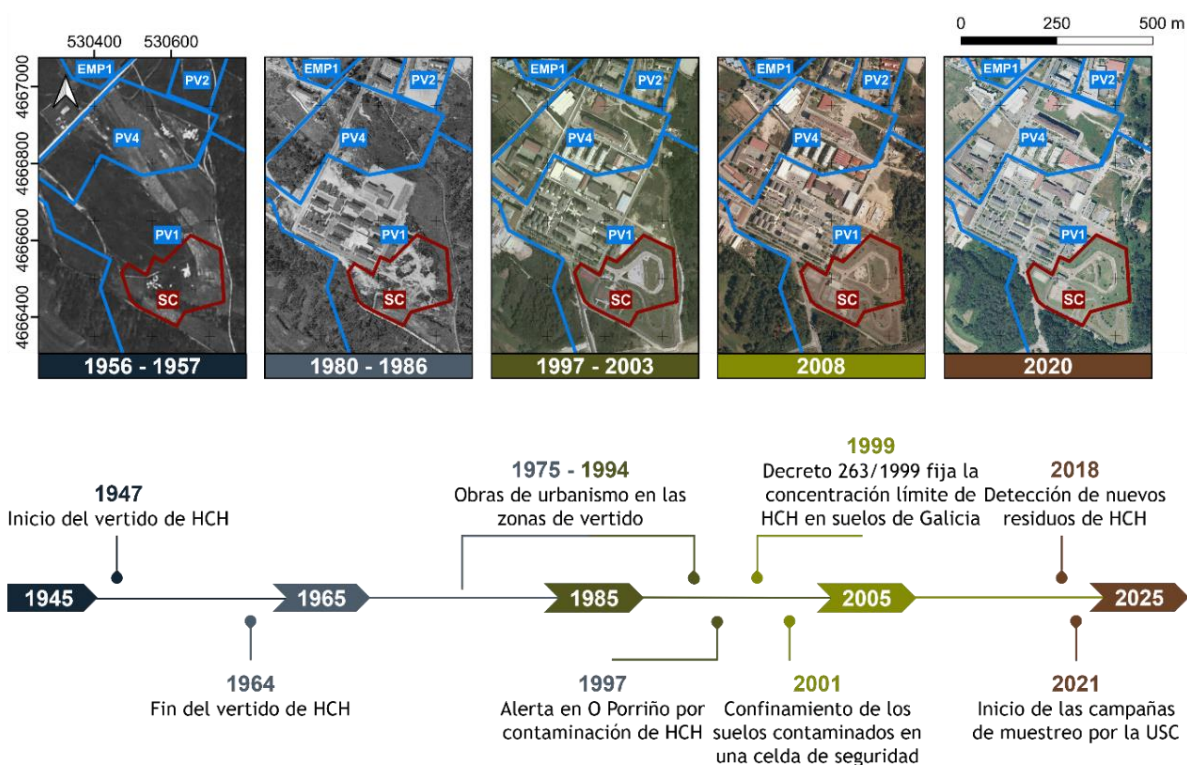


Fig. I6 Evolución del impacto del lindano en O Porriño (SO Pontevedra, Galicia) y modificaciones de la principal zona afectada. PV1, PV2 y PV4 son emplazamientos estudiados por la presencia probable de HCH y SC es la celda de confinamiento de suelos contaminados ($> 2 \text{ mg kg}^{-1}$, Decreto 263/1999). Imágenes aéreas del Instituto Geográfico Nacional (<https://www.cnig.es/home>).

La biodegradación *in situ* fue considerada la técnica más adecuada para tratar suelos con bajas concentraciones de HCH, siguiendo los principios BATNEEC (*Best Available Technique Not Entailing Excessive Cost*) (Crespo González et al., 2001). Por ello, la Xunta de Galicia impulsó proyectos de investigación en colaboración con grupos de las universidades gallegas y el CSIC. Los resultados se publicaron en la revista *Edafología* (Revista de la Sociedad Española de Ciencias del Suelo, vol. 15, núm. 1-3), así como en diversas publicaciones científicas y tesis doctorales (Becerra-Castro, 2012; Calvelo Pereira, 2008; Chaves Padín, 2017; Concha-Graña, 2004; Quintero Díaz, 2004; Rodríguez-Garrido, 2009). En conjunto, estos trabajos aportaron conocimientos relevantes sobre el comportamiento ambiental del HCH y su dinámica en el sistema suelo-aire-agua y establecieron las bases para el desarrollo de técnicas de descontaminación basadas en procesos biológicos.

La investigación sobre suelos agrícolas de Galicia estableció los niveles de fondo de HCH, detectando concentraciones medias de 200 ng g^{-1} y máximas de hasta 2.300 ng g^{-1} , siendo A Coruña la provincia más afectada (Calvelo Pereira et al., 2010b). Los isómeros α - y β - fueron

los predominantes y el cociente α -HCH/ γ -HCH permitió identificar diferentes fuentes de contaminación: residuos del uso histórico de HCH técnico y su sustitución por lindano, aplicaciones exclusivas de lindano y áreas afectadas por procesos de volatilización, transporte y deposición de α -HCH.

En los estudios realizados en una parcela de PV4 en O Porriño se midieron concentraciones que superaban los límites de intervención en suelo superficial (hasta 353 mg kg⁻¹) y se observaron residuos visibles de HCH en horizontes profundos del suelo (Rodríguez-Garrido, 2009). El predominio de α - y β -HCH confirmó el origen de la contaminación en los residuos de producción de lindano. Los ensayos de lixiviación evidenciaron el riesgo de transferencia a otros compartimentos ambientales y la materia orgánica del suelo se identificó como el principal factor de retención del HCH, determinando su movilidad y biodisponibilidad.

Los estudios en PV4 sobre el comportamiento del HCH en el sistema suelo-planta revelaron que diferentes especies vegetales podían acumular HCH, destacando la retama (*Cytisus striatus* (Hill) Rothm.) por su elevada capacidad de acumulación (Calvelo Pereira et al., 2006). El efecto rizosférico contribuyó a reducir las concentraciones de HCH en el suelo circundante, un proceso estimulado por la acción de los exudados radicales, que favorecen la desorción y biodisponibilidad del contaminante (Rodríguez-Garrido et al., 2020). La acumulación fue mayor en la biomasa aérea que en las raíces, debido a procesos de volatilización y deposición; esta acumulación resultó ser isómero-selectiva en favor de β -HCH. Ensayos de fitotoxicidad indicaron que el HCH afectaba al crecimiento temprano de las plantas y generaba respuestas de estrés, aunque algunas especies como *Hordeum vulgare* L., *Brassica* sp. y *Phaseolus vulgaris* L. mostraron mayor tolerancia y potencial para aplicaciones de fitorremediación (Calvelo Pereira et al., 2010a). Además, Becerra-Castro et al. aislaron y caracterizaron una gran variedad de bacterias asociadas a *Cytisus striatus* desarrolladas de forma natural en la parcela contaminada de PV4, que después cultivaron para su aplicación en estrategias de fitorremediación (Becerra-Castro et al., 2013b, 2013a, 2011).

En paralelo, se evaluaron estrategias de biorremediación, incluyendo el uso de lodos anaerobios y hongos ligninolíticos (Quintero et al., 2007) y el *landfarming*, que resultó ser efectivo en suelos con concentraciones superiores a 5.000 mg kg⁻¹ de HCH (Rubinos et al., 2007). También se investigó la deshalogenación reductiva del HCH en presencia de vitamina B12 y agentes reductores en medio acuoso, logrando la eliminación completa del contaminante mediante titanio(III)citrato; la eficacia disminuyó en suelos con alto contenido de materia orgánica, pero se mantuvo en suelos arenosos (Rodríguez-Garrido et al., 2010, 2004).

Tras estas investigaciones y el confinamiento del suelo contaminado en PV1, se consideró que el problema estaba resuelto. Sin embargo, en 2018 se descubrieron nuevos residuos de HCH durante unas obras públicas en O Contrasto, al noroeste de O Porriño. Esto motivó el inicio de nuevas investigaciones sobre sitios contaminados aún no identificados, en el contexto de las cuales se desarrolla uno de los trabajos de esta tesis. Además, recientemente se ha citado la presencia de lindano en suelos y aguas de Galicia (Chaves y Monterroso, 2023).

1.8 MONITORIZACIÓN AMBIENTAL DE HCH

Debido a la amplia dispersión del HCH y a los riesgos que este contaminante plantea tanto para el medio ambiente como para la salud humana, resulta imprescindible su monitorización en los distintos compartimentos ambientales (suelo, agua, aire y biota). La monitorización ambiental desempeña varias funciones: preventiva, al facilitar la detección de contaminaciones incipientes; informativa, al aportar conocimiento sobre el comportamiento y evolución espacio-temporal de los contaminantes en el medio; y estratégica, al orientar la selección de medidas de descontaminación.

En la Unión Europea, no existe aún una directiva específica que regule la monitorización del HCH en suelos, por lo que carece de criterios homogéneos y de valores de referencia comunes (Vijgen et al., 2022). La regulación en materia de gestión, protección y remediación del suelo estaba dispersa en diferentes marcos normativos, y cada Estado miembro establecía sus propios valores de referencia. En el ámbito científico, diversos estudios han confirmado la persistencia del HCH en suelos en distintos países europeos (Francia: Orton et al., 2013; Italia: Qu et al., 2016; Europa Meridional y Central: Růžicková et al., 2008).

No obstante, el marco regulatorio europeo está evolucionando. En 2023 la Comisión Europea presentó una propuesta de Directiva sobre la vigilancia y la resiliencia del suelo y, en 2025, el Consejo y el Parlamento alcanzaron un acuerdo provisional para su aprobación, que dará lugar a la futura “Ley de Vigilancia del Suelo”. Esta iniciativa se integra en la Estrategia de la UE para la Protección del Suelo, lanzada en 2021 dentro del Pacto Verde Europeo, con el objetivo de lograr suelos sanos en 2030. En paralelo, el programa Horizonte Europa 2021–2027 ha priorizado la salud del suelo y los sistemas alimentarios, impulsando la creación del Observatorio del Suelo de la Unión Europea (EUSO), encargado de desarrollar un sistema comunitario de vigilancia. Entre sus principales acciones está la ampliación de la encuesta LUCAS (*Land Use/Cover Area frame Statistical Survey*), que tradicionalmente evaluaba parámetros físico-químicos y que, desde 2015, incluye módulos sobre biología edáfica y pesticidas en suelos (Orgiazzi et al., 2022). Tras un piloto con 20.000 muestras (Silva et al., 2019, 2018), estos módulos se integraron oficialmente en 2018, encontrándose residuos de fitosanitarios en el 74,5 % de los suelos agrícolas, con frecuencia como mezclas de varias sustancias (Vieira et al., 2023). En 2022 el muestreo se incrementó a 41.000 emplazamientos, cuyos resultados aún no se han publicado. El HCH está entre los pesticidas objetivo en el módulo LUCAS Pesticidas del Suelo y ha sido detectado en todas las campañas realizadas (Silva et al., 2019; Vieira et al., 2023).

La monitorización del HCH en aguas se regula en la Directiva Marco del Agua 2000/60/CE (Consejo de las Comunidades Europeas, 2000), posteriormente modificada por la Directiva 2013/39/EU, cuyo objetivo es garantizar el buen estado de las aguas en la Unión Europea. En este marco, el HCH es una sustancia prioritaria con límites establecidos en aguas continentales de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ como concentración media anual, y de $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$, como concentración máxima admisible (Vega et al., 2016). En lo que respecta al aire, su seguimiento se lleva a cabo a través del Programa EMEP (*European Monitoring and Evaluation Programme*;

<https://www.emep.int/>), integrado en el convenio sobre la contaminación atmosférica transfronteriza a larga distancia (Tørseth et al., 2012; Vijgen et al., 2022). Sin embargo, los resultados disponibles en aire y agua son insuficientes para establecer tendencias globales, lo que hace necesario implementar programas de monitorización con mayor resolución espacial (Halvorsen et al., 2023; Wöhrnschimmel et al., 2016). El muestreo atmosférico presenta además limitaciones técnicas y económicas, ya que los muestreadores activos, basados en bombeo eléctrico, resultan costosos. En este contexto, es habitual el uso de muestreadores pasivos, generalmente de espuma de poliuretano (PUF, *Polyurethane Foam*), para la monitorización del HCH en aire (De La Torre et al., 2018; Zhu et al., 2017).

La vegetación también puede utilizarse como muestreador pasivo, constituyendo una herramienta útil para la evaluación de la contaminación ambiental con mayor resolución espacial (Pacín et al., 2023). Es una alternativa económica y sencilla que no solo informa sobre la presencia y dispersión de contaminantes, sino también de su biodisponibilidad. En la biomonitorización es fundamental seleccionar un biomonitor adecuado, que esté ampliamente distribuido, sea accesible y muestre tolerancia a la contaminación (Debén et al., 2017). El pino es el tipo de árbol más utilizado en la monitorización de contaminantes orgánicos lipofílicos, como el HCH, debido a su elevado contenido lipídico (Holoubek et al., 2000; Klánová et al., 2009; Kylin and Sjödin, 2003). Sin embargo, además del contenido lipídico, otros factores influyen en la capacidad de acumulación de la vegetación, como la morfología y estructura de la hoja, superficie foliar específica, las características del contaminante y las condiciones meteorológicas (Abhilash et al., 2008; De Nicola et al., 2011). El uso de especies arbóreas perennes y caducifolias en la monitorización de contaminantes orgánicos persistentes ha sido objeto de debate (De Nicola et al., 2017). A pesar de que el pino (perenne) tiene una exposición continua y mayor contenido lipídico, el carballo (caducifolio) tiene una mayor área foliar específica, rugosidad y presencia de tricomas y ceras que favorecen la deposición y retención de contaminantes en la fase particulada.

Se han utilizado múltiples árboles, especies herbáceas, líquenes y musgos para evaluar la presencia del HCH en el medio, mediante el análisis de hojas, tallos, ramas, corteza, raíces o frutos (Abhilash et al., 2008; Battisti et al., 2017; Calvelo Pereira et al., 2006; Hernández et al., 2024; Liu et al., 2022; Tarcau et al., 2013; Wu et al., 2019; Zhu et al., 2017). En general, la acumulación del HCH es mayor en la biomasa aérea, como consecuencia de la volatilización del contaminante desde el suelo y posterior deposición en las hojas y tallos. Asimismo, la dendroquímica, mediante el análisis de anillos de crecimiento, ha permitido estudiar la contaminación histórica (Hernández et al., 2025b; Liu et al., 2023). En conjunto, la vegetación ha contribuido a detectar HCH en zonas remotas (Borghini et al., 2005), a monitorizar este contaminante en zonas históricamente afectadas (Hernández et al., 2025b), investigar su dinámica en el sistema suelo-aire-planta (Calvelo Pereira et al., 2006), y a aportar información valiosa para el desarrollo de técnicas de fitorremediación (Becerra-Castro et al., 2013a).

1.8.1 Biomonitorización con musgos

Los musgos, ampliamente distribuidos y con alta tolerancia a diversos contaminantes, han sido utilizados en biomonitorización ambiental. Se han utilizado musgos autóctonos para la biomonitorización de metales pesados, con más de 369 estudios documentados (Boquete et al., 2017), y, en menor medida, para COPs, principalmente hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*), así como organoclorados, dioxinas y furanos (Harmens et al., 2013), aunque en este último caso se han publicado solo unas pocas decenas de estudios. Los estudios que han considerado el HCH todavía son más limitados (Borghini et al., 2005; Holoubek et al., 2000; Lim et al., 2006; Tarcau et al., 2013; Zhu et al., 2015).

Para lograr la resolución espacial necesaria en la monitorización de COPs conviene utilizar una biomonitorización activa mediante musgos trasplantados (conocidos como *moss-bags*); para más detalles sobre esta técnica y su estandarización, véase Ares et al. (2012). El uso de musgos trasplantados permite alcanzar la densidad de muestreo requerida y también seleccionar los sitios de monitorización adecuados, lo que proporciona mediciones más precisas con una resolución espacial más alta de lo que sería posible utilizando técnicas convencionales (Pacín et al., 2023).

Por otro lado, la relación entre la concentración de COPs en la atmósfera y en los musgos solo se ha estudiado utilizando musgos trasplantados, concretamente para los PAHs con resultados muy satisfactorios (Aboal et al., 2020). Hasta la fecha, los musgos trasplantados rara vez se han utilizado para la biomonitorización de COPs (4 veces para PAHs y una vez para bifenilos policlorados o PCBs, hasta 2012 (Ares et al., 2012); con muy pocas adiciones desde entonces y nunca antes para la monitorización de HCH).

En la última década se han realizado grandes esfuerzos para estandarizar la biomonitorización activa con musgos, incluida la producción de clones de algunas especies (Ares et al., 2012; Beike et al., 2015; Capozzi et al., 2016). Sin embargo, estos esfuerzos se aplican principalmente a la monitorización de metales pesados, para lo cual se han recomendado diferentes especies. Se propuso *Sphagnum palustre* L. para la biomonitorización activa de la contaminación atmosférica (Ares et al., 2012), y se produjo un clon bajo condiciones estandarizadas de laboratorio (Beike et al., 2015). *Fontinalis antipyretica* Hedw. se recomendó para la biomonitorización activa de la contaminación del agua (Debén et al., 2017) y, posteriormente, también se recomendó el clon correspondiente (Debén et al., 2019). Además, aunque el proceso de acumulación de metales pesados por parte de los musgos ha sido ampliamente estudiado (García-Seoane et al., 2023; González et al., 2016; González y Pokrovsky, 2014; Varela et al., 2023), el proceso de acumulación de COPs en los musgos sigue siendo desconocido. Solo se ha realizado un estudio teórico general (Harmens et al., 2013) y algunos estudios parciales, por ejemplo, sobre el fenantreno (Keyte et al., 2009; Spagnuolo et al., 2017). A pesar de que la composición lipídica es un factor clave en la retención de contaminantes en sus formas acuosas o volátiles, su influencia en la capacidad de carga de los musgos ha recibido escasa o nula atención. Esta falta de conocimiento sobre los mecanismos de acumulación ha limitado la selección informada de especies de musgos adecuadas para el

biomonitorización de COPs. En este contexto se enmarca uno de los estudios desarrollados en la presente tesis.

1.9 ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO Y DESCONTAMINACIÓN DE SUELOS CON HCH

El tratamiento de suelos contaminados puede llevarse a cabo mediante tecnologías de contención, separación o destrucción. Estas se fundamentan en procesos de distinta naturaleza: procesos físicos, cuando se recurre a principios de la física para separar el contaminante de la matriz; procesos químicos, cuando la eliminación o transformación del contaminante se logra mediante reacciones químicas; o procesos biológicos, cuando se emplean organismos vivos para su degradación. La aplicación de estas tecnologías puede realizarse *in situ* (sin excavación ni traslado del suelo), *on site* (con excavación, pero sin traslado) o *ex situ* (con excavación y traslado). La selección del tratamiento más adecuado depende de factores como el tipo de contaminación (local o difusa), la concentración de contaminantes, el uso previsto del terreno y la viabilidad económica (Morillo y Villaverde, 2017).

El uso de tecnologías de separación es necesario cuando la contaminación es elevada, no puede ser contenida, coexisten otros contaminantes o predomina un isómero cuya separación y aprovechamiento resulta interesante (Leal-Duaso et al., 2025). El bombeo y tratamiento (*pump-and-treat*) se basa en la separación mediante la extracción sólido-líquido por medio de una solución con afinidad por el contaminante. Posteriormente, la solución contaminada se recupera y puede someterse a procesos de regeneración para su reutilización. Este método puede aplicarse tanto *ex situ* (*soil washing*), mediante la excavación y lavado del suelo en instalaciones especializadas, como *in situ* (*soil flushing*), a través de la inyección de la solución en el terreno y su posterior extracción. La segunda opción resulta generalmente menos costosa e invasiva. Esta extracción puede hacerse mediante disolventes orgánicos, con alta afinidad por el HCH, surfactantes, o ciclodextrinas. En los surfactantes y las ciclodextrinas, el contaminante hidrófobo queda atrapado dentro de las micelas formadas por los surfactantes o en la cavidad de las ciclodextrinas en medio acuoso, facilitando su solubilización y eliminación. Los disolventes orgánicos son más agresivos, mientras que las ciclodextrinas y biosurfactantes (surfactantes generados por microorganismos) son más respetuosos con el medio ambiente (Morillo y Villaverde, 2017).

La evolución de las estrategias de tratamiento de suelos con HCH refleja una transición desde enfoques centrados en la contención y el tratamiento térmico, predominantes en las décadas de 1980 y 1990, hacia métodos más avanzados y ambientalmente sostenibles en la actualidad.

La incineración se utilizó tradicionalmente en el tratamiento de pesticidas obsoletos, residuos de producción y suelos altamente contaminados. No obstante, la incineración de compuestos organoclorados presenta limitaciones técnicas y económicas y requiere un estricto control de emisiones, ya que puede generar subproductos tóxicos como dioxinas y furanos (Leal-Duaso et al., 2025; Vega et al., 2016). Esta práctica fue utilizada en los años 90 en países como la República Checa y en Francia, y también más recientemente en España, Alemania o

China, (Crespo González et al., 2001; Vega et al., 2016; Vijgen et al., 2011). Aunque es muy efectiva para eliminar HCH en muestras altamente contaminadas de cualquier tipo de matriz, implica una alta producción de CO₂, un impacto social negativo y costes elevados (con una inversión inicial de 120-150 millones de euros) (Leal-Duaso et al., 2025). Además, el traslado de material contaminado para su incineración puede suponer un riesgo de contaminación por emisión de polvo contaminado con HCH, como ocurrió en la frontera entre Francia y Suiza en 2013, donde se detectaron residuos del compuesto en leche materna y de vaca tras el traslado de residuos (Vega et al., 2016; Vijgen et al., 2022).

A finales de la década de 1990, con el progresivo descenso en la producción de lindano, muchas fábricas optaron por transformarlo en triclorobenceno (TCB) mediante deshidrocloración térmica, un proceso en el que se eliminan simultáneamente átomos de cloro e hidrógeno. Posteriormente, el TCB se convertía en tetraclorobenceno, que era clorado adicionalmente para producir 2,4,5-T, un plaguicida hoy en desuso (Vijgen, 2006). Con el tiempo, se investigaron alternativas más eficientes, como la deshidrocloración a baja temperatura y en condiciones de bajo oxígeno, patentada como el proceso Hagenmeier (Leal-Duaso et al., 2025). Sin embargo, la formación de dioxinas continuó siendo un desafío significativo. También se exploraron procesos catalíticos utilizando metales o materiales carbonosos, recogidos en diversas patentes, pero estos métodos requieren temperaturas elevadas similares a las del tratamiento térmico convencional (Leal-Duaso et al., 2025).

La alternativa más efectiva resultó ser la deshidrocloración en medio básico, conocida como Descloración Catalizada por Bases (BCD, *Base-Catalyzed Dechlorination*). En este proceso, la base no actúa como catalizador, sino como inductor que neutraliza el HCl formado durante la reacción. Esta neutralización hace que la reacción sea exotérmica, permitiendo que se lleve a cabo en condiciones suaves, sin necesidad de altas temperaturas. La EPA desarrolló y patentó esta técnica utilizando NaOH como base (Vega et al., 2016), y fue implementada en el País Vasco en la primera planta de BCD del mundo destinada al tratamiento de residuos de lindano. Esta planta operó entre 1999 y 2001, eliminando 3.211 t de residuo a una temperatura de 150 °C, mediante su transformación a TCB, cloruro de sodio y agua (Vega et al., 2016; Vijgen et al., 2019). El TCB obtenido fue exportado a India, mientras que la sal se reutilizó en la producción de salmuera; por cada kilogramo de lindano se recuperaron aproximadamente 625 g de TCB y 300 g de salmuera. Posteriormente, esta tecnología también se aplicó en la República Checa para el tratamiento de 35.000 t de residuos (Vega et al., 2016).

En zonas vinculadas a la producción, manipulación, almacenamiento y eliminación de pesticidas, donde las concentraciones de contaminantes eran muy elevadas y requería una intervención urgente, los tratamientos de contención han sido la opción más común, debido a su mayor seguridad y menor coste (Morillo y Villaverde, 2017). Entre las medidas más utilizadas se encuentran: la cobertura con materiales inertes, el sellado superficial mediante barreras de baja permeabilidad o completamente impermeables, la excavación y disposición en vertederos autorizados, o el encapsulamiento del material contaminado en celdas de seguridad con barreras impermeables en la base, laterales y superficie. Estas medidas se han utilizado en emplazamientos de producción de lindano, como en Colleferro (Italia), donde se almacenaron

de forma permanente 58.000 m³ de suelo contaminado y se sellaron *in situ* 3.500 m³ de suelo altamente contaminado. En Hamburgo (Alemania) se instaló un sistema de contención con un muro de 46 metros de profundidad sellado con asfalto y complementado con un sistema de bombeo para tratar el agua contaminada. Más recientemente, en 2016, se aprobó en Eslovaquia un proyecto de encapsulamiento de suelo contaminado con HCH (Vega et al., 2016; Vijgen et al., 2019). Aunque la contención evita la dispersión de los contaminantes, no los elimina, tal como exige el Convenio de Estocolmo; además, los materiales utilizados tienen una vida útil limitada y pueden requerir intervenciones definitivas posteriores, como ocurrió en Sabiñánigo (Aragón) (Hernández et al., 2024).

Otra alternativa para inmovilizar los contaminantes en el suelo es la aplicación de enmiendas edáficas (*e.g.* materiales encalantes, biosólidos, compost, biocarbones...). La inmovilización es potenciada por la modificación de las propiedades químicas del suelo, el incremento de porosidad y superficies de adsorción, la complejación, entre otros mecanismos. Aunque estas estrategias no aseguran la descontaminación, pueden suponer una gestión económicamente viable para reducir el riesgo de contaminación de aguas y favorecer el establecimiento de una cubierta vegetal. Son particularmente adecuadas para el tratamiento de zonas contaminadas de gran extensión, en las que la protección de los recursos hídricos es prioritaria.

En los años 90 y 2000 aumentaron las investigaciones sobre la transformación y/o degradación del HCH basadas en reacciones de reducción u oxidación química. La reducción implica la transferencia de electrones desde un agente reductor al HCH y la oxidación, la transferencia de electrones del HCH a un agente oxidante. La Destrucción Mediada por Cobre (CMD, *Copper-Mediated Destruction*) y la reducción con hierro cero-valente (ZVI, *Zero-Valent Iron*) por ejemplo, son técnicas reductivas que pueden eliminar el HCH. La CMD fue desarrollada y patentada en los 2000 y posteriormente aplicada en la República Checa y Polonia (Leal-Duaso et al., 2025). Por su parte, el ZVI, especialmente en forma de nanopartículas (nZVI), degrada el HCH por un mecanismo de β -eliminación, donde el hierro dona electrones a la molécula y elimina los átomos de cloro (Leal-Duaso et al., 2025). Actualmente existen tecnologías comerciales que utilizan ZVI como FeroxSM (*ARS Technologies*) o RNIP (*Reactive Nano-Scale Iron Particles*), ambos probados con éxito en suelos del vertedero de Sardas en Sabiñánigo (Aragón) (Leal-Duaso et al., 2025).

En la oxidación química de HCH se emplean generalmente Procesos de Oxidación Avanzada (AOPs, *Advanced Oxidation Processes*) que generan radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) a partir de distintos mecanismos químicos, fotocatalíticos o electroquímicos. Estos radicales son especies altamente reactivas, capaces de descomponer la mayoría de los contaminantes orgánicos en CO₂ y H₂O (Leal-Duaso et al., 2025). Las investigaciones sobre AOPs en suelos contaminados con HCH son recientes y todavía se encuentran en fase preliminar. Los resultados obtenidos fueron especialmente prometedores cuando se aplicaron en combinación con otras tecnologías. Por ejemplo, la integración del *soil washing* con surfactantes seguida de la oxidación electroquímica (Muñoz-Morales et al., 2017) o la combinación de procesos electrocinéticos con oxidación Fenton (Ni et al., 2018).

En las últimas décadas, las investigaciones se han orientado hacia el desarrollo de tecnologías más eficientes, limpias y preferentemente aplicables *in situ*. En este sentido, las AOPs están adquiriendo una creciente relevancia, junto con las técnicas basadas en procesos biológicos.

El uso de organismos vivos en remediación de suelos puede ser mediante microorganismos degradadores del contaminante o plantas, que pueden acumular, transformar o facilitar la biodegradación del contaminante. Estas técnicas se pueden aplicar *in situ*, son económicas y respetuosas con el medio ambiente, pero además están aceptadas socialmente y son definitivas. Diversas investigaciones demuestran el potencial de estas técnicas para la remediación de suelos contaminados por HCH, aunque la mayoría de trabajos son a escala de laboratorio y se necesitan más trabajos a escala de campo.

La biodegradación (degradación por bacterias) del HCH es posible, tanto en condiciones anaerobias como aerobias. Por ejemplo, Quintero et al. demostró la viabilidad de la degradación anaerobia del HCH en un biorreactor, primero en sistemas líquidos y de suelo tipo *slurry* (Quintero et al., 2005a), y después en un biorreactor con suelo tipo *slurry* en condiciones cercanas a escala real (Quintero et al., 2006). Para la biodegradación *on site* del HCH se suele emplear bioestimulación, que se basa en establecer condiciones favorables para el crecimiento de las poblaciones bacterianas nativas, o bioaumentación, que se basa en inocular cepas degradadoras en el suelo. Por ejemplo, el *landfarming*, basado en la mezcla del suelo contaminado con nutrientes y enmiendas y en su aireación periódica, estimula la biodegradación de HCH (Rubinos et al., 2007). Por otro lado, la biodisponibilidad del HCH suele ser un factor limitante en su biodegradación, por eso también se ha investigado la aplicación de exudados de raíz (Rodríguez-Garrido et al., 2020), bioemulsificadores (Álvarez et al., 2022) o surfactantes (Manickam et al., 2012; Quintero et al., 2005b) con resultados prometedores.

La vegetación y sus organismos asociados también pueden estimular la mitigación de la contaminación por HCH en los suelos mediante procesos de fitorremediación. Por ejemplo, (Calvelo Pereira et al., 2008a) demostraron una reducción de la concentración de HCH en el entorno de la raíz de distintas especies desarrolladas en suelos contaminados, lo que apuntaba a una disipación del contaminante inducida por la actividad rizosférica (rizodegradación). Otra línea de trabajo interesante es la del grupo de P. Kidd. Primero, Kidd et al. (2008) identificaron *Cytisus striatus* como una especie con alto potencial para la fitoestimulación de bacterias degradadoras presentes o inoculadas en el suelo. Posteriormente, Becerra-Castro et al. (2011) aislaron e identificaron bacterias endófitas y rizosféricas de *C. Striatus* con características promotoras del crecimiento vegetal y capacidad para degradar el HCH. Finalmente Becerra-Castro et al. (2013b) inocularon *C. Striatus* con dos cepas bacterianas (*Rhodococcus*, productora de biosurfactantes, y *Sphingomonas*, degradadora de HCH) y observaron que ambas cepas protegían a *C. Striatus* de los efectos fitotóxicos del HCH y favorecían la disipación del HCH en la rizosfera.

Si la concentración del HCH es muy elevada, la efectividad de las técnicas basadas en procesos biológicos puede verse limitada y es preferible optar por otro tipo de técnicas. En estos

casos, estas técnicas siguen siendo útiles para optimizar o finalizar proyectos de remediación (Leal-Duaso et al., 2025).

En resumen, se ha investigado una gran variedad de técnicas de remediación de suelos contaminados con HCH, desde opciones tradicionales como el tratamiento térmico o contención *in situ* hasta tratamientos químicos avanzados y biorremediación. No obstante, la selección de la técnica más adecuada depende de múltiples factores, como la extensión de la contaminación, la naturaleza y concentración de HCH, la presencia de otros contaminantes, la matriz afectada, así como consideraciones sociales y económicas. La investigación en este campo continúa avanzando intensamente, con un enfoque dirigido hacia el desarrollo de tecnologías limpias, sostenibles e *in situ*.

En este contexto, en la presente tesis se investigaron estrategias orientadas a modificar la movilidad y biodisponibilidad del HCH en suelos contaminados mediante la aplicación de compuestos con actividad surfactante o enmiendas edáficas y, adicionalmente, se evaluó la oxidación electroquímica del HCH.

1.9.1 Movilización con surfactantes

Los surfactantes son moléculas anfifílicas capaces de formar micelas en soluciones acuosas (Fig. 17). Estas estructuras pueden encapsular contaminantes hidrofóbicos, como el HCH, aumentando su solubilidad en agua y facilitando su tratamiento tras la lixiviación. Tanto los surfactantes sintéticos como los biosurfactantes han demostrado eficacia en la solubilización de contaminantes orgánicos hidrofóbicos (Das et al., 2008; Szulc et al., 2014).

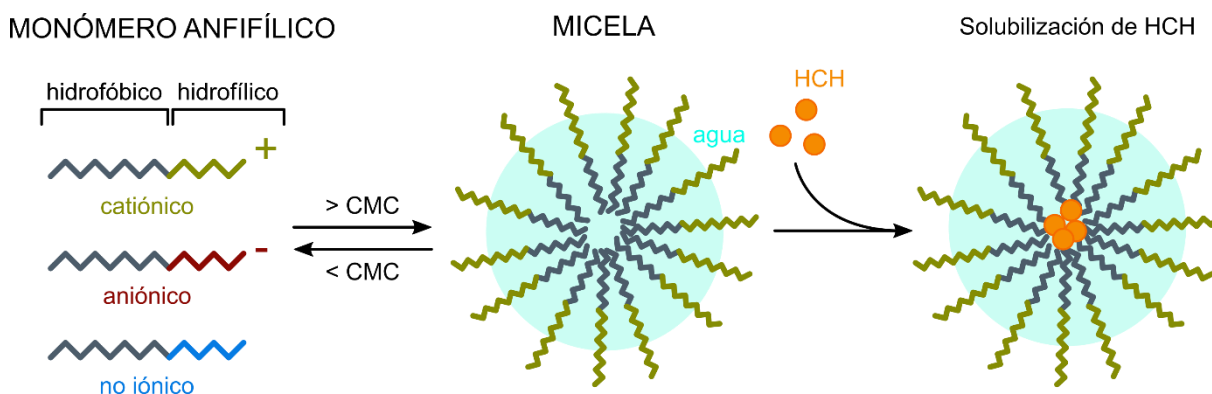


Fig. 17 Autoempaquetamiento en micelas de los compuestos con actividad surfactante en medio acuoso, cuando se encuentran por encima de su concentración micelar crítica (CMC), y solubilización de HCH.

Además de los compuestos convencionales, en los últimos años se han introducido los líquidos iónicos con actividad surfactante (SAILs, *Surface-Active Ionic Liquids*). Estos presentan características atractivas, como bajo punto de fusión ($< 100\text{ }^{\circ}\text{C}$), fuerte micelización, baja volatilidad, menor riesgo de inflamabilidad y gran versatilidad (Pillai et al., 2018). Su atributo más atractivo es la posibilidad de ajustar los aniones y cationes que forman los SAILs para preparar compuestos específicos de tarea (Cheng et al., 2014).

La eficacia de un surfactante depende de la naturaleza del contaminante y de la estructura química del propio surfactante (Patist et al., 2001). Se ha demostrado que los surfactantes catiónicos, aniónicos y no iónicos poseen distintas capacidades de solubilización (Paria, 2008). Otros autores también han explorado la influencia de la longitud de la cadena alquílica y el contraíón (en el caso de los surfactantes iónicos) en la eficacia de los surfactantes (Mulligan et al., 2001; Wang et al., 2008). Un parámetro útil para caracterizarlos es el equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB): valores altos (> 9) indican afinidad por el agua y tendencia a formar emulsiones de aceite en agua, siendo el HLB requerido dependiente del tipo de aceite o contaminante (Leermakers et al., 2005). Sin embargo, la determinación del HLB en los SAILs sigue siendo un tema poco desarrollado.

En la selección de un surfactante para aplicaciones de remediación deben considerarse aspectos como su adsorción en el suelo, biodegradabilidad, toxicidad y coste. En general, los surfactantes no iónicos suelen ser preferidos en sistemas simples (Paria, 2008). Recientemente, se han estudiado sistemas mixtos de surfactantes por su potencial para disminuir la adsorción de surfactantes, reducir la concentración micelar crítica (CMC) y mejorar la capacidad de solubilización de los compuestos individuales (Sales et al., 2011).

La mayoría de las investigaciones con surfactantes en remediación se ha centrado en PAHs y DNAPLs (Rongsayamanont et al., 2020; Saeedi et al., 2019). Los estudios específicos sobre HCH son todavía escasos y combinan diferentes técnicas como *soil washing* y biodegradación u oxidación electroquímica (Manickam et al., 2012; Muñoz-Morales et al., 2017; Quintero et al., 2005b; Zheng et al., 2012). Además, las investigaciones sobre la solubilización diferencial de isómeros (no exclusivamente de HCH) son limitadas (Andreaus et al., 1997; Eda et al., 1997) y la capacidad potencial de los SAILs para solubilizar HCH todavía no se ha explorado.

En este contexto es esencial investigar cómo diferentes compuestos con actividad surfactante, surfactantes convencionales y SAILs, influyen en la solubilidad aparente de distintos isómeros de HCH para aplicaciones de remediación.

1.9.2 Inmovilización con enmiendas edáficas

En el suelo, el HCH puede dispersarse a la atmósfera o al agua e incorporarse en la cadena trófica, lo que representa un riesgo para los ecosistemas y la salud humana. Los principales componentes del suelo que afectan a la adsorción de los pesticidas orgánicos son las arcillas, los oxi-hidróxidos de hierro y manganeso y, especialmente, la materia orgánica (García-Delgado et al., 2020). La adsorción del HCH y otros pesticidas condiciona procesos clave como la lixiviación, la biodegradación, la volatilización y la biodisponibilidad, así como su ecotoxicidad sobre organismos no objetivo, incluidos los seres humanos (García-Delgado et al., 2023).

La aplicación de enmiendas orgánicas puede reducir la movilidad de los pesticidas y simultáneamente mejorar la calidad del suelo. Las enmiendas orgánicas generalmente son materiales ricos en carbono, derivados de la descomposición biológica (*e.g.* compost, estiércol) o de la transformación térmica de biomasa (*e.g.* biocarbones por pirólisis). Su incorporación al

suelo contribuye al crecimiento vegetal y a la mejora de la salud del ecosistema edáfico, aumentando la disponibilidad de nutrientes, la capacidad de retención de agua y la estabilidad estructural del suelo. Además, favorecen el secuestro de carbono contribuyendo a la mitigación del cambio climático (Rombolà et al., 2022). En suelos contaminados con pesticidas, las enmiendas también pueden retener estos compuestos, influir en su biodegradación y reducir su transferencia a otros compartimentos ambientales (Cabrera et al., 2014; Morillo y Villaverde, 2017). Los biocarbones, en particular, pueden adicionalmente activar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generando especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) capaces de oxidar contaminantes orgánicos (Fang et al., 2014). En áreas extensas afectadas por contaminación difusa de baja intensidad, el uso de enmiendas orgánicas puede ser una estrategia viable y rentable para minimizar la movilidad, biodisponibilidad y toxicidad de pesticidas en el medio.

La capacidad de adsorción de las enmiendas orgánicas depende tanto de la cantidad de pesticida presente como de sus propiedades fisicoquímicas, especialmente su persistencia, solubilidad y volatilización (Khalid et al., 2020). Este proceso está determinado por los mecanismos de interacción (interacciones π - π , fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, hidrofobicidad e interacciones polares) que se establecen entre los grupos funcionales del contaminante y los de la materia orgánica de las enmiendas (Sadegh-Zadeh et al., 2017). La naturaleza y el contenido del carbono orgánico son factores determinantes en la capacidad de adsorción de las enmiendas orgánicas (García-Delgado et al., 2020). En el caso de los biocarbones, el origen de la biomasa y la temperatura de pirólisis, influyen en el tamaño de poro, el pH, el área superficial, el contenido de carbono y los grupos funcionales superficiales, propiedades que en conjunto determinan su interacción con los pesticidas y su eficacia de adsorción (Khalid et al., 2020).

El uso de enmiendas orgánicas puede integrarse en estrategias con plantas y microorganismos degradadores para optimizar la remediación de suelos contaminados (Xiang et al., 2022). Tripathi et al. (2019) propusieron un enfoque de remediación secuencial e integrada en 6 etapas: 1) Tratamiento con enmiendas y bioestimulación; 2-3) Remediación química y microbiológica; 4-6) Fitorremediación con herbáceas, arbustos y árboles. No obstante, la introducción de enmiendas orgánicas debe evaluarse cuidadosamente, ya que algunas pueden introducir compuestos xenobióticos al suelo (aspecto sujeto a regulación legal) y su eficacia a largo plazo debe comprobarse en condiciones de campo, debido a la posibilidad de pérdidas, redistribución o transformación (Khalid et al., 2020).

Las enmiendas inorgánicas, derivadas de la combustión de biomasa, son ricas en minerales, pero no en carbono, y se utilizan generalmente para mejorar la fertilidad del suelo e influir en las propiedades químicas del suelo, ya que aportan nutrientes y elevan el pH. Estas características pueden favorecer la inmovilización de metales pesados (Ondrasek et al., 2021; Yang et al., 2023).

Además de la movilización por solubilización/lixiviación, el HCH es relativamente volátil y una fracción puede ser transferida del suelo a la atmósfera, favoreciendo su absorción por la

vegetación y/o su transporte a larga distancia. Sin embargo, tanto el riesgo de volatilización, como su atenuación, son aspectos a los que se ha prestado escasa atención.

En resumen, la aplicación de enmiendas edáficas ofrece un enorme potencial para bloquear la transferencia de HCH de suelos contaminados a distintos compartimentos ambientales (aguas, aire y vegetación, principalmente), al tiempo que mejora las propiedades del suelo. Sin embargo, existe una gran variedad de enmiendas, derivadas de distintas materias primas y tipo/condiciones de procesamiento, por lo que es necesario evaluar y seleccionar las más adecuadas en cada caso. En este sentido, el conocimiento básico sobre el comportamiento de distintas enmiendas y su aplicación sostenible a suelos contaminados con HCH es claramente insuficiente. Adicionalmente, hasta donde sabemos, no se ha intentado aplicar esta estrategia para reducir simultáneamente la lixiviación y volatilización de compuestos orgánicos persistentes.

1.9.3 Oxidación electroquímica

Los procesos electroquímicos de oxidación avanzada (EAOP, *Electrochemical Advanced Oxidation Processes*) se consideran una tecnología prometedora para la remediación de contaminantes orgánicos persistentes, ya que son limpios, no requieren reactivos químicos adicionales y son escalables. Dentro de estas técnicas, la oxidación anódica (AO, *Anodic Oxidation*) destaca por su sencillez y estabilidad en comparación con otros métodos como el Fenton, la ozonización o los procesos fotoquímicos. Su funcionamiento se basa en la oxidación directa de contaminantes en la superficie del ánodo mediante transferencia de electrones, o indirectamente, por la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante la electrólisis del agua. Además, iones presentes de forma natural en el agua pueden originar oxidantes secundarios que amplían la degradación más allá de la superficie del electrodo (Moreira et al., 2017; Rodrigo et al., 2014).

La aplicación de EAOPs en sistemas contaminados por isómeros de HCH es muy reciente, pero con resultados satisfactorios. Por ejemplo, en pruebas con aguas subterráneas, el proceso electro-Fenton alcanzó hasta un 90 % de mineralización de α -, β - y δ -HCH tras 4 h de electrólisis a $16,7 \text{ mA cm}^{-2}$ (Domínguez et al., 2018a, 2018b). Las investigaciones sobre AO todavía se encuentran en una fase más preliminar. Los mejores resultados de AO se lograron en agua sintética con γ -HCH utilizando ánodos de diamante dopado con boro (BDD, *Boron-doped diamond*) combinados con cátodos de fieltro de carbono. En condiciones optimizadas ($8,3 \text{ mA cm}^{-2}$), se alcanzó una conversión total del γ -HCH en 10 min, y la mineralización completa se produjo en 4 h (Domínguez et al., 2018c). El proceso de degradación del γ -HCH se describió como una descloración e hidroxilación inicial con formación de compuestos intermedios como clorociclohexenos, clorobencenos y clorofenoles, seguidos de su transformación en ácidos carboxílicos simples y finalmente su mineralización en CO_2 y H_2O (Fig. I8; Domínguez et al., 2018c). También se probó la eliminación completa de 26 compuestos organoclorados, incluidos isómeros de HCH, en aguas subterráneas saturadas de DNAPL utilizando ánodos de óxido metálico mixto a 50 mA cm^{-2} durante 300 min (Herraiz-Carboné et al., 2024b). Resultados similares fueron obtenidos con ánodos de BDD con densidades de corriente superiores a 25 mA

cm⁻² (Herraiz-Carboné et al., 2024a). Los BDD también se utilizaron exitosamente en el tratamiento de un surfactante empleado en la extracción de lindano de emulsiones de suelo, logrando su eliminación completa en menos de 7 h (Muñoz-Morales et al., 2017).

En resumen, el uso de AO para tratar el lindano y el HCH está en fase inicial, pero los estudios recientes destacan su gran potencial. Es fundamental comprender el comportamiento específico de degradación de cada isómero de HCH y cómo los diferentes parámetros operativos afectan al proceso, especialmente porque difieren en estructura y comportamiento químico. Factores como la concentración inicial de contaminantes, el tipo y la concentración del electrolito, la densidad de corriente y el pH pueden influir en el resultado del tratamiento, por lo que es esencial determinar los mejores parámetros operativos antes de una aplicación en suelos contaminados reales.

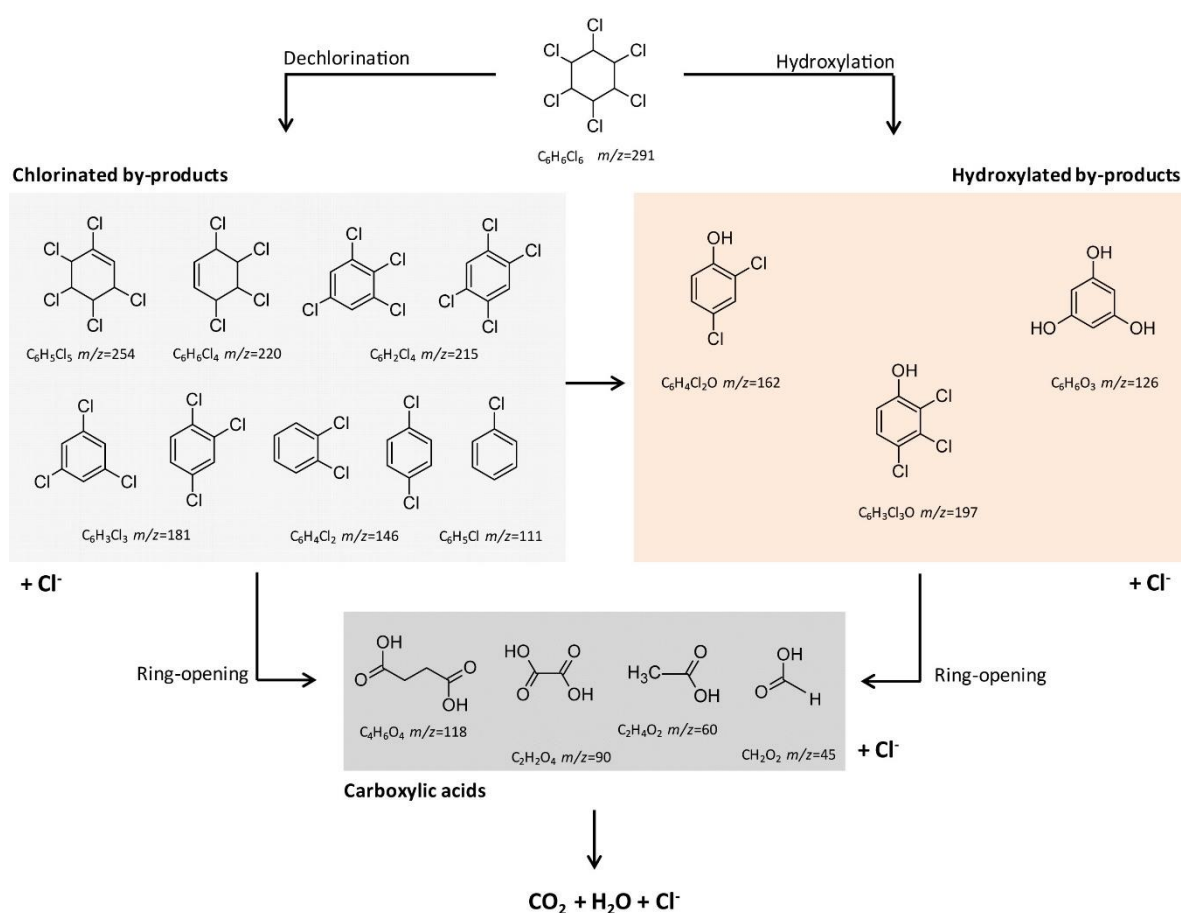


Fig. 18 Ruta de degradación de lindano (γ -HCH) mediante oxidación electroquímica en un sistema BDD-CF (ánodo de diamante dopado con boro -BDD- y fieltro de carbono -CF-), según la propuesta de Domínguez et al. (2018c).

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La contaminación por hexaclorociclohexano (HCH) representa un problema ambiental de gran relevancia a escala global. Este compuesto es tóxico, persistente, se dispersa ampliamente entre compartimentos ambientales (aire, agua y suelo) y tiene una elevada capacidad de bioacumulación, lo que implica riesgos significativos para la salud humana y los ecosistemas. En este contexto, resulta esencial monitorizar su presencia con el fin de identificar focos de contaminación, evaluar su distribución espacial y evolución temporal, y diseñar estrategias de remediación eficaces y adaptadas a las características específicas de cada entorno. Asimismo, es prioritario avanzar en el desarrollo de tecnologías de descontaminación que sean sostenibles, eficientes y económicamente viables.

La presente tesis tiene como objetivo general profundizar en la monitorización ambiental del HCH, con especial énfasis en el uso de biomonitores, y contribuir al diseño y evaluación de estrategias de descontaminación. Para ello se plantean cinco hipótesis, cada una abordada por estudios específicos.

Hipótesis:

1. El HCH persiste en el medio durante largos períodos de tiempo y su distribución en suelo y vegetación permite analizar su dispersión espacio-temporal.
2. Los musgos son capaces de retener HCH y pueden emplearse como biomonitores, con variaciones según la especie, sus características histoquímicas y el medio de exposición.
3. La solubilidad acuosa del HCH aumenta en presencia de surfactantes convencionales y líquidos iónicos, pudiendo haber efectos sinérgicos.
4. Las enmiendas edáficas modifican las propiedades del suelo mitigando la lixiviación y volatilización del HCH.
5. La oxidación electroquímica es eficaz para degradar HCH en lixiviados de suelo y su eficiencia depende de los parámetros operativos.

Estudios y objetivos específicos:

i) Monitorización ambiental de HCH en O Porriño

1. Evaluar el nivel actual de contaminación por HCH en O Porriño, un emplazamiento con un largo historial de contaminación, y analizar su evolución espacio-temporal mediante muestreo de hojas y suelo.

ii) Biosorción de HCH en musgos (*Biosorption of HCH in mosses, Paper 1*)

2. Evaluar la capacidad de retención de HCH en dos especies de musgo, relacionarla con sus características estructurales e histoquímicas y evaluar su potencial para la biomonitorización activa de HCH en aire y agua.

iii) Efecto de surfactantes y líquidos iónicos sobre la solubilidad de HCH (*Effect of surfactants and ionic liquids on the solubility of HCH, Paper 2*)

3. Evaluar el impacto de surfactantes convencionales y líquidos iónicos sobre la solubilidad acuosa del HCH y analizar el efecto sinérgico entre un líquido iónico catiónico y un surfactante aniónico.

iv) Efectos de enmiendas edáficas sobre la movilidad de HCH

4. Evaluar el efecto de enmiendas edáficas de distinta naturaleza sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo y su impacto sobre el riesgo de lixiviación y volatilización de HCH.

v) Oxidación electroquímica y cinética de degradación de HCH (*Electrochemical oxidation and degradation kinetics of HCH*)

5. Optimizar los parámetros operativos para la oxidación electroquímica del HCH, estudiar la cinética de degradación de los distintos isómeros y validar esta metodología con lixiviados de suelos contaminados históricamente.

3 METODOLOGÍA

Para contrastar las hipótesis planteadas en esta tesis doctoral se diseñaron cinco estudios, cada uno de ellos desarrollado mediante una metodología específica que se describe a continuación. Posteriormente, se detallan los métodos de extracción y cuantificación de los isómeros de HCH en las muestras y, finalmente, los reactivos utilizados y el tratamiento estadístico de los datos experimentales.

3.1 MONITORIZACIÓN AMBIENTAL DE HCH EN O PORRIÑO

3.1.1 Área de estudio y estrategia de muestreo

Para cumplir con los objetivos del trabajo se realizaron dos tipos de muestreo de suelo y material vegetal: (i) muestreo extensivo en el área de influencia de O Porriño (SO de Pontevedra), para determinar los niveles de contaminación actuales en la zona y (ii) muestreo en detalle en PV4, un emplazamiento históricamente contaminado, para estudiar la evolución espacio-temporal de la contaminación por HCH. Los muestreos se llevaron a cabo el 24 de septiembre de 2021 y del 20 al 22 de septiembre de 2022. Adicionalmente, se realizó una campaña de muestreo el 10 de mayo de 2022 en PV4 para evaluar la variación estacional, coincidiendo con el inicio del brote de yemas foliares en los carballos.

El área de O Porriño tiene un relieve condicionado por la Depresión Meridiana, una fractura geológica que atraviesa el valle del río Louro desde O Porriño hasta Tui. La altitud media es de 39 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), aunque el entorno presenta laderas que alcanzan los 300 m.s.n.m. Las condiciones climáticas varían entre Atlántica europea, para las partes altas de la cuenca y mitad norte del valle, y Mediterránea subhúmeda con tendencia atlántica, para la mitad sur del valle, según la clasificación bioclimática de Allué Andrade (López et al., 1996). Estas condiciones favorecen una vegetación de tipo atlántico, dominada por *Quercus robur* L. y *Ulex europaeus* L., clasificadas dentro del *Rusco-Querceto roboris sigmetum* (serie 8c) (Rivas Martínez, 1987). En O Porriño se encuentran las Gándaras de Budiño, designadas como Zona Especial de Conservación (ES1140011) bajo la Directiva 92/43/CEE (Consejo de las Comunidades Europeas, 1992), que albergan hábitats protegidos, como turberas, bosques ribereños y brezales húmedos (en verde oscuro en el mapa de usos de suelo de la Fig. M1). Desde el punto de vista geológico, el sur y el este de la cuenca están compuestos principalmente por rocas ígneas (granitos y granodioritas), mientras que en el oeste predominan las rocas metamórficas (neises y paraneises, principalmente). En la zona se extrae el granito rosa de Porriño, muy valorado en la construcción (en violeta en el mapa de usos de suelo de la Fig. M1). Los sedimentos más recientes, de origen Terciario y Cuaternario, se han formado en las partes bajas del valle debido a la erosión de estas rocas. Los tipos de suelo predominantes en el área de estudio son Dystric Leptosol, Haplic Umbrisol, de carácter ácido, texturas gruesas, baja capacidad de cambio y fuerte

desaturación, alternado con Dystric Fluvisol en las áreas de rivera (IUSS Working Group WRB, 2015).

En septiembre de 2021 se realizó un muestreo sistemático en O Porriño, usando cuatro transectos lineales de 3 km que convergían en la zona más contaminada históricamente (el antiguo vertedero PV1; Fig. M1). Los puntos de muestreo se colocaron cada 250 m dentro de un radio de 1 km y cada 500 m a mayor distancia. También se añadieron puntos en lugares identificados por el informe de EPTISA (Varela-Castejón et al., 2008; Varela-Castejón y Martínez-Lozano, 2008) como fábricas de lindano y zonas potencialmente contaminadas (EMP1-2 y PV1-PV4, respectivamente), así como en zonas entre los transectos. En septiembre de 2022 se amplió el muestreo con cuatro transectos más, alcanzando un total de 76 puntos de muestreo. El diseño incluyó áreas urbanas, industriales y agrícolas posiblemente afectadas por contaminación con HCH, incluyendo O Contrasto. El área cubierta incluye parte del sur de Mos, ayuntamiento limítrofe, y en total abarcó 28 km², lo que representa el 23 % del territorio conjunto de O Porriño y Mos.

En el emplazamiento PV4, con evidencias de contaminación histórica, se registraron concentraciones en el rango de 2,0 a 19.904,6 mg kg⁻¹ de HCH en los primeros 30 cm del suelo (media de 1234,6 mg kg⁻¹) (Calvelo Pereira et al., 2008a). Con estos antecedentes, se decidió hacer un estudio detallado veinte años después. En septiembre de 2021 se realizó una primera campaña de muestreo, tomando como referencia el trabajo de (Rodríguez-Garrido, 2009). En 2022 se realizaron dos campañas más, en mayo y en septiembre, para analizar posibles variaciones estacionales. En estas últimas se utilizó un muestreo aleatorio con 16 puntos, considerando como puntos fijos aquellos donde había vegetación arbórea.

Las condiciones meteorológicas entre campañas fueron las siguientes: entre mayo y septiembre de 2021, la temperatura media fue de $18,2 \pm 2$ °C, la humedad relativa media del $84,6 \pm 2,9$ % y la precipitación media fue de 66 ± 52 L m⁻²; en 2022, la temperatura media fue $19,9 \pm 2,4$ °C, la humedad relativa media, $85,2 \pm 5,3$ % y la precipitación media fue $48,9 \pm 44,7$ L m⁻².

Todos los puntos de muestreo fueron georreferenciados mediante la aplicación Qfield (OPENGIS.ch) en un *smartphone* con GPS para la representación y evaluación de la distribución espacial del HCH.

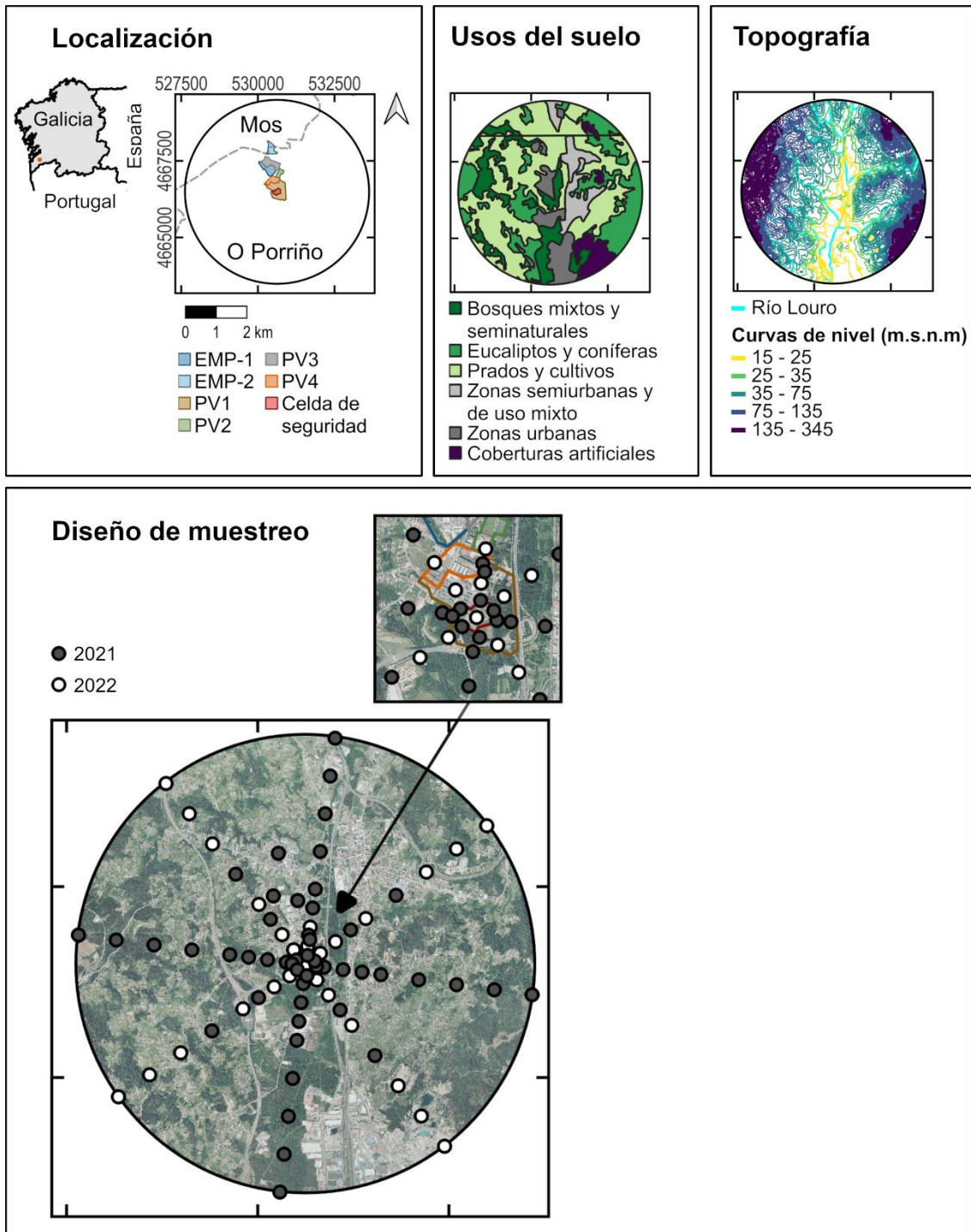


Fig. M1 Localización del área de estudio en O Porriño (Galicia, NO España). Mapa de usos del suelo (Mapa de Usos y Coberturas del Suelo 2000 de la Xunta de Galicia - CC-BY- modificado), mapa de curvas de nivel (Base Topográfica 2020 de la Xunta de Galicia -CC-BY- modificado) y diseño de muestreo.

3.1.2 Recogida de muestras de suelo y material vegetal

En cada punto de muestreo se recogió suelo manualmente a una profundidad de 0-20 cm, siguiendo el criterio empleado en los análisis del proyecto LUCAS (Silva et al., 2019). Cada muestra estaba compuesta de cuatro submuestras recogidas dentro de un área de 2 × 2 m. El muestreo extensivo se hizo en septiembre de 2021 y se completó en septiembre de 2022.

En el muestreo extensivo también se recogieron hojas de carballo (*Quercus robur* L.) en septiembre de 2021, el cual se repitió y completó en septiembre de 2022, coincidiendo con el final del ciclo anual de crecimiento de la hoja. Esta especie se seleccionó como biomonitor por su amplia distribución en la zona, su accesibilidad y su carácter caducifolio. Las hojas se cogieron de ramas situadas a 2 metros de altura, orientadas hacia PV1.

El muestreo detallado en el emplazamiento PV4 se llevó a cabo en tres campañas: septiembre de 2021, mayo de 2022 y septiembre de 2022. La recogida de muestras de suelo se hizo siguiendo el mismo procedimiento que en el muestreo extensivo.

La cobertura vegetal de PV4 estaba dominada por especies herbáceas, con la presencia puntual de cuatro carballos y un pino (*Pinus pinaster* Aiton.). Las hojas de carballo se recogieron en las tres campañas siguiendo el mismo protocolo que en el muestreo extensivo. En mayo y septiembre de 2022, las hojas se muestrearon en cuatro direcciones cardinales respecto a PV1 (32° NE, 120° SE, 210° SO, 300° NO) para evaluar el posible efecto del viento dominante. También se recolectaron acículas del pino, diferenciadas por año de crecimiento (de 1 a 4 años).

En mayo de 2022 se recogió hojarasca en un área de 2 x 2 m con el objetivo de evaluar su influencia en el ciclo de HCH entre el suelo y la vegetación. Esta hojarasca estaba compuesta principalmente por restos de gramíneas y helechos, hojas de carballo y acículas de pino.

Todas las muestras fueron almacenadas en bolsas de plástico por separado y transportadas al laboratorio el mismo día de su recolección. Las muestras vegetales se conservaron a 5 °C, mientras que las muestras de suelo se secaron al aire, se tamizaron a 2 mm y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis de HCH.

El HCH se extrajo y analizó mediante metodologías diferenciadas según el tipo de muestra. Las muestras de suelo se procesaron mediante extracción con líquidos presurizados (sección 3.6.1) y posterior análisis en GC-MS/MS trampa de iones (sección 3.7.1). El material vegetal se sometió a una extracción asistida por ultrasonidos en acetato de etilo (sección 3.6.2) y posterior análisis en GC-MS/MS triple cuadrupolo (sección 3.7.2). Todos los análisis se hicieron por triplicado. Para los cálculos, los niveles inferiores al LOD se consideraron como el 30% del LOD.

3.2 BIOSORCIÓN DE HCH EN MUSGOS

3.2.1 Musgos seleccionados

Para este ensayo se utilizaron clones de musgo cultivados en fotobiorreactores en condiciones axénicas en el Laboratorio del Grupo de Investigación en Ecotoxicología y Ecofisiología Vegetal de la Universidad de Santiago de Compostela. Las condiciones para la producción y el cultivo de los musgos fueron descritas por Debén et al. (2019) para *Fontinalis antipyretica* y por (Beike et al., 2015) para *Sphagnum palustre*. En resumen, los clones se cultivaron en fotobiorreactores de 12 L (Bio Bundle 15 M Applikon, Delft, Países Bajos) en un medio Knop líquido modificado y suplementado con micronutrientes. Los biorreactores se iluminaron y airearon de manera continua y se sometieron a controles de temperatura y esterilidad. Para los experimentos de biosorción, ambos clones de musgo se desvitalizaron mediante secado en horno con una rampa de temperatura específica para musgo, con el fin de evitar interferencias con el metabolismo y obtener resultados más estables (Debén et al., 2017).

Los musgos se fueron caracterizados molecular e histoquímicamente en colaboración con el Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, Pyrolyscience de Santiago de Compostela y Geolab de la Facultad de Geociencias de los Países Bajos. La metodología y los resultados se explican detalladamente en la publicación derivada de este trabajo (Chaos et al., 2024b). De forma resumida, la caracterización molecular, especialmente de lípidos, se llevó a cabo mediante una combinación de las siguientes técnicas: (i) pirólisis acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (Py-GC-MS) sobre muestras sólidas; (ii) hidrólisis térmicamente asistida seguida de metilación y análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (THM-GC-MS); y (iii) análisis por GC-MS de extractos lipídicos totales. Los cromatogramas obtenidos mostraron diferencias entre las dos especies de musgo, específicamente en los picos de lípidos (ver Apéndice 1). En ambos musgos se detectaron por Py-GC-MS ácidos grasos saturados e insaturados C16 y C18, pero la señal fue más intensa en *F. antipiretica*, en el que además se observó ácido acetilénico; en el THM-GC-MS, *S. palustre* mostró picos altos de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs, *Fatty Acid Methyl Esters*) en el rango C16-C26, mientras que *F. antipiretica*, presentó FAMEs en el rango C16-C28, incluyendo ácidos acetilénicos; finalmente, en la extracción de lípidos totales se vieron esteroides vegetales y ésteres de ácidos grasos en ambos musgos, con la diferencia de ácidos grasos C16-C26 en *S. palustre* y altas cantidades de ácidos grasos C16-C20 y ácidos acetilénicos (C18-C20) en *F. antipiretica*.

Por su parte, la caracterización histoquímica se realizó mediante una tinción con Negro Sudán B, una técnica que permite la visualización y localización de compuestos lipofílicos, los cuales adquieren una coloración azul oscuro o negra (Jensen, 1962). Los resultados pusieron en relieve diferencias en la localización de lípidos en ambos musgos (ver Apéndice 1). Brevemente, en *F. antipiretica* se observó una coloración azul oscuro, particularmente intensa en el caulidiodio; en los filidiodios maduros se observó tinción en las paredes de las células vivas y muertas, con tinción ocasional en el citoplasma, mientras que en los filidiodios jóvenes (con cutícula sin desarrollar), sólo se tiñó el citoplasma,

aparentemente en los plastos. En *S. palustre* la tinción produjo una coloración más tenue, particularmente en los caulidios, que parecían transparentes. La tinción se limitó a las paredes de las células con citoplasma, tanto en clorocistos como en células aún sin diferenciar, mientras que las paredes de los hialocistos no se tiñeron.

3.2.2 Ensayos de biosorción

La capacidad de bioacumulación de HCH por parte de los musgos se evaluó mediante dos experimentos de biosorción: un experimento en fase líquida tipo *batch*, utilizando el método de adiciones repetidas descrito por Bowman (1979) para obtener isothermas de adsorción, y otro en fase gaseosa, mediante muestreo activo de aire interior y extracción en fase sólida (SPE, *Solid-Phase Extraction*) del analito. El HCH se extrajo mediante extracción asistida por ultrasonidos y se identificó y cuantificó mediante GC-MS/MS, siguiendo procedimientos específicos según el tipo de muestra: para los adsorbentes, se aplicaron los descritos en las secciones 3.6.2 y 3.7.2; para las muestras acuosas, los de las secciones 3.6.3 y 3.7.1.

3.2.2.1 Experimento de biosorción en fase líquida

Siguiendo el método de Bowman, se sumergieron 50 g de musgo en 25 mL de una solución que contenía isómeros de HCH (5 mg L^{-1}), 5 mM NaN_3 (para inhibir la actividad microbiana) y 5 mM CaCl_2 (como electrolito de fondo). La solución de isómeros de HCH se preparó en agua bidestilada a una concentración inferior al límite de solubilidad de cada isómero, previamente determinado por Rodríguez Garrido (2009), utilizando una solución madre en acetona. Las concentraciones de HCH fueron *ca.* 1 mg L^{-1} α -HCH, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ β -HCH y 2 mg L^{-1} γ - y δ -HCH, lo que sumó un total de 5 mg L^{-1} de Σ -HCH.

Las suspensiones de musgo se colocaron en matraces de vidrio de 100 mL, los cuales fueron cerrados con tapas de PTFE y sellados herméticamente con Parafilm®. Se agitaron durante 24 h en un agitador de vaivén ($< 100 \text{ rpm}$) hasta alcanzar el equilibrio (Rodríguez Garrido, 2009), a temperatura ambiente (*ca.* $20 \text{ }^\circ\text{C}$) y en oscuridad. Posteriormente, se retiraron 20 mL de la fase líquida con una pipeta de vidrio para analizar y se añadieron otros 20 mL de la solución de isómeros de HCH, NaN_3 y CaCl_2 . Este paso se repitió hasta que la concentración medida se mantuvo constante (*ca.* 10 veces). Se midieron cinco réplicas de las suspensiones de musgo, y se incluyó una solución sin musgo sometida a las mismas adiciones repetidas como control. La concentración de HCH en la fase líquida retirada en cada paso se midió por triplicado.

La cantidad de HCH adsorbido en el musgo se calculó como la diferencia entre la concentración de equilibrio en presencia y ausencia (control) del musgo, para corregir posibles pérdidas por volatilización o adsorción en las superficies y evitar la sobreestimación del HCH retenido en el musgo. Las curvas de adsorción se obtuvieron representando gráficamente la concentración adsorbida acumulada de HCH en cada musgo frente a la concentración de HCH presente en la solución en equilibrio. Los datos experimentales se ajustaron a los modelos lineal (ecuación 1) y Freundlich (ecuación 2):

$$q = K_D C \quad (1)$$

$$q = K_F C^{1/n} \quad (2)$$

Siendo q (mg g^{-1}) la cantidad de HCH adsorbida en el musgo en equilibrio; C (mg L^{-1}) es la concentración de HCH en solución en equilibrio; K_D (L g^{-1}), es el coeficiente de distribución en el modelo lineal; K_F ($\text{L}^n \text{mg}^{1-n} \text{g}^{-1}$) y $1/n$ (sin unidades) son los coeficientes de Freundlich.

3.2.2.2 Experimento de biosorción en fase gaseosa

Para evaluar la biosorción de HCH en musgos en fase gaseosa se utilizó un sistema de muestreo activo en aire interior y una extracción en fase sólida (SPE) del analito (Barro et al., 2006, 2005). Se trata de un método que consiste en hacer pasar un volumen conocido de aire contaminado a través de un tubo de vidrio con un material adsorbente. Esto se realiza mediante un sistema de bombeo bajo condiciones controladas dentro de una vitrina cerrada. La cantidad de contaminante retenido se determina mediante análisis del adsorbente (Fig. M2).

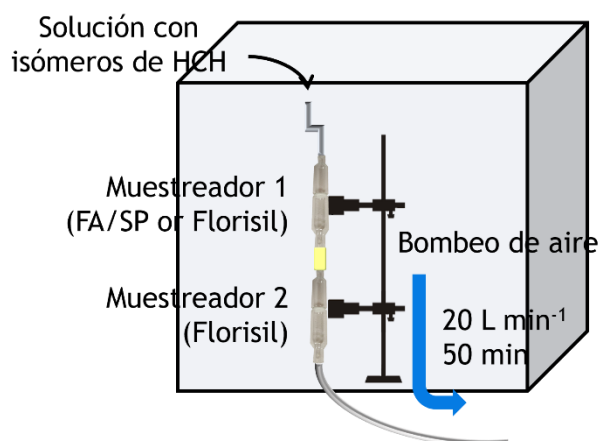


Fig. M2 Descripción del método de muestreo de aire utilizado en el experimento de biosorción de HCH en musgos en la fase gaseosa. El método se basa en un sistema de muestreo activo de aire interior seguido de la extracción en fase sólida del analito.

Las condiciones experimentales se definieron en experimentos previos (C. García-Jares, comunicación personal): el aire se bombeó a una tasa de 20 L min^{-1} durante 50 min (es decir, 1 m^3 de aire). El método se adaptó al experimento utilizando dos muestreadores colocados en serie (*ca.* 30 cm^3 de volumen cada uno): el primero con musgo (o Florisil® como control) y el segundo con Florisil®. Al inicio del circuito se añadió un tubo de vidrio al que se añadieron $10 \mu\text{L}$ de una solución madre de HCH de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para contaminar el aire. De esta forma, el aire contaminado con HCH pasaba a través del musgo y cualquier HCH no retenido por el musgo quedaba atrapado en el Florisil® del segundo colector. En este caso se usaron entre 0,1 y 0,2 g de adsorbente por muestreador para obtener un volumen equivalente de adsorbente. El muestreo se realizó por triplicado. Esta fue la primera vez que se aplicó este método en musgos.

La adsorción de HCH en el musgo se calculó considerando el porcentaje de recuperación de HCH en los adsorbentes.

3.3 EFECTO DE SURFACTANTES Y LÍQUIDOS IÓNICOS SOBRE LA SOLUBILIDAD DE HCH

3.3.1 Surfactantes y líquidos iónicos seleccionados

Para este ensayo se utilizaron 24 tipos de surfactantes convencionales y líquidos iónicos con actividad surfactante (SAILs). De estos compuestos, 10 tenían carácter catiónico, 8 aniónico y 6 no iónico. Los compuestos con actividad surfactante catiónicos y aniónicos utilizados se muestran en la Tabla M1, con el nombre abreviado, la fuente, la pureza, la estructura y la concentración micelar crítica (CMC) de cada compuesto. La Tabla M2 muestra estos datos para los surfactantes no iónicos, junto con el balance hidrófilo-lipofílico (HLB). En la Tabla M3 se incluyen las estructuras de todos los compuestos catiónicos, aniónicos y no iónicos. Los SAILs [C₈C1_{im}][OAc], 2-hidroxietilamonio-Alfoterra® y Alfoterra®145-4S 90 se sintetizaron en el laboratorio del grupo EQUIFASE, como se detalla en la publicación derivada de este trabajo (Chaos et al., 2024a). También se estudiaron dos combinaciones de C1EG (SAIL catiónico) y SDBS (surfactante aniónico): Blend 1 (55,3 % en peso de C1EG y 44,7 % en peso de SDBS) y Blend 2 (26,3 % en peso de C1EG y 73,7 % en peso de SDBS). Estas mezclas fueron seleccionadas debido a su excelente capacidad para solubilizar el petróleo y su baja adsorción en rocas carbonatadas.

La CMC de los compuestos con actividad surfactante que no se habían caracterizado previamente en la bibliografía fue determinado por el grupo EQUIFASE utilizando el método de la placa de Wilhelmy, detallado en el apéndice 1 (Tabla A2 y Fig. A2) (Chaos et al., 2024a).

3.3.2 Ensayo de solubilización

Para cada compuesto con actividad surfactante se determinó la capacidad potencial para aumentar la solubilidad aparente de los isómeros de HCH. Con este fin, se prepararon soluciones madre de los surfactantes convencionales o SAILs en agua pura a concentraciones de 5 g L⁻¹ y 15 g L⁻¹. Además, en el caso de los surfactantes no iónicos, y debido a sus bajas CMC, también se probó una concentración de 15 mg L⁻¹. Las soluciones madre de todos los isómeros de HCH se prepararon a una concentración de 5 g L⁻¹ en acetona. Se mezclaron las cantidades necesarias de soluciones de surfactante y HCH para obtener una concentración final de 50 mg L⁻¹ para α -, γ - y δ -HCH, y de 2 mg L⁻¹ para β -HCH en las soluciones con surfactante. Estas concentraciones eran aproximadamente diez veces superiores al límite de solubilidad obtenido en agua por (Rodríguez-Garrido, 2009). Además, se preparó una solución control (sin surfactante). El pesaje se realizó en una balanza analítica Mettler AE-100.

Todas las soluciones experimentales y el control se agitaron durante 24 h a temperatura ambiente hasta alcanzar el equilibrio. Posteriormente, la fase acuosa se separó mediante centrifugación (Hettich™ Zentrifugen EBA 21; 3000 rpm, fuerza $g = 704$, 10 min). El HCH disuelto se extrajo mediante extracción asistida por ultrasonidos y posterior análisis en GC-MS/MS trampa de iones (ver secciones 3.6.3 y 3.7.1). Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Los resultados se normalizaron respecto al control.

Tabla M1 Surfactantes y SAILs utilizados en este estudio; las abreviaturas se especifican entre paréntesis.

Compuesto	Fuente	Pureza (wt %)	CMC (mg L ⁻¹)
Compuestos catiónicos con actividad surfactante			
Cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio ([C ₈ C ₁ im]Cl)	Sigma-Aldrich	>97	438.48 (Beyaz et al., 2004)
Cloruro de 1-decilo-3-metilimidazolio ([C ₁₀ C ₁ im]Cl)	Sigma-Aldrich	96	14 805.08 (Łuczak et al., 2011)
Acetato de 1-octil-3-metilimidazolio ([C ₈ C ₁ im][OAc])	Sintetizado	99	11 153 ¹
Cloruro de 1-dodecilpiridinio ([C ₁₂ py]Cl)	Merck	>93	4 334.85 (Tennouga et al., 2015)
Cloruro tributiltetradecilfosfonio ([P _{4.4.4.14}]Cl)	Solvay	>90	435 (Blesic et al., 2010)
Cloruro de metiltrioctilamonio ([N _{1.8.8.8}]Cl)	Sigma-Aldrich	>93	808.32 (Zhang et al., 2019)
Cloruro de bencildimetildodecilamonio ([N _{1.12.Bz}]Cl)	Sigma-Aldrich	>99	2 991.91 (González-Pérez et al., 2003)
Cloruro de [2-(etilmetilamonio)etil]-omega-hidroxilo (221PG)	Iolitec	>95	31 170 ¹
Cocosilalquilpentaetoximetilamonio (Metilsulfato) (C1EG)	Iolitec	>95	88.12 (Somoza et al., 2022)
Étilbis(hidroxi)etil)tallow-alquiletoxilado etilsulfato (T2EG)	Iolitec	>95	36.32 (Somoza et al., 2023)
Compuestos aniónicos con actividad surfactante			
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Sigma-Aldrich	>99	2 306.96 (Mandal et al., 1988)
Dodecilbenceno sulfonato de sodio (SDBS)	Sigma-Aldrich	>99	453.02 (Hait et al., 2003)
Dodecanoato de colina ([Ch][ODo])	Sintetizado	99	7 432.64 (Klein et al., 2008)
N-lauroilsarcosinato de sodio (Sarkosyl)	Sigma-Aldrich	>99	3 725.93 (Hąc-Wydro et al., 2016)
Diocilsulfosuccinato de sodio (AOT)	Sigma-Aldrich	>97	1 182.53 (Das et al., 2012)
Alfoterra®145-4S 90 (Na-Alfoterra)	Sasol	ND	25.22 ¹
2-hidroxi)etilamonio-Alfoterra® (N _{0.0.0.20H} -Alfoterra)	Sintetizado	ND	12.15 ¹
Éter de polietilenglicol-4-nonilfenil-3-sulfopropilo sal potásica (Ralufon)	Sigma-Aldrich	ND	207.65 ¹

ND: No disponible

¹Obtenido mediante medidas de tensión superficial (Apéndice 1, Tabla A5).

Tabla M2 Surfactantes no iónicos utilizados en este estudio; las abreviaturas se especifican entre paréntesis.

Compuesto	Fuente	Pureza (wt %)	CMC (mg L ⁻¹)	HLB ²
Éter cetílico de polioxietileno (10) (Brij C10)	Sigma-Aldrich	>97	1.37 (Vasiljević et al., 2015)	12
Éter dodecílico de polietilenglicol (Brij L4)	Sigma-Aldrich	>99	0.333 (Ghosh et al., 2003)	9
Éter de nonilfenol etoxilado (5) (Igepal CO-520)	Sigma-Aldrich	ND	208.55 (Goo et al., 2021)	10
Tetraol de etilendiamina tetrakis(etoxilato-bloque-propoxilato) (Tetronic 90R4)	Sigma-Aldrich	>99.9	28.96 ¹	1-7
Monooleato de sorbitán polioxietilenado (Tween 80)	Sigma-Aldrich	ND	22 (Mandal et al., 1988)	15
Éter de octilfenol terciario con polietilenglicol (Triton X-100)	Sigma-Aldrich	ND	187.85 (Mandal et al., 1988)	13.5

ND: No disponible

¹Obtenido mediante medidas de tensión superficial (Apéndice 1, Tabla A5).²Obtenido del fabricante.**Tabla M3** Estructuras de los surfactantes y líquidos iónicos con actividad surfactante (SAILs) utilizados en este trabajo.

Compuesto	Estructura
Compuestos catiónicos con actividad surfactante	
Cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio ([C ₈ C ₁ im]Cl)	
Cloruro de 1-decilo-3-metilimidazolio ([C ₁₀ C ₁ im]Cl)	
Acetato de 1-octil-3-metilimidazolio ([C ₈ C ₁ im][OAc])	
Cloruro de 1-dodecylpiridinio ([C ₁₂ py]Cl)	
Cloruro tributiltetradecilfosfonio ([P ₄ 4414]Cl)	

Compuesto	Estructura
Cloruro de metiltrioctilamonio ([N ₁₈₈₈][Cl])	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_6\text{H}_2\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3 \quad \text{Cl}^-$
Cloruro de bencildimetildodecilamonio ([N _{112Bz}][Cl])	
Cloruro de [2-(etilmetilamonio)etil]-omega-hidroxi (221PG)	$\text{H}_3\text{CH}_2\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_2\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}\right]_n \quad \text{Cl}^-$ <p style="text-align: center;">n=5-15</p>
Cocosalquilpentaetoximetilamonio (Metilsulfato) (C1EG)	$\text{HO}-\left[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}\right]_m-\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{Cocos}}{\text{N}^+}}-\text{CH}_2-\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}\right]_n-\text{OH} \quad \text{CH}_3\text{SO}_4^-$ <p style="text-align: center;">m,n=5-10</p>
Étilbis(hidroxi)etil-tallow-alquiletoxilado etilsulfato (T2EG)	$\text{HO}-\left[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}\right]_m-\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_2\text{CH}_3}{\underset{\text{Tallow}}{\text{N}^+}}-\text{CH}_2-\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}\right]_n-\text{OH} \quad \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$ <p style="text-align: center;">m,n=6-20</p>

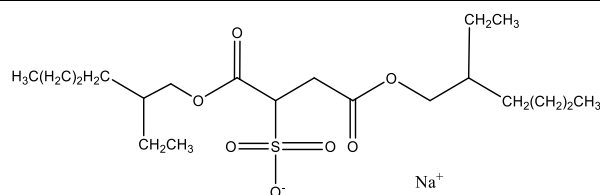
Compuestos aniónicos con actividad surfactante

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	$\text{CCCCCCCCCCCCO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{O}^- \text{Na}^+$
Dodecibenceno sulfonato de sodio (SDBS)	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_{10}\text{H}_2\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{O}^- \quad \text{Na}^+$
Dodecanoato de colina ([Ch][ODo])	$\text{HOH}_2\text{CH}_2\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_3 \quad \text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_9\text{H}_2\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^-$
N-lauroilsarcosinato de sodio (Sarkosyl)	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_9\text{H}_2\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^- \quad \text{Na}^+$

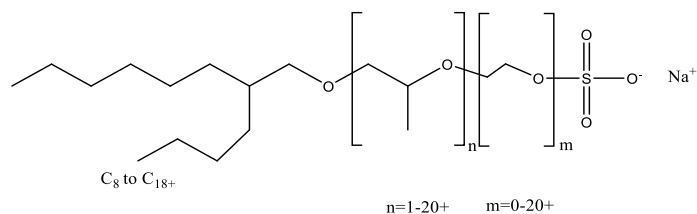
Compuesto

Estructura

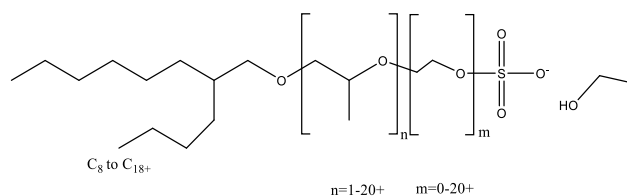
Diocilsulfosuccinato de sodio (AOT)



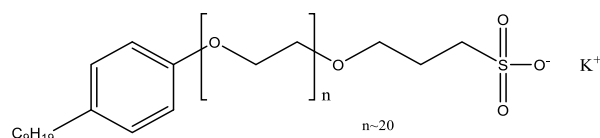
Alfoterra®145-4S 90 (Na-Alfoterra)



2-hidroxiethylamonio-Alfoterra® (N0 0 0 20H-Alfoterra)

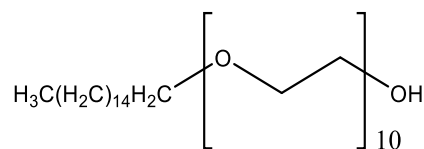


Éter de polietilenglicol-4-nonilfenil-3-sulfopropilo sal potásica (Ralufon)

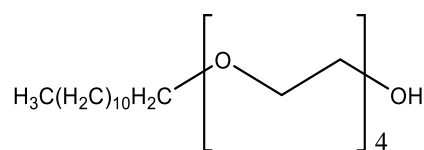


Surfactantes no iónicos

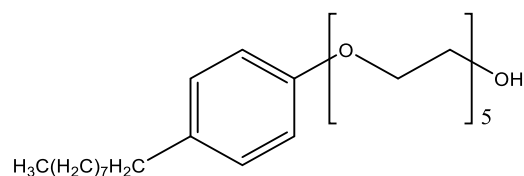
Éter cetílico de polioxietileno (10) (Brij C10)



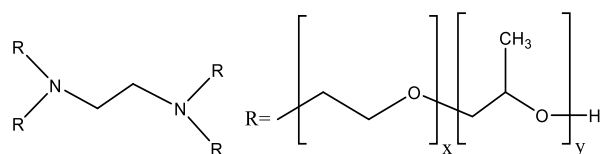
Éter dodecílico de polietilenglicol (Brij L4)



Éter de nonilfenol etoxilado (5) (Igepal CO-520)



Tetraol de etilendiamina tetrakis(etoxilato-bloque-propoxilato) (Tetronic 90R4)



Compuesto	Estructura
Monooleato de sorbitán polioxietilenado (Tween 80)	
Éter de octilfenol terciario con polietilenglicol (Triton X-100)	

3.4 EFECTO DE ENMIENDAS EDÁFICAS SOBRE LA MOVILIDAD DE HCH

3.4.1 Enmiendas y preparación de muestras

Se utilizaron seis enmiendas edáficas obtenidas por compostaje, pirólisis o combustión de distintos residuos orgánicos, abundantes y de bajo coste. Estas incluyeron 2 muestras de compost (CMP1 y CMP2), 3 muestras de biocarbones (BC-G, BC-M y BC-P) y una de ceniza de biomasa (BA) (Fig. M3). Estos materiales cubrían un amplio rango de contenido/calidad de materia orgánica y propiedades fisicoquímicas (Tabla M4). La muestra CMP1 correspondía a un vermicompost producido a partir de algas de ribazón, suministrado por Ecocelta Galicia S.L. (Pontevedra, España). La muestra CMP2 correspondía a un compost obtenido a partir de lodos de depuradora y subproductos de industria agroalimentaria y, junto con la muestra BA (cenizas de combustión de biomasa), fue suministrada por Tratamientos Ecológicos del Noroeste S.L. (A Coruña, España). Los biocarbones se obtuvieron por pirólisis de gallinaza (BC-G), carozo de maíz (BC-M) o corteza de pino (BC-P) en un reactor experimental a < 300 °C, 500 °C y 550 °C, respectivamente, durante 1,5 – 6,0 h (Saiz-Rubio et al., 2019).

COMPOST (CMP)		BIOCARBÓN (BC)			CENIZA
CMP1	CMP2	BC-M	BC-G	BC-P	BA
Vermicompost	CMP de lodos de depuradora y subproductos de industria agroalimentaria	BC de carozo de maíz	BC de gallinaza	BC de corteza de pino	Ceniza de biomasa
Dosis: 2,5, 5, 10, 20 %		Dosis: 0,5, 1, 2,5, 5 %			

Fig. M3 Enmiendas edáficas seleccionadas para su aplicación al suelo contaminado con HCH en los experimentos de lixiviación y volatilización.

Tabla M4 Principales características de las enmiendas utilizadas. CMP1: vermicompost, CMP2: compost de lodos de depuradora y subproductos de industria agroalimentaria, BC-G: biocarbón de gallinaza, BC-M: biocarbón de carozo de maíz, BC-P: biocarbón de corteza de pino y BA: ceniza de biomasa.

	CMP1	CMP2	BC-G ¹	BC-M	BC-P ¹	BA
pH	7,0	6,9	7,2	10,6	8,8	8,5
% C	14,2	28,8	32,6	81,5	88,7	7,4
% N	1,6	4,0	3,0	0,6	0,6	0,1
% H	1,5	4,1	3,9	1,5	1,0	0,4
% S	0,4	1,3	0,3	0,0	0,1	2,8
% Ceniza	-	-	46,4	5,1	4,4	-
O/C	-	-	0,32	0,11	0,04	-
H/C	1,27	1,71	1,46	0,22	0,14	0,65
C/N	8,7	7,2	10,9	135,7	147,8	94,1
P (g kg ⁻¹)	5,8	13,9	15,4	1,6	0,5	3,6
Ca (g kg ⁻¹)	23,4	20,2	47,8	0,8	11,6	123,0
Mg (g kg ⁻¹)	5,1	4,8	7,2	0,9	1,3	18,7
Na (g kg ⁻¹)	4,9	3,0	4,0	0,4	0,7	7,3
K (g kg ⁻¹)	13,7	4,5	16,8	24,5	2,9	32,0
Al (g kg ⁻¹)	5,1	30,6	0,0	0,4	0,0	18,6

¹Análisis obtenido de Saiz-Rubio et al. (2019)

Los ensayos se realizaron con una muestra de suelo franco arenoso contaminado con residuos de la fabricación de lindano en O Porriño (Galicia, SO Pontevedra). La composición media de estos residuos era 77% α -HCH, 16% β -HCH, 5% γ -HCH, y 2% δ -HCH (Calvelo Pereira et al, 2006). La concentración total de HCH en el suelo contaminado era de 177,0 mg kg⁻¹ (154,6, 20,1, 1,7 y 0,6 mg kg⁻¹ de α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH, respectivamente). El suelo contaminado (fracción < 2 mm) fue mezclado uniformemente con cantidades adecuadas de cada enmienda individual, para obtener tratamientos con cuatro dosis diferentes, tres de ellas equivalentes a prácticas agronómicas habituales y una cuarta con el doble de la dosis más alta. La adición de los biocarbones o la ceniza se hizo a las dosis 0,5, 1, 2,5, 5 % (p/p) y la adición de los compost, a 2,5, 5, 10 y 20 % (p/p). De ahora en adelante nos referiremos a estas dosis como dosis 1, 2, 3 y 4, siendo 1 la dosis más baja y 4 la dosis más alta. Estas corresponderían a una aplicación final de 5-50 t ha⁻¹ de biocarbón o ceniza y 25-200 t ha⁻¹ de compost en un suelo de 10 cm de profundidad con densidad de 1 g cm³. Como control se utilizó una alícuota de suelo contaminado sin enmienda. Adicionalmente, para ver cómo afecta la combinación de enmiendas a las propiedades del suelo y al riesgo de lixiviación del HCH, se ensayaron cuatro enmiendas combinadas, elaboradas por mezcla de dos o tres de los siguientes componentes (y dosis) seleccionados: CMP1 (10 %), BC-M (2.5%) y BA (1%). Las cuatro combinaciones se identificaron como M1 (CMP1 + BA), M2 (CMP1 + BC-M), M3 (BC-M + BA) y M4 (CMP1 + BC-M + BA). Todos los suelos (enmendados y sin enmendar) fueron tratados con NaNO₃ (5 mM), para inhibir la

actividad biológica, y el contenido de humedad se ajustó al 60% de su capacidad máxima de retención de agua. Los ensayos de laboratorio (lixiviación y volatilización) se realizaron después de 7 días de estabilización.

Las propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo (con y sin enmiendas) se analizaron mediante métodos estándar. Resumidamente, se determinó el pH en agua y en KCl 0,1 M (relación 1:2.5, p:v) con pH-metro (949 pH Meter, Metrohm); C y N totales mediante análisis elemental (CHNS Truspec, Leco, EE. UU.); cationes intercambiables (Ca, Mg, Na, K y Al), desplazados con NH_4Cl 1 M y determinados mediante espectrofotometría de absorción atómica (Ca, Mg y Al) y emisión atómica (Na y K) de llama (Perkin Elmer PinAAcleTM 500, USA); capacidad de intercambio catiónico efectiva (CIC_e), como la suma de dichos cationes. Además, se determinó la conductividad eléctrica (Conductimeter Basic 30, Crison) y el carbono orgánico/inorgánico disuelto (DOC/DIC, analizador Shimadzu TOC-L) en el extracto en agua (relación suelo: agua 1:10, p/v) obtenido por agitación (24 h), centrifugación (2700 rpm, 20 min) y filtrado (0,45 μm).

3.4.2 Ensayos de lixiviación y volatilización

El efecto de las enmiendas sobre la lixiviación y volatilización en suelos contaminados se evaluó mediante experimentos específicos, seguidos de una extracción en ultrasonidos y un análisis posterior en GC-MS/MS. El HCH en las muestras acuosas del experimento de lixiviación se analizó mediante GC-MS/MS con trampa de iones (ver secciones 3.6.3 y 3.7.1), y el HCH en los adsorbentes se determinó por GC-MS/MS triple cuadrupolo (ver secciones 3.6.2 y 3.7.2).

3.4.2.1 Experimento de lixiviación

Para evaluar el efecto de las enmiendas sobre el potencial de lixiviación de isómeros de HCH (α -, β -, γ -, δ -HCH) en el suelo contaminado, se realizó un ensayo de lixiviación tipo *batch* (CEN, 2002, protocolo EN 12457-2). Para ello, para cada muestra de suelo enmendado (con las distintas enmiendas/dosis) y sin enmendar (control), se hizo una suspensión de suelo (1 g, $n = 3$) con una disolución de CaCl_2 5 mM (25 ml). Las suspensiones se agitaron en un agitador lineal (130 rpm), a temperatura ambiente (aprox. 20 °C) y oscuridad, hasta alcanzar el equilibrio (24 h). Posteriormente, se separó la fase acuosa mediante centrifugación (2700 rpm, 20 min, centrífuga HettichTM Zentrifugen EBA 21) y filtrado (0,45 μm). En total se obtuvieron 87 muestras de lixiviados (6 enmiendas x 4 dosis, 4 enmiendas combinadas y 1 control, $n = 3$).

3.4.2.2 Experimento de volatilización

Para evaluar el efecto de las enmiendas sobre el potencial de transferencia de HCH suelo-aire, se realizó un ensayo de volatilización en condiciones de laboratorio. Para este ensayo se seleccionaron tres enmiendas, aplicadas al suelo en dos dosis cada una: CMP1 (10 y 20%), BC-M (2.5 y 5%) y BA (1 y 5%). Como control se utilizó una muestra de suelo sin enmendar. De cada muestra de suelo (con y sin enmiendas), se pesaron 15 g ($n = 3$), se humectaron y se dejaron estabilizar en placas Petri selladas durante una semana. Tras este periodo, estas placas se expusieron abiertas en una vitrina de gases (1,0356 m^3)

durante 24 h. El aire con HCH se muestreó utilizando el sistema de muestreo activo de aire interior basado en SPE descrito anteriormente en la sección 3.2.2.2 (Fig. M4). En este caso, se bombeó 1 m³ de aire a través de un único muestreador de vidrio con 0,2 g Florisil®. Tras el bombeo, se recuperó el adsorbente para la determinación posterior del HCH volatilizado. Durante todo el experimento se registraron la temperatura y la humedad del aire.

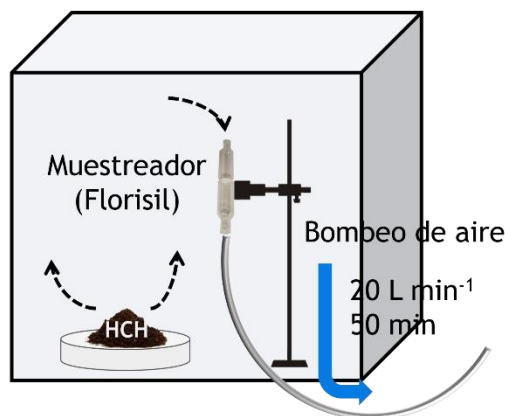


Fig. M4 Descripción del método de muestreo de aire utilizado en el experimento de volatilización de HCH en suelos contaminados con y sin enmiendas edáficas. El método se basa en un sistema de muestreo activo de aire interior seguido de la extracción en fase sólida del analito.

3.5 OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA Y CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE HCH

3.5.1 Configuración electroquímica

Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo en una celda cilíndrica de vidrio sellada (con una capacidad de 300 mL), equipada con dos cátodos de acero inoxidable (SS), ubicados a ambos lados de un ánodo de diamante dopado con boro (BDD) recubierto con niobio (proporcionado por NOVA DIAMANT AB) (Fig. M5). La superficie de los electrodos era de 75 cm², con una separación total de 3 mm entre ellos. Los electrodos estaban completamente sumergidos para minimizar la volatilización del HCH y del agua. Se aplicó una corriente directa (4 - 9 V) mediante una fuente de alimentación (PLH120 DC Power Supply, 0-120 V, 0-750 mA), y el voltaje se ajustó automáticamente según la corriente y la concentración del electrolito. Para mejorar el transporte de masa de los reactivos hacia y desde los electrodos, la solución se agitó con una barra magnética a 250 rpm.

Las soluciones experimentales (250 mL) se prepararon diluyendo soluciones madre de isómeros de HCH en el medio electrolítico (agua Milli-Q con Na₂SO₄, como electrolito soporte) hasta alcanzar las concentraciones requeridas. Se eligió el Na₂SO₄ como electrolito debido a su uso frecuente en métodos electroquímicos (Moreira et al., 2017). Todas las muestras acuosas fueron extraídas mediante microextracción en fase sólida (SPME, *Solid-Phase Microextraction*; sección 3.6.3) y analizadas mediante GC-MSD (sección 3.7.3).

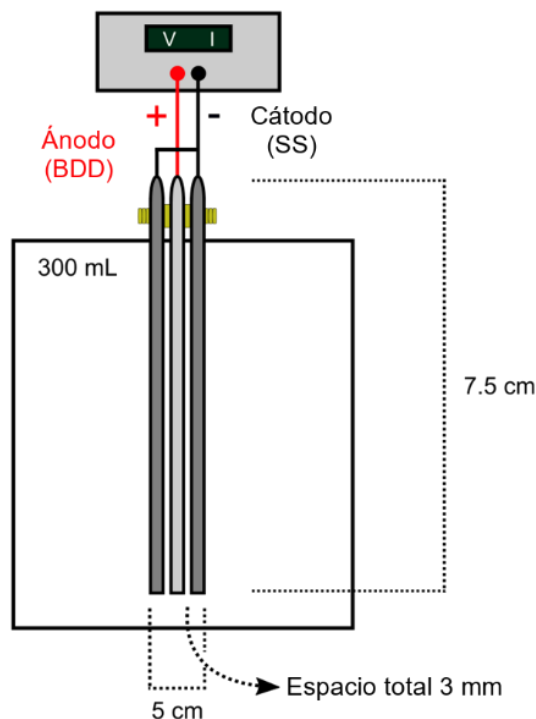


Fig. M5 Configuración del reactor electroquímico con electrodo BDD-SS (75 cm²) y celda de 300 mL.

3.5.2 Determinación de las condiciones operativas

Se llevó a cabo un diseño de experimentos (DoE) para evaluar el efecto de distintos parámetros operativos en la degradación del HCH y establecer las condiciones experimentales más efectivas. Para ello, se utilizó un diseño factorial mixto aleatorio (3×2^2) con tres factores: densidad de corriente (tres niveles), concentración inicial de HCH (dos niveles) y concentración de Na₂SO₄ (dos niveles), junto con un punto central. Estos factores se seleccionaron debido a su importancia en los procesos de tratamiento electroquímico (Moreira et al., 2017; Uwayezu et al., 2021). Los niveles de los factores se basaron en los valores recogidos en la bibliografía, con concentraciones de HCH aproximadas a las detectadas en entornos de aguas superficiales y subterráneas (Santos et al., 2018; Singh et al., 2023). En total, se evaluaron 13 tratamientos, identificados por el nivel aplicado (L, M o H, correspondientes a bajo, medio o alto) en cada uno de los factores (densidad de corriente, concentración de HCH y concentración de Na₂SO₄).

Cada experimento tuvo una duración de 2 h. Las muestras se recolectaron al finalizar el tratamiento en viales de vidrio de 10 mL, que fueron sellados y almacenados a 4 °C hasta su análisis. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($T = 19,2 \pm 0,6$ °C) y al pH natural de las soluciones ($\text{pH} = 5,8 \pm 0,3$), controlando ambos parámetros al inicio y al final de cada tratamiento.

Los ensayos de control incluyeron una muestra sin corriente, con una concentración conocida de ΣHCH (suma de isómeros; $310 \mu\text{g L}^{-1}$), mantenida bajo agitación para comprobar posibles pérdidas del compuesto, y un blanco con agua destilada entre tratamientos, con el fin de evaluar posibles contaminaciones cruzadas.

La variable de respuesta objetivo fue el porcentaje de degradación de la suma de isómeros de HCH (ΣHCH), calculado mediante la Ecuación 3:

$$\% \text{ degradación} = \frac{(\Sigma\text{HCH})_i - (\Sigma\text{HCH})_f}{(\Sigma\text{HCH})_i} \times 100 \quad (3)$$

3.5.3 Estudio cinético de degradación

Después de establecer las condiciones más efectivas para la oxidación electroquímica de los isómeros de HCH (10 mA cm⁻², 310 µg L⁻¹ de HCH y 1 g L⁻¹ de Na₂SO₄), se llevó a cabo un estudio cinético para obtener las curvas de degradación de cada isómero, tanto de forma individual como en combinación con los demás. El estudio se hizo en los siguientes intervalos de tiempo: 15, 30, 60, 120 y 240 min. Cada experimento se realizó por triplicado. Las condiciones de temperatura y pH se registraron al inicio y al final de cada tratamiento.

3.5.4 Aplicación en lixiviados de suelos contaminados

Finalmente, se aplicaron las condiciones definidas en lixiviados de suelos contaminados en tratamientos de 2 y 4 h. Los lixiviados procedían de suelos históricamente contaminados recogidos en O Porriño. Para ello, se utilizaron dos muestras de suelo superficial (0 - 20 cm), con diferentes niveles de contaminación (Tabla M5). Los lixiviados se obtuvieron preparando una suspensión de suelo contaminado en agua Milli-Q con una proporción de sólido:solución de 1 g : 25 mL, agitada durante 24 h a 7 rpm. A continuación, las suspensiones se centrifugaron durante 20 min a 2700 rpm y se recogió el sobrenadante para su posterior tratamiento de electrooxidación. El carbono disuelto total (TDC, *Total Dissolved Carbon*) se determinó utilizando un analizador TOC-V CSH (SHIMADZU), con un límite de detección (LOD, *Limit of Detection*) de 4 µg L⁻¹.

Tabla M5 Características de las muestras de suelo contaminado de O Porriño (Galicia, NO España) utilizadas en el experimento. ΣHCH : concentración total de isómeros de HCH (α -, β -, γ -, δ -HCH).

	ΣHCH (mg kg ⁻¹)	pH _{H2O}	pH _{KCl}	C (g kg ⁻¹)	N (g kg ⁻¹)	H ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Al ³⁺
						cmol ₍₊₎ kg ⁻¹					
Suelo 1	27,50	4,9	4,4	31,7	2,5	0,12	6,32	1,43	0,18	0,78	0,55
Suelo 2	10,44	4,9	4,3	68,2	4,6	0,24	5,74	1,82	0,33	0,43	0,92

En este caso, se calculó la eficiencia de corriente de mineralización (MCE) y el consumo de energía por unidad de masa de carbono orgánico total eliminado (EC_{TOC}), siguiendo la metodología descrita por Domínguez et al., (2018b).

$$\% \text{ MCE} = \frac{n F \Delta\text{TOC}}{4.32 \times 10^7 \text{ m l t}} \times 100 \quad (4)$$

$$EC_{TOC} = \frac{E_{cell} I t}{V \Delta TOC} \quad (5)$$

Donde n: número de electrones consumidos por molécula de HCH, F: constante de Faraday, ΔTOC : disminución del carbono orgánico total (mg L^{-1}), 4.32×10^7 : factor de conversión, m: átomos de carbono del HCH, I: corriente eléctrica (A), t: tiempo (h), E_{cell} : voltaje promedio de la celda (V) y V: volumen (L).

3.6 EXTRACCIÓN DE HCH EN LAS MUESTRAS OBTENIDAS

3.6.1 Muestras de suelo

El HCH presente en las muestras de suelo obtenidas en los experimentos 3.2 y 3.5 se extrajo mediante extracción con líquidos presurizados (PLE, *pressurized liquid extraction*) en un equipo Dionex ASE 200 (Thermo Scientific) en el laboratorio de Ingeniería Ambiental de CRETUS.

Siguiendo el método EPA 3545A para pesticidas organoclorados, se homogeneizó 1 g de suelo con 0,25 g de tierra de diatomeas calcinada Celatom® FP4 (4:1, m/m) y la cantidad suficiente de arena de mar lavada (grano fino QP Panreac) para llenar la celda de extracción de 11 mL. La extracción se hizo en hexano bajo los siguientes parámetros: 5 min de tiempo de precalentamiento, 5 min de tiempo de calentamiento, 5 min de tiempo estático, 60 % de lavado con disolvente, 2 ciclos estáticos, 60 s de purga, 100 °C y 2000 psi. El extracto se recogió en un vial de vidrio de 60 ml cerrado con tapones con septos ultralimpios y se enrasó a 25 ml con hexano (PESTIPUR, CARLO ERBA Reagents). Después se almacenaron en tubos de ensayo Pyrex® con tapón de rosca y tapones revestidos de PTFE - 4 °C hasta su análisis.

Durante la extracción de los suelos se tuvo cuidado de evitar contaminaciones entre muestras. Para ello, se incluyeron blancos y controles (1 cada 10 muestras) que contenían arena o suelo libre de HCH, respectivamente.

La eficacia del método de extracción se evaluó mediante un ensayo de recuperación en el suelo sin HCH. Se añadieron 5 mg de HCH por kg de suelo usando una solución en acetona. Después de la fortificación, las muestras se dejaron reposar 24 h a temperatura ambiente para que la acetona se evaporara antes de la extracción (n = 3).

La validación del método se realizó en términos de recuperación, precisión y sensibilidad. La recuperación promedio de los cuatro isómeros fue del $91,2 \pm 19,2$ %. La precisión, evaluada por repetibilidad (10 réplicas el mismo día) y reproducibilidad (10 réplicas en días distintos), fue adecuada, con valores de desviación estándar relativa inferiores al 10 %. Por último, los límites de detección, calculados a partir de la relación señal/ruido, fueron menores a 0,1 mg de Σ HCH por kg de suelo.

3.6.2 Muestras vegetales y adsorbentes

Para extraer el HCH presente en las muestras vegetales del experimento 3.2 (hojas de carballo, acículas de pino y hojarasca), así como en los adsorbentes utilizados en el experimento 3.3 (musgos y Florisil®), se utilizó un método asistido por ultrasonidos.

Todas las extracciones se llevaron a cabo en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Químicas de la USC.

Se extrajeron 0,2 g de cada muestra con 2 mL de acetato de etilo mediante ultrasonidos (J. P. Selecta SA) durante 10 min a 25 - 30 °C y 50 Hz. Se añadieron 10 µl de una solución de PCB-30 en acetona (10 µg ml⁻¹) como patrón interno a las muestras para evaluar el rendimiento del proceso. Se utilizaron viales de vidrio de 10 mL sellados con tapones de aluminio con septos recubiertos de PTFE. El extracto resultante se filtró a través de filtros de jeringa hidrofóbicos de PTFE (0.22 µm) antes del análisis.

La precisión y la eficacia del método se evaluaron mediante muestras fortificadas a tres niveles de contaminación de HCH (0,5, 1,0 y 2,0 mg kg⁻¹). Las muestras fortificadas se almacenaron durante 24 h en oscuridad para permitir el equilibrio antes de aplicar el mismo protocolo de extracción descrito previamente. Las pruebas de recuperación se realizaron por triplicado para cada especie vegetal y nivel de concentración. El método mostró tasas de recuperación satisfactorias para los HCH totales (70 % - 130 %). No obstante, se observó una disminución del porcentaje de recuperación en el nivel de concentración más alto estudiado, lo que sugiere que, en este rango, el método podría presentar limitaciones en su exactitud.

Los datos de concentración de HCH en tejidos vegetales se expresaron en peso seco. Cuando fue preciso, parte de la muestra se secó a 40 °C en una estufa de aire forzado hasta alcanzar un peso constante.

3.6.3 Muestras acuosas

Para la extracción del HCH en muestras acuosas de los ensayos 3.3 (no acumulado por musgos), 3.4 (disuelto por compuestos con actividad surfactante) y 3.5 (lixiviado en suelos contaminados), se empleó un método asistido por ultrasonidos. Todas las extracciones se llevaron a cabo en el laboratorio de Ingeniería Ambiental de CRETUS.

Las muestras se extrajeron mediante ultrasonidos (Ultrasons, J. P. Selecta, S.A.) utilizando hexano como disolvente (1:1, v/v), durante 20 min. Esta técnica mostró tasas de recuperación > 95 % (Concha-Graña et al., 2008). Las extracciones se realizaron en tubos de ensayo Pyrex® con tapón de rosca y tapones revestidos de PTFE para evitar la pérdida de HCH por adsorción. Finalizado el proceso, se separó la fase orgánica y se eliminó cualquier resto de agua utilizando Na₂SO₄ anhidro. Los extractos resultantes se almacenaron a - 4 °C hasta su análisis.

El HCH remanente en las muestras acuosas tras los tratamientos de oxidación electroquímica del trabajo 3.6, se extrajo mediante microextracción en fase sólida (SPME). Esta técnica, ecológica y eficiente para una amplia gama de compuestos, permite extraer y concentrar simultáneamente el HCH y sus productos de degradación en un solo paso, lo cual es clave debido a las bajas concentraciones esperadas tras la degradación.

Para la extracción por SPME se utilizó una fibra comercial de 100 µm de polidimetilsiloxano o PDMS alojada en un soporte manual de la marca Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.). La fibra se acondicionó antes del primer uso siguiendo las

recomendaciones del fabricante, insertándola en el inyector del GC (modelo 7890A GC/5975C MSD) con flujo de helio a 250 °C durante 30 min.

Para la extracción, se introdujeron 5 mL de cada muestra en viales de vidrio de 10 mL, sellados con tapas de aluminio y septos recubiertos de PTFE, y se colocaron en un baño de agua a 50°C durante 3 min. Después, la fibra PDMS se expuso a la muestra durante 30 min. Tras la extracción, la fibra se retrajo dentro de la aguja y se llevó al GC-MSD para su desorción y análisis. Se realizaron periódicamente controles en blanco de fibra y controles de procedimiento (utilizando 5 mL de agua MilliQ) para verificar posibles contaminaciones de la fibra entre muestras. Además, se analizó un estándar de HCH con concentración conocida de forma periódica para asegurar la replicabilidad a lo largo del experimento.

3.7 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HCH

3.7.1 Análisis de extractos en hexano

Los extractos en hexano obtenidos mediante extracción por líquidos presurizados y ultrasonidos se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas con trampa de iones (450 GC-220 MS, Agilent Technologies), equipada con un inyector automático Combi-PAL (CTC-Analytics, AG, Suiza).

El inyector funcionó en modo *split/splitless*. La temperatura del inyector se fijó en 280 °C y el volumen de inyección fue de 1 µL. La separación cromatográfica de los isómeros se llevó a cabo utilizando una columna Trace Gold 5SILMS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de grosor de película; Thermo Scientific). El helio se utilizó como gas portador a un flujo constante de 1 ml min⁻¹. El programa de temperatura del horno del GC fue: 80 °C (1,5 min), 30 °C/min hasta 180 °C (1 min), 3 °C/min hasta 200 °C y 40 °C/min hasta 290 °C. El tiempo total de funcionamiento fue de 15 min. El espectrómetro de masas operó en modo tándem (MS/MS) con ionización por impacto de electrones y trampa de iones a 220 °C.

Las rectas de calibración se obtuvieron utilizando patrones 1 - 5000 µg L⁻¹ en hexano, según el experimento. Para el análisis, se utilizó un estándar interno (fenantreno-d10), añadido tanto a los extractos como a los patrones a una concentración de 250 µg L⁻¹.

3.7.2 Análisis de extractos en acetato de etilo

Los extractos en acetato de etilo obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonidos fueron analizados empleando un cromatógrafo de gases Thermo Scientific Trace 1310 acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (TSQ 8000) con un inyector automático IL 1310 de Thermo Scientific (San José, California, EE. UU.)

El inyector funcionó en modo pulsado *split/splitless* (200 kPa, mantenido durante 1,2 min). La temperatura del inyector se fijó en 260 °C y el volumen de inyección fue de 1 µL. La separación cromatográfica de los isómeros se llevó a cabo utilizando una columna Zebron ZB-Semivolátiles (30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 µm de espesor de película) suministrada por Phenomenex (Torrance, California, EE. UU.) El helio se

utilizó como gas portador a un flujo constante de 1 mL min⁻¹. El programa de temperatura del horno del GC fue: 120 °C (2 min), 20 °C/min hasta 200 °C y 10 °C/min hasta 290 °C. El tiempo total de funcionamiento fue de 13 min.

El detector del espectrómetro de masas (MSD) se utilizó en modo de ionización electrónica positiva (+70 eV). La temperatura de la línea de transferencia y de la fuente de iones se mantuvieron a 290 °C y 350 °C, respectivamente. El voltaje multiplicador fue de 1850 V. Se implementó el modo de adquisición de monitorización de reacciones seleccionadas, monitoreando dos o tres transiciones por isómero para una identificación y cuantificación inequívoca de los compuestos objetivo (Tabla A1). Se utilizaron los softwares Xcalibur 2.2 y Trace Finder 3.2 para operar el equipo e identificar y cuantificar los compuestos.

3.7.3 Análisis de fibra PDMS

La fibra de PDMS utilizada en la SPME se desorbió térmicamente a 260 °C en el inyector del GC durante 5 min y se analizó en un cromatógrafo Agilent 7890A acoplado a un detector de espectrometría de masas Agilent 5975C (MSD) con triple eje de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE. UU.).

La temperatura del inyector se ajustó a 260 °C y operó en modo *splitless* (1 min, 75 mL min⁻¹). La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna Zebron ZB SemiVolatiles (30 m x 0.25 mm i.d, 0.25 µm de grosor de película) de Phenomenex (Torrance, CA, EE. UU.). El helio se usó como gas portador a un flujo constante de 1 mL min⁻¹. El programa de temperatura del horno del GC fue el siguiente: temperatura inicial de 45 °C (1 min), 5 °C/min hasta 250 °C, 25°C/min hasta 290 °C (0,4 min). La duración total del análisis fue de 44 min. El MSD operó en modo de ionización por electrones (EI) positivo (+70 eV). Las temperaturas de la línea de transferencia, el cuadrupolo y la fuente de iones fueron 290 °C, 150 °C y 300 °C, respectivamente. Se utilizó el modo de adquisición Full Scan (FS), monitoreando fragmentos de masa/carga (m/z) entre 35-600. La identificación tentativa de los subproductos se realizó mediante comparación (coincidencia > 80%) entre el espectro MS experimental obtenido y aquellos proporcionados por la base de datos comercial de espectros (NIST V2.0). El sistema fue operado con el software Agilent MSD ChemStation E.02.00.493.

3.8 REACTIVOS

Las soluciones de isómeros de HCH para los experimentos se prepararon a partir de soluciones madre en acetona PESTANAL® (calidad RS, Fluka), utilizando isómeros suministrados por Dr. Ehrenstorfer (α -HCH: 98,0 %; β -HCH: 97,5 %; γ -HCH: 98,6 % y δ -HCH: 98,6 %). Para los experimentos se utilizaron hexano PESTIPUR® (calidad RS, CARLO ERBA Reagents) y acetato de etilo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

El Florisil®, utilizado como adsorbente de referencia, fue adquirido de Merck-Aldrich (Steinheim, Germany). Tenía un tamaño de malla 60/100 y fue activado durante la noche previa a los experimentos a 105 °C. La ácido sódica (NaN₃) fue adquirida en

Sigma-Aldrich (ReagentPlus®, >99,5 %), al igual que el cloruro de calcio (CaCl₂; grado ACS, >96 %). El sulfato de sodio (Na₂SO₄; 99 %) fue obtenido de Merck.

El PCB-30 (2,4,6-triclorobifenilo), utilizado como estándar de recuperación en las extracciones en ultrasonidos con acetato de etilo, fue obtenido de Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania). Para los análisis en GC-MS/MS (450-GS/220-MS, trampa de iones) se empleó una mezcla de compuestos deuterados (Internal Standards Mix 33, Dr. Ehrenstorfer), seleccionándose fenantreno-d10 como estándar interno debido a su tiempo de retención similar al de los isómeros de HCH.

3.9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos de los experimentos fueron procesados y analizados empleando las herramientas estadísticas más adecuadas para cada caso. Para evaluar las diferencias entre campañas de muestreo o entre especies arbóreas en O Porriño se utilizaron las pruebas Wilcoxon y Friedman ($p < 0,05$, datos no normales), seleccionando la prueba según el número de grupos comparados. Asimismo, se aplicó la correlación de Pearson y Tau de Kendall ($p < 0,05$) para relacionar las concentraciones de HCH medidas en suelo y vegetación u hojarasca. Los coeficientes de Pearson también se utilizaron para estudiar la relación entre el coeficiente de afinidad ($\log K_F$ o $\log K_D$), obtenido a partir de los experimentos de biosorción con musgos, y los siguientes parámetros: i) el coeficiente de partición octanol/agua ($\log K_{ow}$) de los isómeros de HCH (Wacławek et al., 2019) y ii) el tamaño de los isómeros de HCH (volúmenes según Silvani et al. (2019).

Por otra parte, para comparar los efectos de los surfactantes y líquidos iónicos sobre la solubilidad aparente de HCH (datos normalizados respecto al control) se utilizó un ANOVA seguido de la prueba post hoc de Bonferroni ($p < 0,05$). Para evaluar los efectos de las enmiendas edáficas sobre la movilidad de HCH en suelos frente al control se aplicó la prueba t-Student ($p < 0,1$, $p < 0,05$, y $p < 0,01$). Finalmente, la optimización de las condiciones experimentales y la identificación de la significancia de los factores considerados se realizó mediante un Diseño de Experimentos (DoE).

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con IBM SPSS Statistics 25.0, OriginPro y Statgraphics Centurion XIX.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MONITORIZACIÓN AMBIENTAL DE HCH EN O PORRIÑO

Con el propósito de evaluar el nivel actual de contaminación por HCH en O Porriño se analizaron muestras de suelo superficial (0-20 cm) y hoja de carballo (*Quercus robur*) obtenidas en un muestreo extensivo realizado en septiembre de 2021 y 2022 (Fig. M1). Además, se estudiaron muestras de un emplazamiento con largo historial de contaminación (PV4), recogidas en los mismos períodos, y adicionalmente en mayo de 2022, para identificar posibles variaciones estacionales. Todos los análisis se hicieron por triplicado y los niveles inferiores al límite de detección (LOD) se consideraron como el 30% del mismo.

4.1.1 Niveles de HCH en el muestreo extensivo

Las concentraciones de los isómeros de HCH en muestras de suelo superficial y hoja de carballo se muestran en la Tabla R1. En total, se recogieron 65 muestras de suelo superficial entre 2021 y 2022, 39 muestras de hoja de carballo en 2021, y 55, en 2022. La distribución espacial del Σ HCH (suma de los isómeros de HCH) se presenta en la Fig. R1.

Tabla R1 Concentración de HCH (mg kg^{-1}) en muestras de suelo superficial (0-20 cm) y hoja de carballo (*Quercus robur*) recogidas en O Porriño (Pontevedra, NO España) entre 2021 y 2022. Cuando la concentración fue inferior al límite de detección (LOD), se sustituyó por el 30 % de dicho valor.

	Mínimo	Máximo	Media \pm SD	Mediana	Frecuencia de detección (%)
Suelo ^a					
α -HCH	LOD	9,58	0,27 \pm 1,48	LOD	26
β - HCH	LOD	17,58	0,50 \pm 2,83	LOD	9
γ - HCH	LOD	0,19	0,01 \pm 0,03	LOD	9
δ - HCH	LOD	0,15	0,01 \pm 0,02	LOD	9
Σ - HCH	LOD	27,50	0,79 \pm 4,35	LOD	28
Hoja de carballo (2021) ^b					
α -HCH	LOD	0,22	0,05 \pm 0,08	LOD	100
β - HCH	LOD	2,57	0,09 \pm 0,42	LOD	8
γ - HCH	LOD	0,38	0,14 \pm 0,15	LOD	49
δ - HCH	LOD	0,77	0,04 \pm 0,14	LOD	8
Σ - HCH	LOD	2,80	0,33 \pm 0,48	0,27	100

	Mínimo	Máximo	Media \pm SD	Mediana	Frecuencia de detección (%)
Hoja de carballo (2022) ^c					
α -HCH	LOD	0,33	0,02 \pm 0,05	LOD	13
β -HCH	LOD	1,64	0,04 \pm 0,22	LOD	31
γ -HCH	LOD	0,64	0,00 \pm 0,16	LOD	7
δ -HCH	LOD	0,08	0,05 \pm 0,10	LOD	36
Σ -HCH	LOD	1,97	0,12 \pm 0,29	0,024	100

^a Número total de muestras: 65; LOD (α -, β -, γ -, δ - y Σ -HCH): 0,005; 0,012; 0,031; 0,044; 0,092 mg kg⁻¹

^b Número total de muestras: 39; LOD (α -, β -, γ -, δ - y Σ -HCH): 0,001; 0,003; 0,001; 0,001; 0,007 mg kg⁻¹

^c Número total de muestras: 55; LOD (α -, β -, γ -, δ - y Σ -HCH): 0,021; 0,005; 0,006; 0,004; 0,015 mg kg⁻¹

Se detectó HCH en 18 de las 65 muestras de suelo recogidas, con una media de Σ HCH igual a $0,79 \pm 4,35$ mg kg⁻¹. En la mayoría de las muestras se detectaron niveles traza próximos al LOD. Entre los isómeros, α -HCH fue el más frecuentemente detectado, presente en un 26 % de las muestras, mientras que β -HCH, γ -HCH y δ -HCH, se detectaron en un 9 % de las muestras cada uno. En términos de concentración, β -HCH presentó el intervalo más amplio de concentración ($0,50 \pm 2,83$), seguido de α -HCH ($0,27 \pm 1,48$).

En el muestreo se incluyeron emplazamientos vinculados a la producción de lindano en la zona, las antiguas fábricas (EMP-1, EMP-2) y parcelas con deposición probable de residuos (PV1-4), aunque sólo PV1 se identificó como vertedero de HCH y fue encapsulado en una celda de seguridad. En la fábrica EMP-1 no se detectaron residuos y en EMP-2 no se registraron datos, ya que no se pudo recoger muestra de suelo. En los emplazamientos PV1, PV3 y PV4 se detectaron niveles de HCH por encima del LOD, pero solo en PV4 se superó el umbral legal de intervención (2 mg kg⁻¹). Los dos puntos de muestreo localizados en PV4 evidenciaron un foco de contaminación con concentraciones de $22,30 \pm 5,90$ mg kg⁻¹ y $27,50 \pm 2,92$ mg kg⁻¹. En ambos casos, β -HCH fue el isómero predominante con valores de $14,86 \pm 4,14$ mg kg⁻¹ y $17,58 \pm 2,94$ mg kg⁻¹, respectivamente.

Las concentraciones de HCH en suelos no mostraron relación aparente con la topografía, distancia al antiguo vertedero PV1, ni con el uso actual o histórico del suelo. Las muestras en las que se detectó HCH recogidas fuera de las fábricas o zonas históricamente contaminadas se localizaron en zonas de matorral, prados y bosques mixtos y seminaturales, sin signos claros de uso agrícola pasado o presente. Tampoco se observó un gradiente espacial de concentración con respecto al emplazamiento todavía contaminado, PV4 (Fig. R1). En conjunto, la distribución espacial del contaminante en O Porriño es difusa, con la excepción del foco de contaminación PV4.

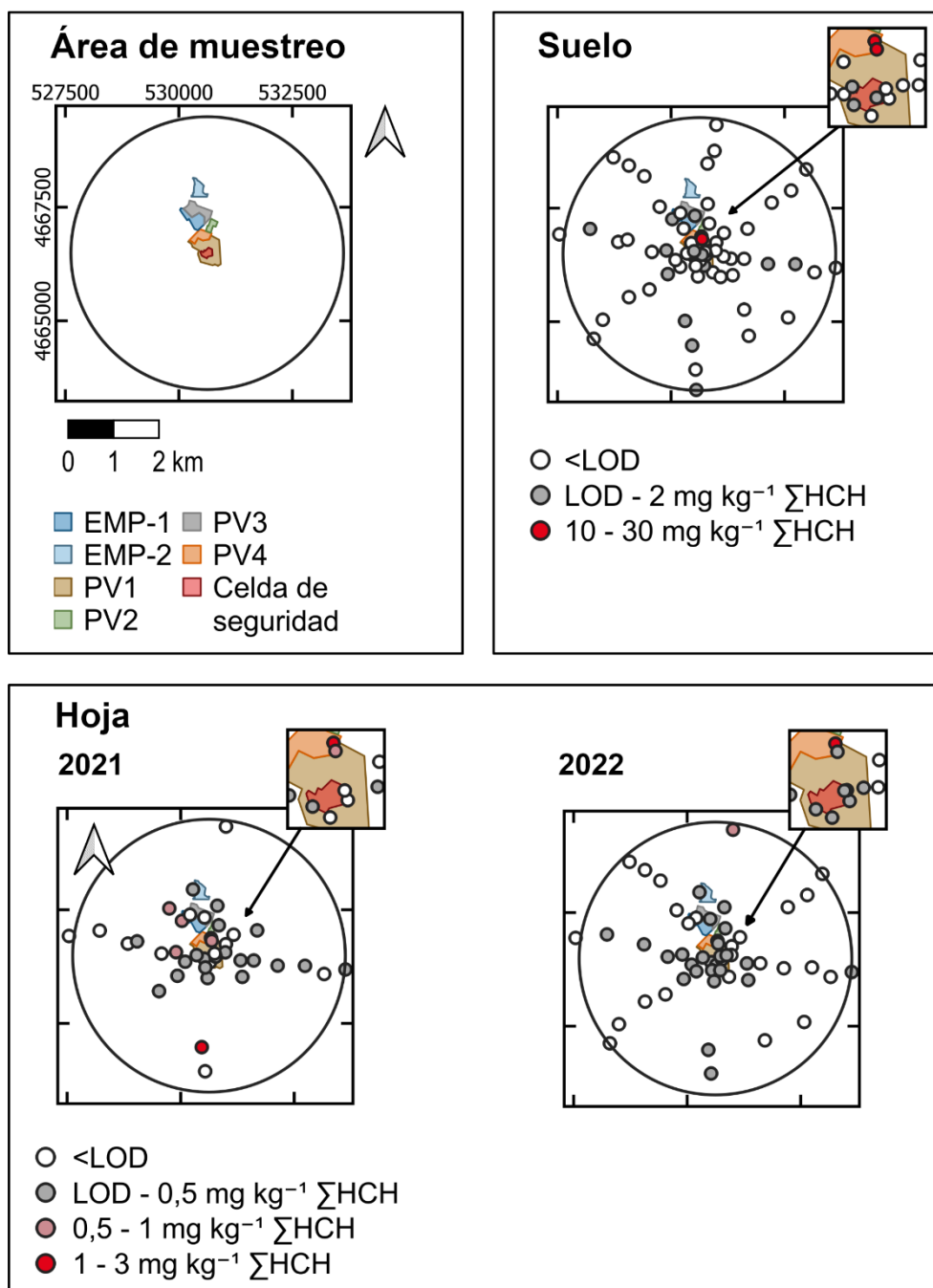


Fig. R1 Representación de los niveles de HCH en muestras de suelo y hoja de carballo (*Quercus robur*; datos en base a peso seco de O Porriño (NO Pontevedra) durante septiembre de 2021 y 2022.

En todas las muestras de hoja de carballo (*Q. robur*) recogidas en 2021 y 2022 se detectó HCH (Tabla R1). Las concentraciones medias detectadas de $\sum HCH$ fueron $0,33 \pm 0,48 \text{ mg kg}^{-1}$ en 2021 y $0,12 \pm 0,29 \text{ mg kg}^{-1}$ en 2022, observándose un descenso generalizado de los niveles de HCH de un año a otro. Los valores máximos en las dos campañas fueron similares: $2,79 \pm 0,51 \text{ mg kg}^{-1}$ en 2021 y $1,97 \pm 0,13 \text{ mg kg}^{-1}$ 2022. La composición de los isómeros de HCH cambió entre las dos campañas. En 2021, los isómeros más frecuentemente detectados fueron α -HCH (100 % de las muestras) y γ -HCH (49 %), mientras que en 2022, fueron β -HCH

(31 %) y δ -HCH (36 %). Los isómeros α - y γ -HCH disminuyeron en frecuencia y concentración en 2022, mientras que β - y δ -HCH incrementaron su presencia relativa, aunque sin cambios relevantes en sus niveles de concentración. La distribución espacial de HCH en hojas de carballo fue dispersa tanto en 2021 como en 2022 (Fig. R1). Los niveles máximos se registraron de forma consistente en PV4 en ambas campañas.

No se encontró una relación significativa entre los niveles de HCH en hojas y en el suelo subyacente, según la correlación de Pearson ($p < 0,05$), lo que sugiere que otros factores influyen en su acumulación.

4.1.2 Niveles de HCH en un emplazamiento históricamente contaminado

En septiembre de 2021 se realizó un muestreo basado en el trabajo de Rodríguez Garrido (2009), en el que se detectó HCH en prácticamente todas las muestras, con una concentración media de Σ HCH igual a $6,70 \pm 9,46$ mg kg⁻¹ (Tabla R2). Más de la mitad de las muestras superaron el umbral legal de intervención, con una distribución espacial heterogénea (Fig. R2). Algunos puntos mostraron concentraciones notablemente elevadas, como el punto 4 ($27,50 \pm 2,92$ mg kg⁻¹), el punto 11 ($8,41 \pm 0,72$ mg kg⁻¹) y el punto 16 ($22,30 \pm 5,89$ mg kg⁻¹).

Tabla R2 Concentración de HCH (mg kg⁻¹) en muestras de suelo superficial (0-20 cm) recogidas en un emplazamiento históricamente contaminado (PV4, O Porriño). Las muestras se recogieron en septiembre de 2021, mayo de 2022 y septiembre de 2022. Cuando la concentración fue inferior al límite de detección (LOD), se sustituyó por el 30 % de dicho valor.

	Mínimo	Máximo	Media \pm SD	Mediana	Frecuencia de detección (%)
Campaña 09/2021 ^a					
α -HCH	LOD	9,58	$1,85 \pm 3,32$	0,39	82
β - HCH	LOD	17,58	$4,77 \pm 6,11$	2,01	91
γ - HCH	LOD	0,19	$0,04 \pm 0,06$	LOD	36
δ - HCH	LOD	0,15	$0,03 \pm 0,04$	0,01	27
Σ - HCH	LOD	27,50	$6,70 \pm 9,46$	2,42	91
Campaña 05/2022 ^b					
α -HCH	LOD	5,22	$1,61 \pm 1,91$	0,52	50
β - HCH	LOD	22,46	$4,33 \pm 5,83$	2,30	69
γ - HCH	LOD	0,15	$0,05 \pm 0,05$	LOD	19
δ - HCH	LOD	0,20	$0,05 \pm 0,06$	LOD	31
Σ - HCH	LOD	27,90	$6,04 \pm 7,65$	2,73	56

	Mínimo	Máximo	Media \pm SD	Mediana	Frecuencia de detección (%)
Campaña 09/2022 ^c					
α -HCH	LOD	10,21	1,36 \pm 2,64	0,14	65
β -HCH	LOD	19,67	3,78 \pm 6,02	0,57	65
γ -HCH	LOD	1,59	0,01 \pm 0,38	0,01	35
δ -HCH	LOD	0,48	0,05 \pm 0,12	0,00	29
Σ -HCH	LOD	27,07	5,31 \pm 8,76	0,64	65

^a Número total de muestras: 11; LOD (α -, β -, γ -, δ - y Σ -HCH): 0,005; 0,012; 0,031; 0,044; 0,092 mg kg⁻¹

^b Número total de muestras: 16; LOD (α -, β -, γ -, δ - y Σ -HCH): 0,010; 0,011; 0,047; 0,031; 0,099 mg kg⁻¹

^c Número total de muestras: 17; LOD (α -, β -, γ -, δ - y Σ -HCH): 0,001; 0,001; 0,002; 0,001; 0,004 mg kg⁻¹

Tras confirmarse la presencia de altas concentraciones de HCH en PV4, se realizaron dos muestreos adicionales de suelo y hoja en mayo y septiembre 2022, con el objetivo de evaluar la variación estacional, y un muestreo de hojarasca en mayo 2022 para analizar el comportamiento del HCH en el sistema suelo-planta.

Los rangos de concentración de HCH en suelo fueron similares en las tres campañas (Tabla R2; LOD - 27 mg kg⁻¹). Para comparar los resultados entre la campaña de mayo y septiembre de 2022 y evaluar la variación estival se aplicó un test de Wilcoxon pareado para datos no normales, sin encontrarse diferencias significativas. En ambas campañas los puntos con mayor concentración de Σ HCH fueron 7, 8 y 12. En mayo (Fig. R2), las concentraciones fueron 27,90 \pm 4,27 mg kg⁻¹, 10,89 \pm 1,02 mg kg⁻¹, 16,49 \pm 3,44 mg kg⁻¹, respectivamente. En septiembre (Fig. R2), se midieron 26,06 \pm 7,97 mg kg⁻¹, 27,07 \pm 9,99 mg kg⁻¹, 11,86 \pm 3,28 mg kg⁻¹ en los mismos puntos. En los puntos 4, 11 y 16, con mayor contaminación en 2021, las concentraciones de HCH disminuyeron en 2022.

En 2022 se recogieron muestras de hoja de carballo en cuatro direcciones cardinales respecto a PV1 (NE, SE, SO y NO) para evaluar la posible influencia del viento. Según el análisis utilizando la prueba de Friedman ($k > 2$ grupos, datos no normales) no se encontraron diferencias significativas entre las direcciones; la dirección del viento no fue un factor determinante en la acumulación de HCH. Por consiguiente, las muestras recogidas en dirección SO (hacia PV1) se escogieron para la comparación de datos entre las campañas de 2021 y 2022 (Fig. R3). En hojas de carballos se detectaron concentraciones de Σ HCH entre 0,28 \pm 0,00 y 2,80 \pm 0,51, en septiembre de 2021, entre 0,11 \pm 0,02 mg kg⁻¹ y 0,51 \pm 0,12 mg kg⁻¹ en mayo de 2022 y entre 0,32 \pm 0,01 mg kg⁻¹ y 2,03 \pm 0,15 mg kg⁻¹ en septiembre de 2022. El β -HCH fue el isómero más abundante en todas las muestras.

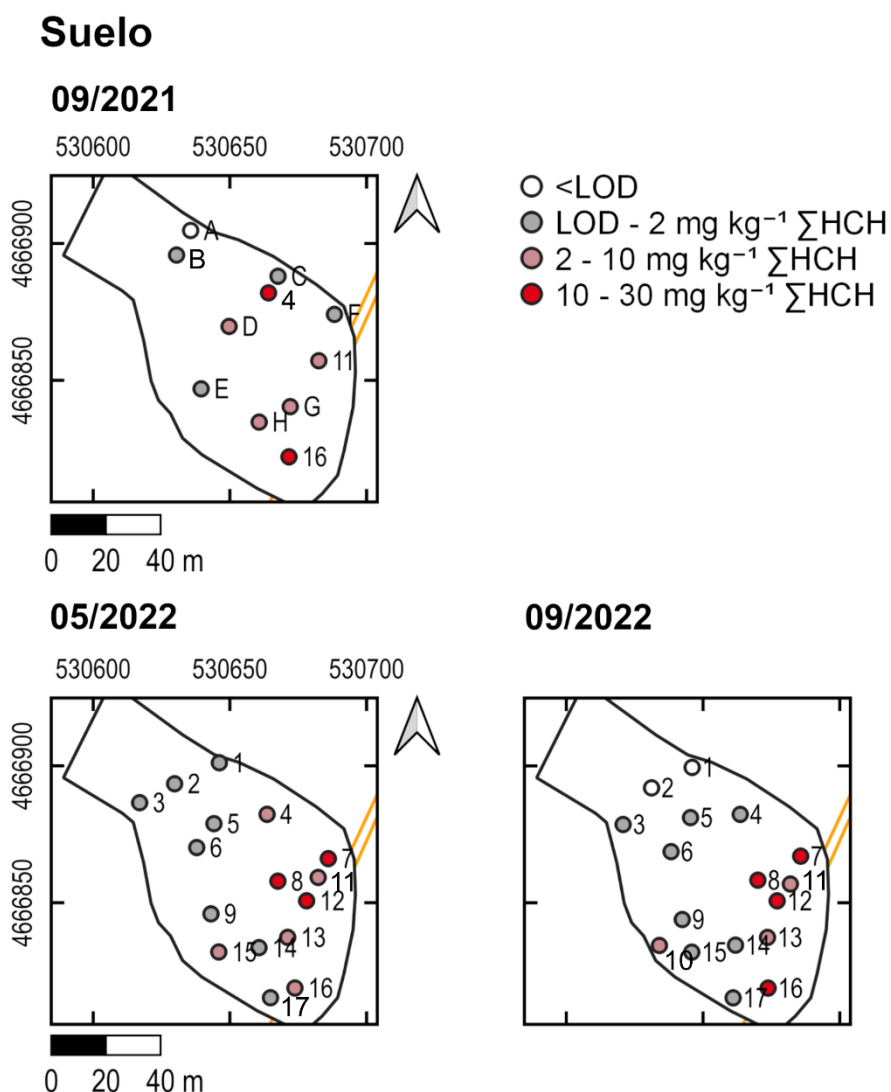


Fig. R2 Distribución espacial de $\sum HCH$ o suma de isómeros (mg kg^{-1}) en muestras de suelo de un área históricamente contaminada (PV4, O Porriño) en septiembre de 2021, mayo de 2022, y septiembre de 2022. Los puntos se identifican con letras (2021) o números (2022) según el diseño de muestreo, excepto cuando hay un carballo o pino que se mantiene el número.

En general, las hojas de carballo presentaron concentraciones más elevadas tras el verano, en concordancia con el ciclo fenológico del carballo. De nuevo, se aplicó un test de Wilcoxon pareado para datos no normales, sin encontrarse diferencias significativas en las concentraciones de los isómeros α -, β - o γ -HCH ni en $\sum HCH$ entre las campañas. En contraste, δ -HCH mostró un incremento significativo en mayo de 2022 respecto a septiembre de 2021, aunque esta diferencia debe interpretarse con cautela dado el reducido tamaño muestral ($n = 4$). El punto 4 destacó de forma consistente como el de mayor acumulación de HCH en hojas en las tres campañas (Fig. R3): $2,80 \pm 0,51 \text{ mg kg}^{-1}$ en septiembre 2021, $0,51 \pm 0,12 \text{ mg kg}^{-1}$ en mayo 2022 y $1,97 \pm 0,13 \text{ mg kg}^{-1}$ en septiembre 2022. En septiembre de 2022 se observó también un aumento notable en el punto 10, que alcanzó $2,03 \text{ mg kg}^{-1}$, es decir, entre 6 y 9 veces más que en campañas anteriores.

Se analizó la relación entre la concentración de HCH en muestras de suelo y hoja de carballo de las tres campañas utilizando el coeficiente Tau de Kendall (datos no normales y tamaño muestral reducido); el análisis mostró una tendencia positiva débil pero no significativa ($\tau = 0,23$ y $p = 0,22$).

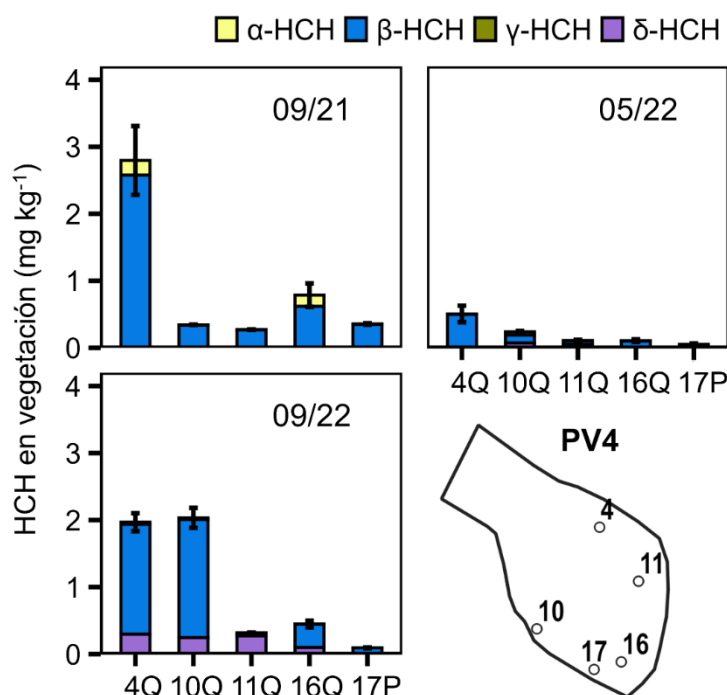


Fig. R3 Distribución de isómeros de HCH en hojas de *Quercus robur* (Q) y acículas de *Pinus pinaster* (P) recogidas en un área históricamente contaminada (PV4, O Porriño). Concentraciones en base a peso seco. Puntos de muestreo: 4, 10, 11 y 16 (*Q. robur*), y 17 (*P. pinaster*).

Las acículas de pino muestreadas en mayo y septiembre de 2022 se analizaron diferenciando los años de crecimiento. En mayo se examinaron acículas en cuatro años de crecimiento, observándose un ligero incremento de $0,03 \pm 0,00\ mg\ kg^{-1}$ a $0,07 \pm 0,00\ mg\ kg^{-1}$ con el tiempo. El β -HCH se detectó de forma constante por encima del límite de detección, mientras que el α -HCH solo se detectó en el cuarto año de crecimiento. En septiembre, se analizaron acículas de tres años de crecimiento, con concentraciones de $0,05 \pm 0,00\ mg\ kg^{-1}$ a $0,11 \pm 0,01\ mg\ kg^{-1}$, detectándose únicamente β -HCH.

Para comparar los datos de acículas recogidas en 2022 con las muestras de 2021, año en el que no se distinguieron las acículas por años de crecimiento, se utilizaron las concentraciones medias de todos los años de crecimiento de 2022 (Fig. R3; 17P). Las concentraciones disminuyeron de $0,36 \pm 0,01\ mg\ kg^{-1}$ en 2021 a $0,05 \pm 0,02\ mg\ kg^{-1}$ en mayo de 2022 y $0,09 \pm 0,01\ mg\ kg^{-1}$ en septiembre de 2022.

En la hojarasca recogida en mayo 2022, las concentraciones de $\sum HCH$ oscilaron entre $0,17 \pm 0,02\ mg\ kg^{-1}$ y $6,37 \pm 3,26\ mg\ kg^{-1}$, con una media de $2,08 \pm 1,87\ mg\ kg^{-1}$ y una mediana de $1,87\ mg\ kg^{-1}$. La distribución espacial fue relativamente uniforme (Fig. R4). El isómero predominante fue β -HCH, en concordancia con lo observado en las hojas frescas y en el suelo.

Los puntos con mayores concentraciones de HCH en hojarasca no coincidieron necesariamente con aquellos que presentaban los niveles más elevados en el suelo. Para evaluar esta relación, se calculó el coeficiente Tau de Kendall a partir de los datos de suelo de las dos campañas de 2022, sin encontrarse correlación significativa.

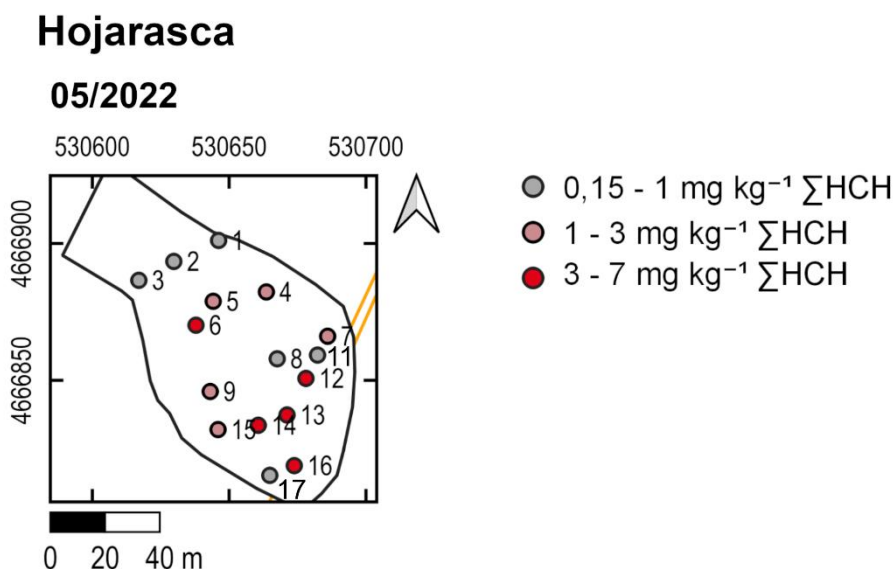


Fig. R4 Distribución espacial de Σ HCH o suma de isómeros (mg kg^{-1}) en un área históricamente contaminada (PV4, O Porriño) en muestras de hojarasca recogidas en mayo de 2022 (concentraciones referidas a peso seco). Los puntos se identifican con letras (2021) o números (2022) según el diseño de muestreo, excepto cuando hay un carballo o pino que se mantiene el número.

En O Porriño, PV4 se identificó como la principal fuente de contaminación, con más de la mitad de las muestras de suelo que superaron el umbral legal de 2 mg kg^{-1} y concentraciones máximas de Σ HCH iguales a 27 mg kg^{-1} . Comparando con los estudios realizados entre 2001 y 2008 en PV4, en los que se registraron concentraciones en suelo superficial de hasta $19.905 \text{ mg kg}^{-1}$ (Calvelo Pereira et al., 2006), las concentraciones actuales representan una reducción de entre dos y tres órdenes de magnitud. El isómero predominante era α -HCH con un enriquecimiento en β -HCH con respecto al residuo original, y en la actualidad este último es el isómero predominante.

Las observaciones de campo sugieren que el terreno de PV4 ha sido alterado (Fig. R5): la parcela se amplió hacia el noroeste, donde se detectaron las concentraciones más bajas (Fig. R2), y se observaron indicios de movimientos de tierra. Además, se observó un cambio en la composición de la vegetación en la parcela. No se encontraron especies que anteriormente crecían de forma espontánea, como *Chenopodium* spp., *Solanum nigrum* L. y *Cytisus striatus* (Hill) Roth (Barriada-Pereira et al., 2005; Calvelo Pereira et al., 2006). En su lugar, aparecieron nuevas especies no registradas previamente en el área, como *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn in Kerst. y *Robinia pseudoacacia* L.



Fig. R5 Comparación de un área contaminada por HCH (PV4, O Porriño) en los años 2001 y 2021. En 2021 se observaron en campo movimientos de tierras y una expansión de la parcela hacia el oeste. En 2021 se detectaron en el suelo niveles de HCH tres órdenes de magnitud inferiores a los registrados en 2001.

4.1.3 Discusión

Los niveles de HCH detectados en suelos de O Porriño fuera de PV4 fueron más altos que los registrados en otras regiones. Por ejemplo, en Campania (Italia), una zona agrícola con uso intensivo de pesticidas, se encontraron concentraciones de entre $0,03$ y $17,3 \text{ ng g}^{-1}$ (Qu et al., 2016), y $\leq 0,72 \text{ ng g}^{-1}$ en un estudio posterior (Qu et al., 2019). En bosques de Moldavia, los niveles fueron de $1,1$ a $9,8 \text{ ng g}^{-1}$ peso seco (Tarcau et al., 2013) y en regiones de China, como Zhejiang y Quanzhou Bay, se detectaron medias de $6,8 \pm 10,2 \text{ ng g}^{-1}$ y 2 ng g^{-1} , respectivamente (Yang et al., 2013; Zhang et al., 2011). En Galicia, el valor de fondo para suelos agrícolas es de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (Calvelo Pereira et al., 2010b). En contraste, en zonas altamente contaminadas, se alcanzan concentraciones mucho mayores, como ocurre cerca de la fábrica de lindano India Pesticides Ltd. (IPL) (Lucknow), con hasta $1.654,7 \text{ mg kg}^{-1} \alpha\text{-HCH}$ (Wu et al., 2019); o en Bitterfeld-Wolfen (Alemania), cerca de la antigua fábrica de lindano Chemiekombinat Bitterfeld, con hasta $13,26 \pm 0,26 \text{ mg kg}^{-1} \alpha\text{-HCH}$ y $7,90 \pm 0,24 \text{ mg kg}^{-1} \beta\text{-HCH}$ (Liu et al., 2022).

La composición isomérica de las muestras de suelo permite interpretar el origen del HCH. Una proporción $\alpha/\gamma > 1$ se asocia con el uso de HCH técnico, mientras que $\alpha/\gamma < 1$, sugiere el uso de HCH técnico y posterior sustitución por lindano. El predominio de α -HCH, se relaciona con el transporte atmosférico a larga distancia y el enriquecimiento en β -HCH con contaminaciones antiguas debido a su mayor estabilidad y persistencia (Calvelo Pereira et al., 2010b, 2006). Los resultados de este trabajo coinciden con este patrón: β -HCH fue mayoritario en PV4, la fuente de contaminación primaria, y α -HCH predominó en zonas alejadas, probablemente debido a su volatilización y posterior transporte atmosférico. La dirección del viento predominante fue norte-noreste durante los días de muestreo (24 de septiembre de 2021 y del 20 al 22 septiembre de 2022), pero la distribución espacial del α -HCH no seguía esta dirección.

Las hojas de carballo no cuentan con valores normativos específicos para HCH que permitan evaluar el riesgo de las concentraciones detectadas. Al comparar los valores obtenidos con el límite de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ para α -, β - y γ -HCH fijado por el Reglamento (CE) 396/2005 (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2005) para vegetales de consumo, se observa que las muestras de O Porriño tienen concentraciones más altas (Tabla R1). Esto muestra que el carballo puede acumular HCH en niveles relevantes y que el contaminante está presente en el entorno. No obstante, las concentraciones detectadas en O Porriño fueron inferiores a las registradas en vegetación de otros escenarios severamente contaminados (con hasta $44 \text{ mg kg}^{-1} \sum\text{HCH}$; Abhilash et al., 2008; Liu et al., 2022; Wu et al., 2019). Las concentraciones de HCH en las hojas recogidas en PV4 fueron notablemente superiores a las detectadas fuera de este emplazamiento, con valores máximos de $2,79 \pm 0,51 \text{ mg kg}^{-1} \sum\text{HCH}$ en 2021 y $1,97 \pm 0,13 \text{ mg kg}^{-1} \sum\text{HCH}$ en 2022.

La falta de correlación significativa entre las concentraciones de HCH en suelo y en hoja de carballo indica que la transferencia del contaminante a la planta no está únicamente determinada por los niveles en el suelo subyacente. Esto junto con la predominancia de α -HCH en suelos alejados de PV4 y la presencia de HCH en hojas, sugiere que la vía de transferencia del contaminante ocurre principalmente por vía atmosférica: volatilización desde suelos contaminados, transporte en fase gaseosa o particulada y deposición seca o húmeda sobre la superficie foliar. Estudios previos han informado de una mayor acumulación de HCH en la biomasa aérea, atribuida a la volatilización y posterior deposición del contaminante (Calvelo Pereira et al., 2006), así como del transporte gaseoso de α -HCH bajo condiciones controladas (Liu et al., 2021a).

La acumulación de contaminantes orgánicos en hojas depende de sus propiedades fisicoquímicas, las condiciones meteorológicas y las características de la planta, como la superficie específica de la hoja, la estructura y cantidad de ceras cuticulares, la morfología, la edad y la tasa de transpiración (Abhilash et al., 2008; De Nicola et al., 2011; Liu et al., 2022). En el caso del HCH, las propiedades fisicoquímicas varían entre isómeros. El isómero α -HCH, más volátil, y γ -HCH, con valores intermedios de volatilidad (Tabla I1), presentan valores del coeficiente de partición octanol-aire o $\log K_{oa} < 8,5$ que permiten su difusión desde la fase gaseosa al interior de la hoja hasta alcanzar un equilibrio aire-hoja (Cousins y Mackay, 2001). Por el contrario, los isómeros δ -HCH y β -HCH tienen valores de $\log K_{oa}$ más elevados

que dificultan su difusión desde la atmósfera hacia la hoja, aunque pueden tener afinidad por ceras cuticulares y acumularse en la superficie foliar.

Las variaciones observadas entre campañas en la composición isomérica de HCH en hojas de carballo (descenso de α - y γ -HCH y aumento relativo de β - y δ -HCH en 2022) pueden explicarse por la combinación de estos factores fisicoquímicos y de las condiciones meteorológicas durante el muestreo. El 24 de septiembre de 2021 se registró una temperatura media de 17,7 °C, humedad relativa del 96 %, 2 L m⁻² de precipitación acumulada y viento medio de 2,4 km h⁻¹. Bajo estas condiciones frescas y húmedas, es probable que la precipitación favoreciera la deposición húmeda, facilitando el arrastre atmosférico de contaminantes y aumentando la acumulación de HCH en las hojas. En particular, α - y γ -HCH, con tendencia a la fase gaseosa, mostraron una mayor absorción foliar en estas condiciones. En contraste, durante el muestreo realizado entre el 20 y 22 de septiembre de 2022, se registraron condiciones más secas y cálidas, con una temperatura media de 20,3 °C, una humedad relativa del 86,7 %, ausencia de precipitaciones y una velocidad media del viento de 3,4 km h⁻¹. Estas condiciones habrían favorecido la deposición seca, lo que podría explicar la disminución general de los niveles de HCH en las hojas, así como la mayor frecuencia de detección de β - y δ -HCH, más lipofílicos y persistentes. No obstante, estudios previos sobre la variación estacional de HCH en aire y vegetación muestran un incremento del contaminante con el aumento de las temperaturas, asociado a su revolatilización desde el suelo (Abhilash y Singh, 2009; Kylin y Sjödin, 2003; Zhu et al., 2017). Liu et al., (2022) relacionaron las variaciones de HCH en árboles observadas durante un año de crecimiento con las condiciones meteorológicas, el crecimiento de la planta y la transformación del contaminante. Considerando la absorción radicular como vía de entrada, asociaron las concentraciones más altas a una fase de crecimiento activo, coincidiendo con un mayor consumo hídrico, y las concentraciones más bajas a un período con menor consumo de agua y mayor transformación del contaminante. La transformación del HCH ha sido corroborada por otros autores. Wu et al. (2019a) detectaron la transformación de α - y β -HCH en muestras vegetales, mientras que Liu et al. (2021b), utilizando un sistema hidropónico que excluía el efecto rizosférico, demostraron que la transformación de α -HCH podría atribuirse a la acción de enzimas o microorganismos endófitos, aunque esto no sería aplicable al β -HCH. Asimismo, Becerra-Castro et al. (2011) citaron la presencia de bacterias degradadoras de HCH en distintas partes de *Cytisus striatus* (retama). En conjunto, estos estudios evidencian que el intercambio de contaminante entre el suelo y la planta es dinámico y complejo, por lo que los datos obtenidos a partir de muestras vegetales para realizar *phytoscreening* o biomonitorización deben interpretarse con cautela.

La bioacumulación de contaminantes orgánicos en las especies vegetales no solo depende del contaminante y de las condiciones meteorológicas, sino también de características de la planta como la morfología, la superficie foliar efectiva, la estructura de la hoja o el contenido lipídico. Aunque las acículas de pino presentan un mayor contenido lipídico, en PV4 las concentraciones de HCH fueron menores en *P. pinaster* que en *Q. robur* (Fig. R3). Trabajos previos han comparado la acumulación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en pino y carballo. De Nicola et al. (2017) observaron una acumulación preferente de PAHs de

bajo peso molecular (en fase gaseosa) en *P. pinaster*, y de PAHs de medio y alto peso molecular (asociados a partículas) en *Q. robur*. Las hojas de carballo tienen mayor rugosidad y presencia de tricomas y ceras que podrían favorecer la deposición y retención de contaminantes en fase particulada. Así pues, la acumulación del isómero β -HCH, que presenta mayor afinidad por la fase particulada y fue el predominante en las hojas analizadas, podría verse favorecido de forma análoga a los PAHs de mayor peso molecular.

Los datos obtenidos en las muestras de hojarasca recogidas en PV4 sugieren que esta es un compartimento clave en la dinámica del HCH en PV4. Las concentraciones de HCH fueron superiores en la hojarasca que en las hojas y acículas analizadas y mostraron una distribución espacial relativamente homogénea. Esto indica que la hojarasca podría actuar como un reservorio y una potencial fuente secundaria de contaminación del suelo. Durante el crecimiento de la planta, el HCH se acumula en la biomasa aérea por volatilización y posterior deposición sobre la superficie foliar; posteriormente, al caer las hojas y descomponerse, el contaminante puede reincorporarse al suelo, generando aportes episódicos y contribuyendo a la persistencia del HCH en el sistema. La ausencia de correlación entre los datos de suelo y hojarasca sugiere que otros procesos, como la degradación microbiana, la volatilización del contaminante o incluso la remoción de hojarasca antes de su descomposición, podrían estar influyendo en los resultados.

En PV4, la comparación de las concentraciones actuales en muestras de suelo superficial con las registradas hace dos décadas revela una reducción de entre dos y tres órdenes de magnitud. Esta disminución puede atribuirse a una combinación de procesos: movimientos de tierra y posibles actuaciones de retirada o enterramiento de suelos contaminados, cambios en la vegetación, volatilización estival de α -HCH, degradación biológica y almacenamiento temporal del contaminante en la biomasa aérea de la vegetación y en la hojarasca. Se han descrito procesos de atenuación natural similares en otros emplazamientos, como el vertedero de Bailín (Aragón), donde entre 2014 y 2022 la cantidad de HCH se redujo de 170 kg a 2,4 kg de HCH gracias principalmente a la volatilización y degradación *in situ*, con una pequeña fracción retenida en la vegetación (Hernández et al., 2025a). Con el tiempo se ha observado un enriquecimiento en β -HCH coherente con sus propiedades fisicoquímicas (alta persistencia, baja movilidad y fuerte sorción al suelo) y una eliminación casi completa de los isómeros γ -HCH y δ -HCH.

También se observó una disminución del HCH en muestras de vegetación en comparación con los datos documentados hace dos décadas. En hojas de *Cytisus striatus* se midieron concentraciones de hasta 62,5 mg kg⁻¹ en estudios realizados en los años 2000 (Barriada-Pereira et al., 2005; Calvelo Pereira et al., 2006). Las concentraciones inferiores en hojas de *Quercus robur* probablemente se deban a la reducción general de la contaminación en PV4 y a diferencias inter-específicas en la bioacumulación.

En conjunto, este trabajo confirma que la contaminación por HCH en el área de estudio está fuertemente localizada en PV4 y dominada por β -HCH en suelos y vegetación, mientras que α -HCH desempeña un papel relevante en procesos de volatilización y transporte

atmosférico. Las hojas de carballo demostraron capacidad para acumular HCH y reflejar diferencias interanuales de concentración y composición isomérica, condicionadas por las propiedades de los isómeros, los mecanismos de entrada en la planta y las condiciones meteorológicas durante el muestreo. Aunque *Q. robur* presenta potencial como biomonitor, la alta variabilidad observada indica que su uso en estudios de biomonitorización debe abordarse con cautela. Finalmente, la presencia de concentraciones que aún superan los límites legales en PV4, pese a la clara disminución respecto a décadas anteriores, subraya la persistencia de este contaminante y la urgencia de implementar medidas de remediación en este emplazamiento.

4.2 BIOSORPTION OF HCH IN MOSSES

Moss clones of *Fontinalis antipyretica* (aquatic moss) and *Sphagnum palustre* (terrestrial moss) were examined through adsorption experiments with HCH in both the aqueous and gas phases, and the results were related to histochemical and molecular characteristics in order to elucidate the mechanisms underlying HCH uptake and to assess the potential of these moss species as biomonitors of HCH.

4.2.1 Liquid phase batch biosorption experiment

Based on data from the biosorption experiment, in which the moss was exposed to a solution of 5 mg L⁻¹ of HCH that was replaced until the concentration in the water stabilised, adsorption isotherms were obtained and used to evaluate the biosorption capacity of moss tissues in water (Fig. R6).

The α -, β -, γ -, and δ -HCH curves for the two mosses species are shown, along with the experimental data and the results of fittings to Linear and Freundlich adsorption models, in Fig. R6. Overall, both the order of retention of isomers (δ -HCH > γ -HCH > α -HCH > β -HCH) and the proportion of each relative to the Σ HCH retained (55-61%, 29-24%, 16-13 % and 2 %, for δ -, γ -, α -, and β - HCH, in *F. antipyretica* and *S. palustre* respectively) were quite similar for both species. However, there were some notable differences in the retention of the different isomers and species. For *F. antipyretica*, the amount of HCH isomers adsorbed tended to increase with the increase in the concentration of HCH added, although the maximum adsorption capacity of the moss tissues was not reached under the experimental conditions (a slight decrease in the retention of δ - and γ -HCH was observed in the last additions). The adsorption capacity of *S. palustre* was much lower than that of *F. antipyretica* (almost four times lower at the end of the experiment) and reached saturation with δ -HCH on the 4th addition, with γ -HCH, on the 5th addition, with α -HCH on the 6th addition and with β -HCH on the 10th addition. This explains the difference in the data for both species observed in Fig. R6.

With few exceptions, the percentage of variance in the moss HCH concentration explained by the HCH added was higher than 70 %, and in almost a third of the cases, it was higher than 90 %. For model reliability, adjusted determination coefficients and the p-value for the Chi-Square test were compared (Fig. R6). The Freundlich model provided a better fit for the sorption data, except for α - and β -HCH in *F. antipyretica*. *F. antipyretica* showed higher affinity for HCH isomers because the K_D and K_F values were higher than for *S. palustre* (Fig. R6, K_D

between 2.3 and 6 times higher and K_F between 4 and 5.5 times, except for α -HCH, for which they were quite similar). The low K_D and K_F values (< 1) indicated the very low affinity of this species. Ranking of affinities for each isomer differed between species: δ -HCH $>$ β -HCH $>$ α -HCH \approx γ -HCH in *F. antipyretica*; and α -HCH $>$ δ -HCH $>$ γ -HCH $>$ β -HCH in *S. palustre*. For both species, rankings of isomer affinities did not follow the same order as the concentrations of isomer added.

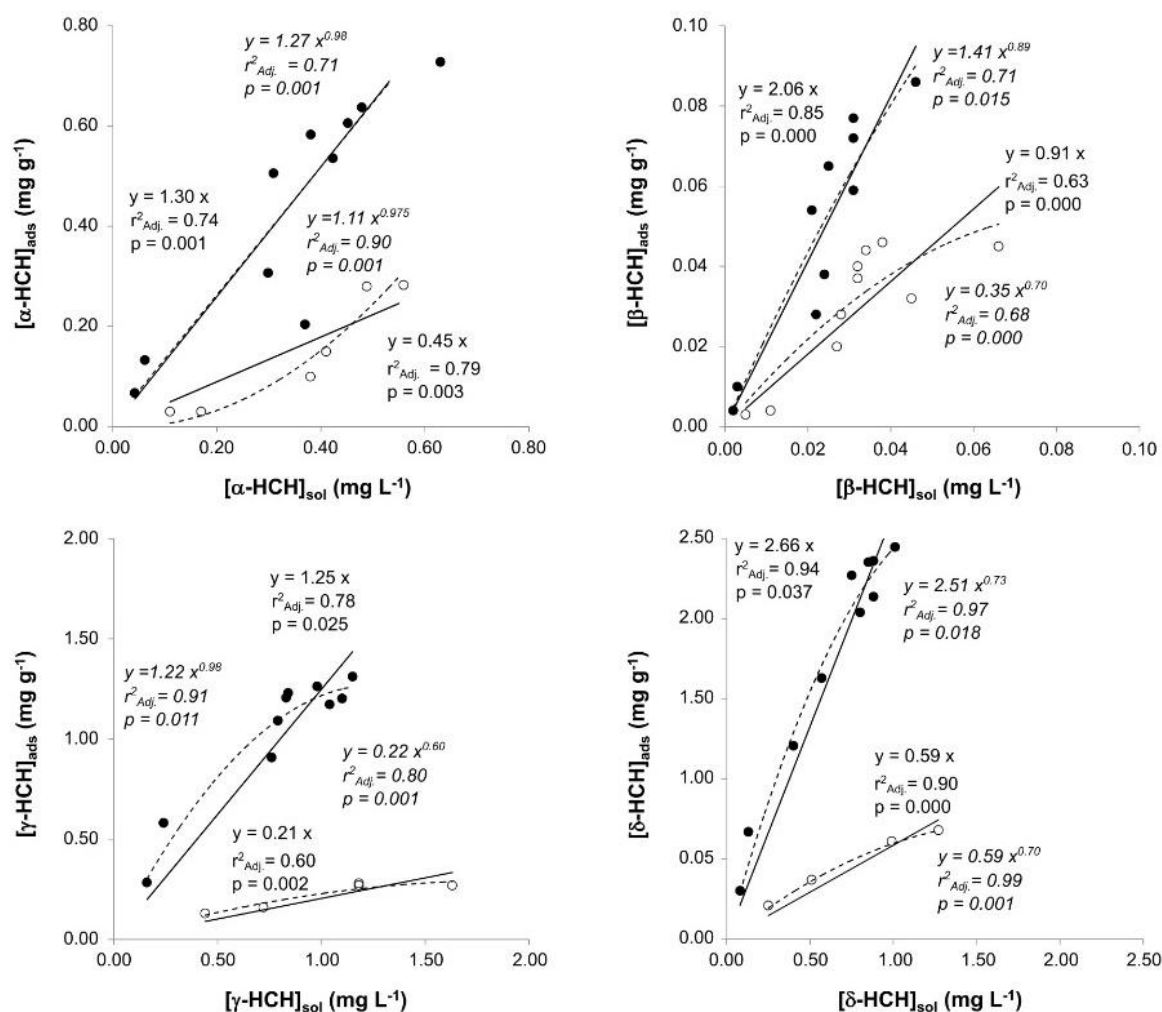


Fig. R6 Adsorption of individual HCH isomers on devitalized clones of the mosses *Fontinalis antipyretica* (black dots) and *Sphagnum palustre* (open dots) after 10 consecutive additions of HCH. Each dot represents the mean value of five replicates. The lines represent Freundlich (dotted lines) and Linear (solid lines) isotherms. The equations for each isotherm are also shown (Freundlich in italics, Linear in regular typeface, where x is the HCH concentration in the aqueous phase at the equilibrium ($mg L^{-1}$); y is the mass of solute sorbed (HCH) per unit mass of sorbent (moss) ($mg g^{-1}$); constants are K_F ($mg^{1-1/n} L^{1/n} g^{-1}$) in the Freundlich isotherm and K_D ($mg g^{-1}$) in the linear isotherm; and the power value in the Freundlich isotherm represents $1/n$ (intensity of the adsorption or surface heterogeneity, unitless). The adjusted determination coefficient ($r^2_{Adj.}$) and the p-value of the Chi-Square test (p) are also shown.

The relationship between the logarithms of the affinity coefficient (K_F or K_D) and the n-octanol/water partition coefficient (K_{ow}) was also studied. Relationships were only observed for *F. antipyretica* (Appendix 1), with a significant regression ($p < 0.05$) for $\log K_F$ (with a

slope value close to 1) and the same ranking of the variables compared in the case of $\log K_D$. Regressions between these affinity coefficients and isomer sizes were also calculated but were not significant in any case.

4.2.2 Gas phase biosorption experiment

After 50 min of active air sampling (1 m³) using a solid-phase extraction method, 100 % Σ HCH was recovered in the control (Florisol®), with very little loss of HCH to the second glass tube. Recoveries of HCH-isomers retained in Florisol® ranged between 89 and 123 %, with a low relative standard deviation (% RSD = 5 - 8). Notably, the isomer recoveries followed the sequence δ -HCH > α -HCH > β -HCH > γ -HCH (Table R2). The moss species exhibited different retention rates; thus, while the amount of Σ HCH retained by *F. antipyretica* was similar to the control (113 %), *S. palustre* only retained 32% of the Σ HCH (Table R2). Different recoveries of HCH isomers were also observed. When studying *F. antipyretica*, δ - and β -HCH isomers exhibited higher recoveries than α - and γ -HCH, although all were approximately 100%. By contrast, in *S. palustre* differences between the isomers δ/β and α/γ were more evident. Although all recoveries were < 70%, α - and γ -HCH showed particularly low recoveries. The low recovery of α -HCH (10%) and non-existent retention of γ -HCH probably resulted from the transfer of these isomers into the second glass tube (97 % and 73 %, respectively) or loss within the system.

Table R2 Efficiency of the gaseous sorption of HCH in *Fontinalis antipyretica* and *Sphagnum palustre*, expressed as percentage recovery (relative standard deviation between brackets) of the HCH added. Sampler 1 included moss tissues or Florisol® (control) and Sampler 2 only Florisol®.

Isomer	Sampler 1 (Florisol® or moss)			Sampler 2 (Florisol®)		
	Florisol®	<i>F. antipyretica</i>	<i>S. palustre</i>	Florisol®	<i>F. antipyretica</i>	<i>S. palustre</i>
α -HCH	96(5)	96(3)	10(4)	28(14)	19(30)	97(5)
β -HCH	93(5)	114(8)	51(4)	6(64)	1(22)	23(42)
γ -HCH	89(8)	111(3)	0(-)	7(51)	3(86)	73(6)
δ -HCH	123(5)	129(4)	69(7)	2(173)	0(-)	20(35)
Σ HCH	100(6)	113(3)	32(5)	11(34)	6(38)	53(12)

4.2.3 Discussion

The results of both the liquid and gas biosorption experiments indicate that *F. antipyretica* adsorbed more HCH than *S. palustre*. Based on previous research comparing these two mosses for monitoring aquatic and atmospheric metal contamination (Deben et al., 2016; García-Seoane et al., 2023), we hypothesized that *F. antipyretica* would have a greater capacity to retain HCH in water, while *S. palustre* would be more effective at retaining HCH in the atmosphere. Nevertheless, the results of the interspecies comparison for HCH differed from those reported for metals, which apparently indicates that the loading mechanisms are completely different. Contrary to our expectations, the adsorption capacity of the aquatic moss

F. antipyretica was higher than that of *S. palustre* in both gaseous and liquid environments and the former retained greater amounts of all HCH isomers.

The ability to adsorb lipophilic compounds such as persistent organic pollutants (POPs) may be related to the specific surface area and the presence of lipids, mainly on the cell wall surface and the external side of the membrane. In the case of devitalised mosses, the internal surface may also be important. These different sorption capacities and the varying thresholds of HCH isomer saturation observed in the two mosses are likely to be due to species-specific factors involved in the HCH-moss interaction mechanism. Staining with Sudan Black B revealed the presence of numerous lipids (a wide variety of lipids such as protein bound lipids, phospholipids, sterols and neutral triglycerides) in the walls of most *F. antipyretica* cells (Appendix 1). By contrast, the hyalocyst of *S. palustre* did not appear to contain these compounds, and the other cells did so to a lesser extent (Appendix 1). The results of the molecular characterization of these species (Appendix 1) are consistent with the staining results, showing that the fatty acid signal is more intense in *F. antipyretica*; the higher peaks of C28 and acetylenic fatty acids were particularly noteworthy. Furthermore, the similarity in fatty acid patterns observed using THM-GC-MS of the bulk samples and GC-MS of the total lipid extracts indicates that they mainly correspond to readily extractable epicuticular structures. The differences in molecular composition, which can be attributed to the epicuticular structures, can be assumed to be responsible for the differences in staining (which is consistent with the absence of staining in young *F. antipyretica* phyllids in which the cuticle is still undeveloped). These results are consistent with those of the sorption experiments: (i) the liquid phase batch biosorption experiment, in which *F. antipyretica* exhibited a higher adsorption capacity and higher affinities for all the isomers (Fig. R6); and (ii) the gas phase biosorption experiment, in which the result was surprising, with recoveries of approximately 100 % for all isomers in *F. antipyretica* (in all cases even higher than Florisil®) (Table R2). The latter can be attributed to the fact that this was the first time this method has been used in mosses and that these are the first data obtained for any moss species.

Regarding the adsorption processes, the best fit model in the liquid phase biosorption experiment differed between moss species and between HCH isomers (Fig. R6). For *F. antipyretica*, adsorption of α - and β -HCH increased proportionally with the amounts of HCH added (linear isotherm), but this was not observed for γ - or δ -HCH (Freundlich isotherm). This can be explained by the fact that the isotherms are usually linear at low sorbate concentrations (Delle Site, 2001), as in the case of α - and β -HCH, with the same adsorption energy for all binding sites. Thus, the inclusion of the parameter $1/n$ in the Freundlich equation is not necessary ($n \approx 1$ in both cases). However, for γ - and δ -HCH the value of this parameter was < 1 , indicating that as the solute concentration increases, the adsorption energy decreases. In the case of *S. palustre*, all isomers fitted better to the Freundlich isotherm, probably due to the lower concentration at which saturation occurs relative to the other species. For β -, γ - and δ -HCH, $1/n < 1$, while for α -HCH, the value of this parameter was > 1 , indicating a different interaction between this isomer and moss. The fact that moss saturation with HCH isomers

occurred at different stages suggests that there was no competition between the isomers evaluated.

Factors such as the size of the molecule and partition coefficients (Delle Site, 2001), which are related to structural differences (particularly the axial or equatorial position of the chlorine atoms; (Xiao et al., 2004), can influence the interactions between the HCH isomers and the moss. Regarding the n-octanol/water partition coefficient, in the liquid phase batch biosorption experiment, this relationship was only fulfilled in *F. antipyretica*, but not in *S. palustre*. By analysing the liquid phase of the same clone of *F. antipyretica*, Carrieri et al. (2021) found that PAH contents in transplants were positively correlated ($p < 0.01$) with PAH solubility and negatively correlated ($p < 0.01$) with $\log K_{ow}$. In the gaseous phase biosorption experiment, the ranking of $\log K_{oa}$ (β -HCH \approx δ -HCH $>$ γ -HCH $>$ α -HCH; Waclawek et al., 2019) was consistent with the recoveries in *S. palustre*, but not in *F. antipyretica*, in which recoveries were approximately 100 % for all isomers and ranking was therefore not possible. These results indicate that the stereochemistry of the isomer plays an important role in retention on the moss surface. Regarding the size of molecules, the lack of any significant correlations can be attributed to the similarity in size of the different isomers.

In previous passive biomonitoring studies, the concentration of HCH isomers in mosses was associated with the source of contamination and the sampling location. For instance, higher concentrations of α - and γ -HCH (isomers with long-range transport potential) have been observed in remote areas (Borghini et al., 2005; Zhu et al., 2015). By contrast, higher concentrations of β -HCH were found in areas close to contamination sources (due to the high recalcitrance of this isomer in soils) (Lim et al., 2006; Tarcau et al., 2013), and in cases where HCH was still in use, higher concentrations of α -HCH were detected as this the major isomer in technical HCH (Holoubek et al., 2000). The physicochemical properties of the isomers and surface characteristics of the sorbent determine the transfer and accessibility of the pollutants. However, the original concentration determines the concentration and partitioning of isomers sorbed in mosses.

The study findings are consistent with those obtained by Keyte et al., (2009), who concluded that phenanthrene displayed a higher affinity for the cell wall components in the studied moss (*Hypnum cupressiforme* Hedw.), and to a lesser extent for the membrane components. However, our findings may partly contradict those obtained by Spagnuolo et al. (2017) with the same clone of *S. palustre*, because phenanthrene adsorption mainly occurred inside the hyalocysts. By contrast, phenanthrene formed micron-sized particle aggregates, for which the hyalocysts could provide an easy route of entry, whereas the conditions of the present study refer to the liquid and gaseous phases, not to the particulate phase. These authors also observed phenanthrene on the leaf surface, which would be consistent with our results. On the other hand, live mosses were used in the previous study, unlike in the present study, and therefore some type of transport may have taken place. Thus, the importance of hyalocysts in particle loading would explain the significant relationship between the concentrations of heavier PAHs (4, 5 or 6 rings, associated with particulate matter) of the bulk deposition and the PM10 fraction and the moss, as reported by Aboal et al. (2020). However, this did not occur

for the lighter PAHs, associated with the gaseous phase, perhaps for the same reasons as for the low affinity for gaseous phase HCH observed in the present study (Table R2). Finally, although good uptake (proportional to the concentrations tested) was observed in the same *F. antipyretica* clone as used for biomonitoring PAHs in inland waters under laboratory conditions, the results obtained under field conditions were not satisfactory and moss concentrations were not related to the concentrations determined in the water, although enrichment of several PAHs was observed for several PAHs (Carrieri et al., 2021). This highlights the importance of considering transport mechanisms and environmental factors in understanding differences between laboratory and field results.

Based on the results of this biosorption experiment, *F. antipyretica* is recommended for HCH biomonitoring in both liquid and, particularly, gaseous phases. Cloned moss transplants of this species could provide a simple, inexpensive and sensitive technique for quantifying, monitoring and mapping HCH, and potentially other pollutants simultaneously. Nonetheless, the performance of the moss must be validated under field conditions, and further information on the loading process in moss species is required.

4.3 EFFECT OF SURFACTANTS AND IONIC LIQUIDS ON THE SOLUBILITY OF HCH

The effect of surface-active compounds at the different studied concentrations in the solubility of Σ HCH (total HCH, considering all the isomers) was assessed. Moreover, the effect on the individual isomers was also analysed. All the results presented in this section were normalised relative to the control. Thus, a value of 1 indicates a solubility equal to that in water and values greater than 1 indicate an increase in solubility. Results are expressed as mean values \pm standard error ($n = 3$). The experimental solubilities of the HCH isomers in the control system followed the previously reported order of magnitude: $\delta > \gamma > \alpha > \beta$, and the values obtained are within the range of values determined by other authors (mean values of $10.87 > 6.09 > 2.68 > 0.86$ mg L⁻¹, respectively) (Mackay, 2006; Rodríguez-Garrido, 2009).

4.3.1 Effect of cationic surface-active compounds

The effect of cationic SAILs (surface-active compounds ionic liquids; all the compounds show melting or glass transition temperatures below 100 °C) in the solubility of Σ HCH is presented in Fig. R7. The degree of solubilisation varied depending on the structure and concentration of the surface-active compound used. According to Fig. R7, most compounds increased the solubility of Σ HCH in comparison to the control. However, in the case of [N_{1 8 8 8}]Cl and [C₈C_{1im}]Cl (both tested surfactant concentrations were higher than critical micellar concentration -CMC-), the presence of the surfactant had a negative effect on the solubilisation of the contaminant. Similarly, [C₈C_{1im}][OAc] also showed a negative effect, even using a surfactant concentration of 15 g L⁻¹ (higher than its CMC). The effect of 221PG was negligible but this was expected due to the high CMC of this compound (Appendix 1). In the case of [C₁₀C_{1im}]Cl, only the highest concentration of surfactant (with a value slightly higher than CMC) led to a positive effect.

Regarding the surface-active compounds with positive effect, in general higher concentrations were more effective (the only exception being the case of $[P_{4\ 4\ 4\ 14}]Cl$). The HCH solubilisation capacity of C1EG and T2EG increased by 30 - 45% when increasing the concentration from 5 to 15 g L⁻¹. This effect is much more pronounced in the case of $[N_{1\ 1\ 12\ Bz}]Cl$. A concentration of 5 g L⁻¹ of this surfactant resulted in a minimal increase regarding to water solubilisation. However, a higher concentration of 15 g L⁻¹, resulted in a solubility two times higher compared to the control.

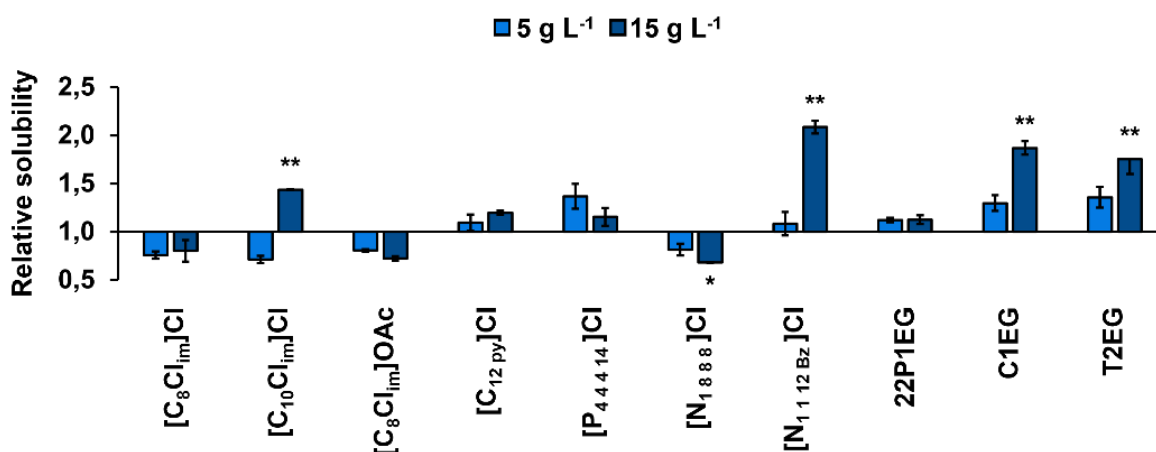


Fig. R7 Effect of cationic surface-active compounds on the water solubility of ΣHCH. Asterisks indicate significant differences relative to the control (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

The head group of the surfactants but mainly the hydrophobic tails and the functional groups that they contain are significant parameters in the ΣHCH solubilisation. The effect of alkyl chain length is likely the most important parameter, as it affects the shape and size of the micelles and aggregations formed. Regardless of the type of head group, the utilisation of SAILs with shorter alkyl chain lengths such as $[N_{1\ 8\ 8\ 8}]Cl$, $[C_8Cl_{1m}]Cl$, or $[C_8Cl_{1m}][OAc]$, negatively affected the aqueous solubility of ΣHCH. In contrast, the use of surface-active compounds with longer alkyl chains improved the results. This is easily seen comparing solubilisations achieved with $[C_8Cl_{1m}]Cl$ and $[C_{10}Cl_{1m}]Cl$. Results achieved with this last SAIL improved those found with $[C_{12}py]Cl$ or $[P_{4\ 4\ 4\ 14}]Cl$, with a longer alkyl chain length, so in principle, an imidazolium ring would be preferred.

However, the best results were achieved with ammonium SAILs such as T2EG and C1EG (relative solubilities of 1.8 and 1.9, at 15 g L⁻¹, respectively), both a mixture of tail-branched surfactants of different lengths, and mainly with $[N_{1\ 1\ 12\ Bz}]Cl$ (relative solubility was 2 at 15 g L⁻¹). The presence of an aromatic ring attached to the head group seems to positively influence the solubilisation capacity of the ammonium surfactant. Lastly, no differences were observed when altering the nature of the counterion, as evidenced by the comparison between $[C_8Cl_{1m}]Cl$ and $[C_8Cl_{1m}][OAc]$ (see structures Table M3).

The effect of cationic surface-active compounds on the solubility of the different HCH isomers is presented in Fig. R8.

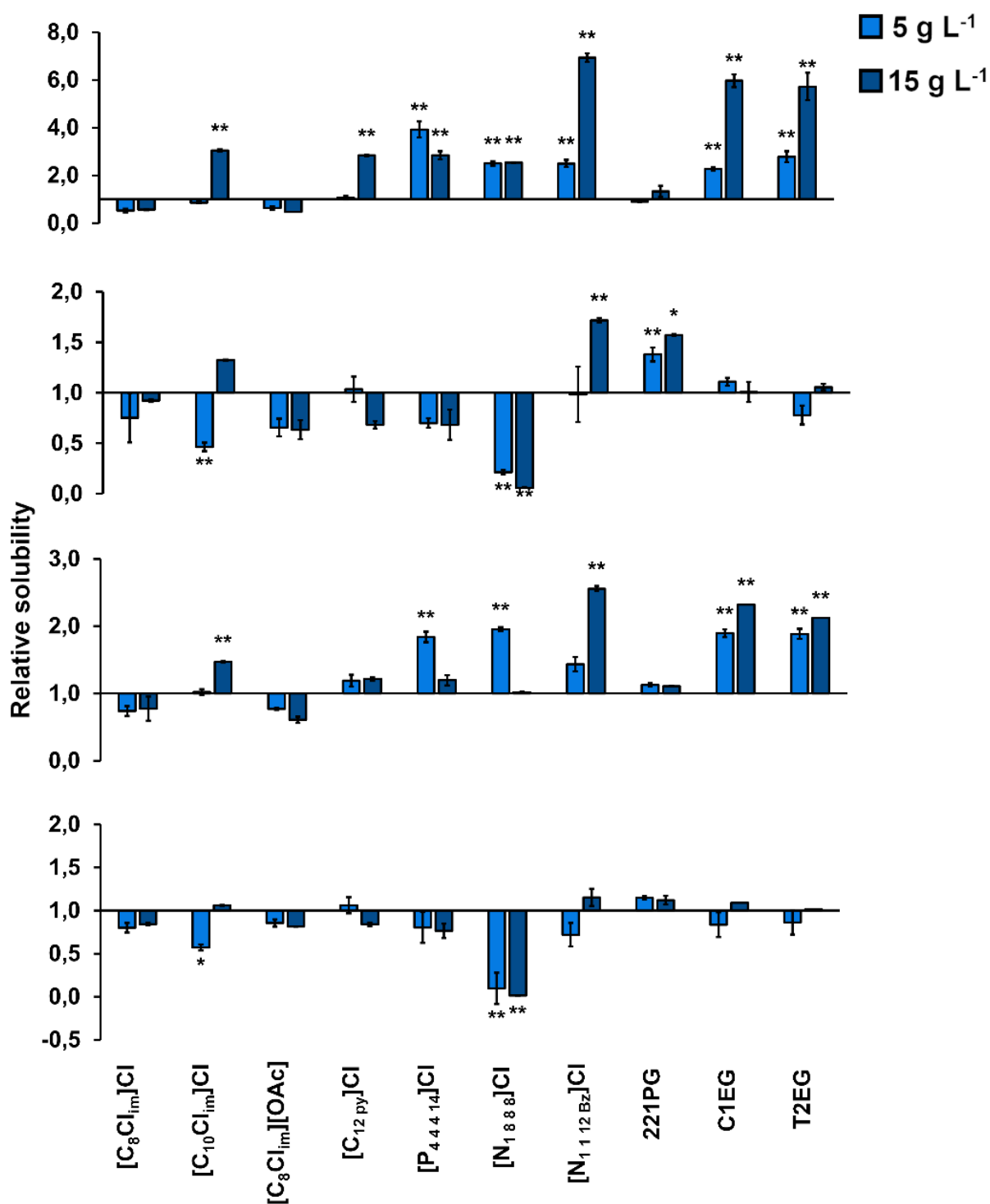


Fig. R8 Changes in the aqueous solubility of α -, β -, γ - and δ -HCH isomers in the presence of cationic surfactants at 5 and 15 g L⁻¹. Asterisks indicate significant differences relative to the control (**p* < 0.05 and ***p* < 0.01).

In general, the α -HCH and to a lesser extent γ -HCH isomers were the most readily solubilised, reaching maximum solubility values in the presence of $[N_{1,12}Bz]Cl$ (α -HCH: *ca.* 6 times the control and γ -HCH: *ca.* 3 times the control). β -HCH was, in general, less soluble

than the α and γ isomers. It was only solubilised in presence of $[N_{1112}Bz]Cl$, 221PG, and $[C_{10}Cl_{im}]Cl$. Surfactants leading to good results in the solubilisation of ΣHCH such as T2EG and C1EG, however, had a negative or negligible effect on this specific isomer. Worse results were found with δ -HCH: decrease or slight increase in solubilities were found with all the surfactants.

4.3.2 Effect of anionic surface-active compounds

The effect of anionic surfactants (SDS, SDBS, and AOT) and SAILs ($[Ch][Odo]$, Sarkosyl, Alfoterra, N_{0002OH} -Alfoterra, and Ralufon) on the solubility of ΣHCH is presented in Fig. R9. As in the case of cationic surfactants, the degree of solubilisation varied depending on the structure and concentration of the surface-active compound used, being favoured by the highest concentration (in the case of Ralufon and Na-Alfoterra, a negligible effect of concentration was observed). The solubility of ΣHCH was increased by the presence of all the tested anionic surfactants except for $[Ch][ODO]$ at a concentration of 5 g L^{-1} , which is below its CMC.

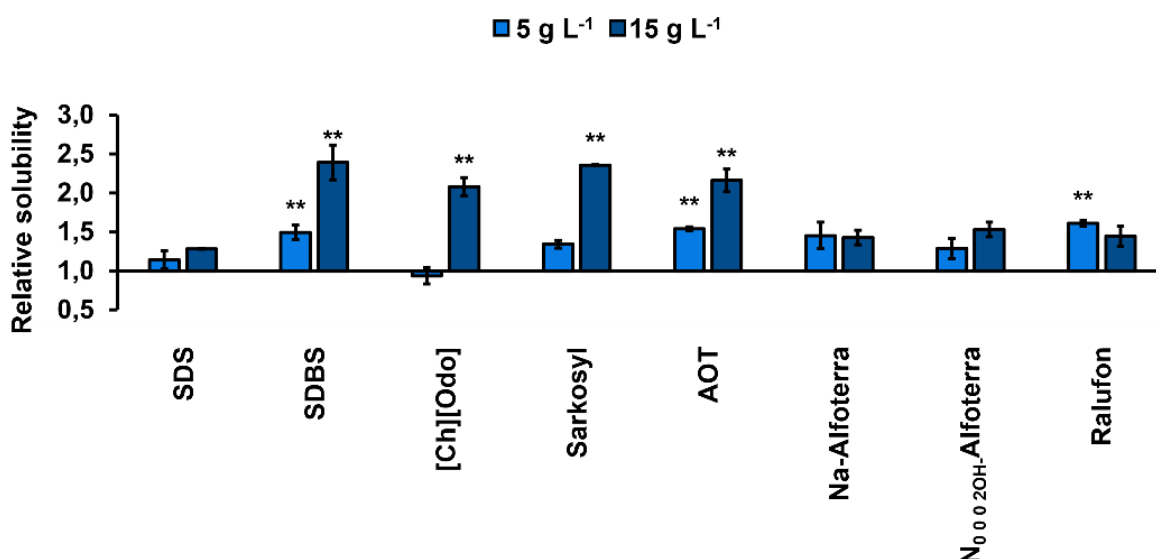


Fig. R9 Effect of anionic surface-active compounds on the water solubility of ΣHCH . Asterisks indicate significant differences relative to the control (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

SDBS, AOT, $[Ch][Odo]$, and Sarkosyl were the anionic surfactants that, at a concentration of 15 g L^{-1} most increased the solubility of ΣHCH , showing relative solubilities of 2.4, 2, 2.4 and 2.2, respectively. Not only the length of the hydrocarbon groups, but also the presence of functional groups as $-COO^-$ or aromatic rings, seems to play an important role in the performance of the surfactants. For instance, performance of SDBS is clearly better than SDS. Both have the same alkyl chain length, but the latter has a phenyl ring attached to the hydrophilic group. Na-Alfoterra and N_{0002OH} -Alfoterra led to similar results, so the counterion did not appear to affect the solubilisation potential of the compounds.

The effect of anionic surface-active compounds on the solubility of the different HCH isomers is presented in Fig. R10.

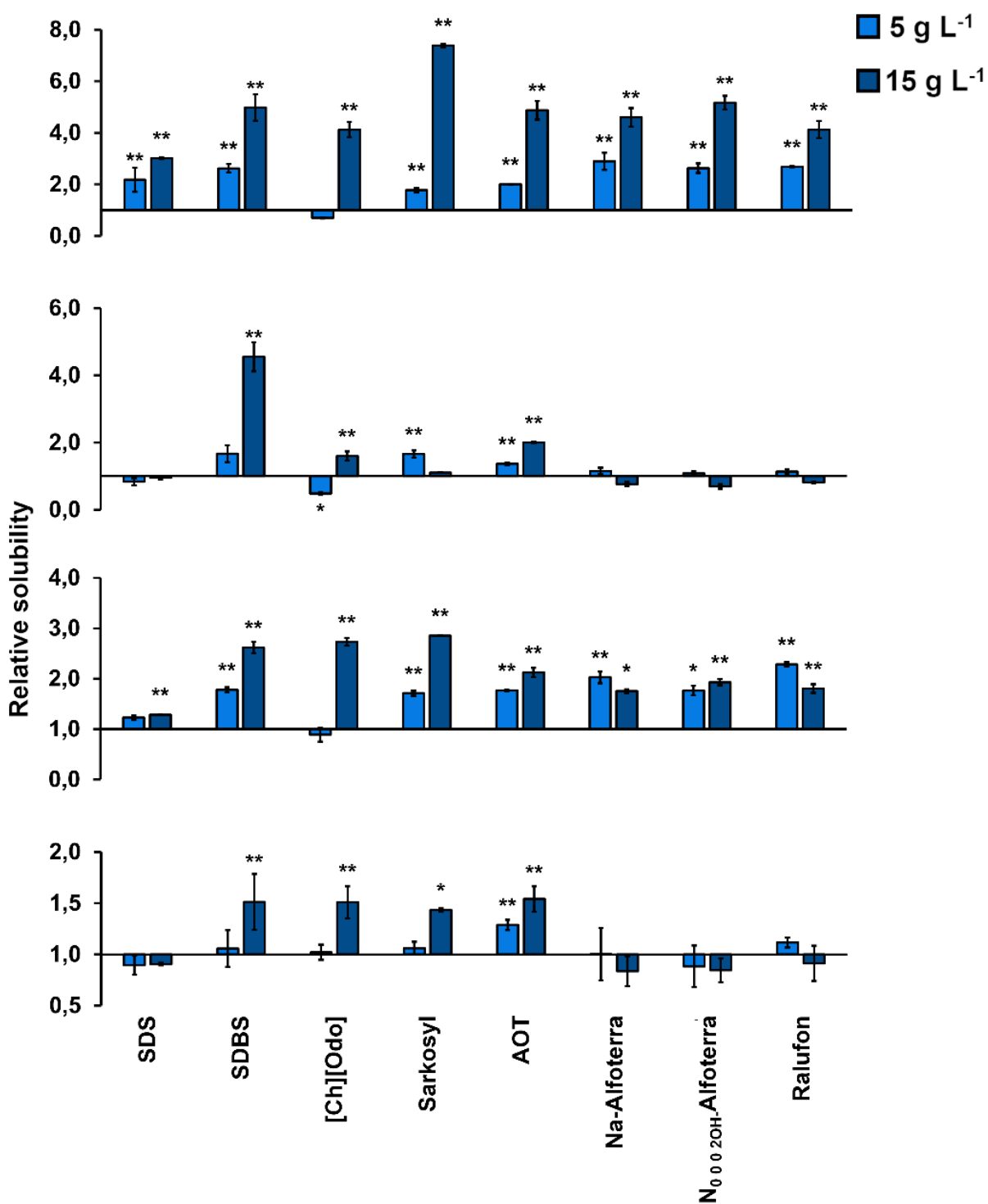


Fig. R10 Changes in the aqueous solubility of α -, β -, γ - and δ -HCH isomers in the presence of anionic surfactants at 5 and 15 g L⁻¹. Asterisks indicate significant differences relative to the control (*p < 0.05 and **p < 0.01).

In general, and as in the case of cationic surfactants, the solubility of α - and γ -HCH showed the most significant improvement. The efficacy of SDBS, AOT, [Ch][Odo], and Sarkosyl solubilising Σ HCH particularly applies to δ -HCH, increasing its solubility with respect to water from 1.4 to 1.6 times (15 g L^{-1} of surfactant). The only surfactants able to significantly increase the β -HCH solubility were AOT and SDBS with relative solubilities of 2 and 4.6, respectively, at 15 g L^{-1} .

4.3.3 Effect of nonionic surfactants

The effect of nonionic surface-active compounds on the solubility of Σ HCH is presented in Fig. R11. In this case, and due to the low CMC (see Table M2) of this kind of surfactants, besides 5 and 15 g L^{-1} , a concentration of 15 mg L^{-1} was also tested. Even though this concentration is higher than the CMC of Brij C10, Brij L4, and Triton X-100, no enhancement of Σ HCH solubility in water was observed at this low surfactant concentration. Fig. R12 shows that the intermediate concentration (5 g L^{-1}) led to the highest relative solubilities in all the cases except for Tetronic 90R4.

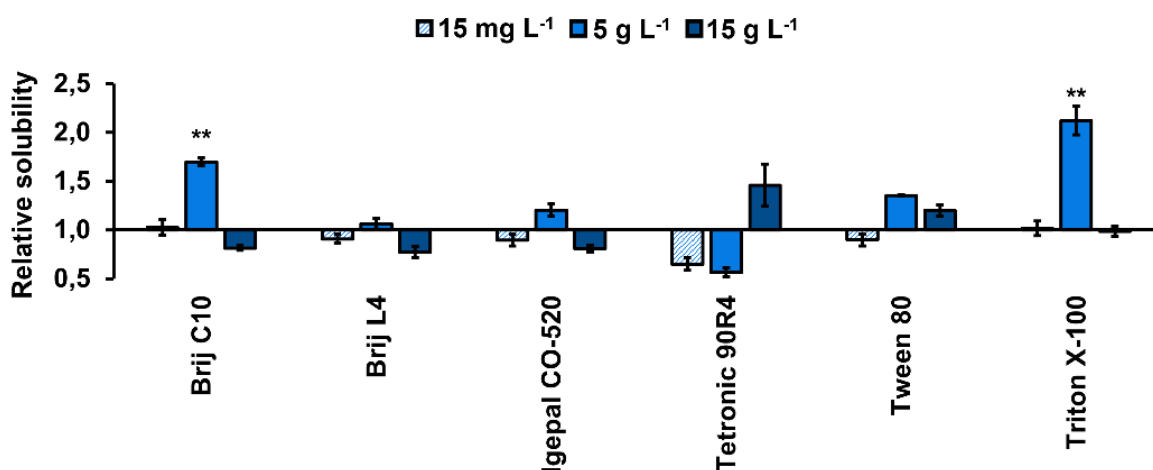


Fig. R11 Effect of nonionic surface-active compounds on the water solubility of Σ HCH. Asterisks indicate significant differences relative to the control (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

Brij C10 and Triton X-100 yielded the best results, increasing Σ HCH solubility in 1.7 and 2.1 times, respectively, compared to the control solution. Thus, an intermediate HLB seems to be favourable for solubilisation enhancement (Table M2). The HLB values are 12 for Brij C10 and 13.5 for Triton X-100 (Table M2). Brij C10 and Brij L4 are both nonionic ethoxylated alcohols, and again the longest hydrophobic tail of the former led to better results. The highest number of ethylene-oxide units of Triton X-100 in comparison to Igepal CO-520, increases its hydrophilicity (consequently its HLB) and seems to be the reason for its better performance.

The effect of nonionic surface-active compounds on the solubility of the different HCH isomers is presented in Fig. R12.

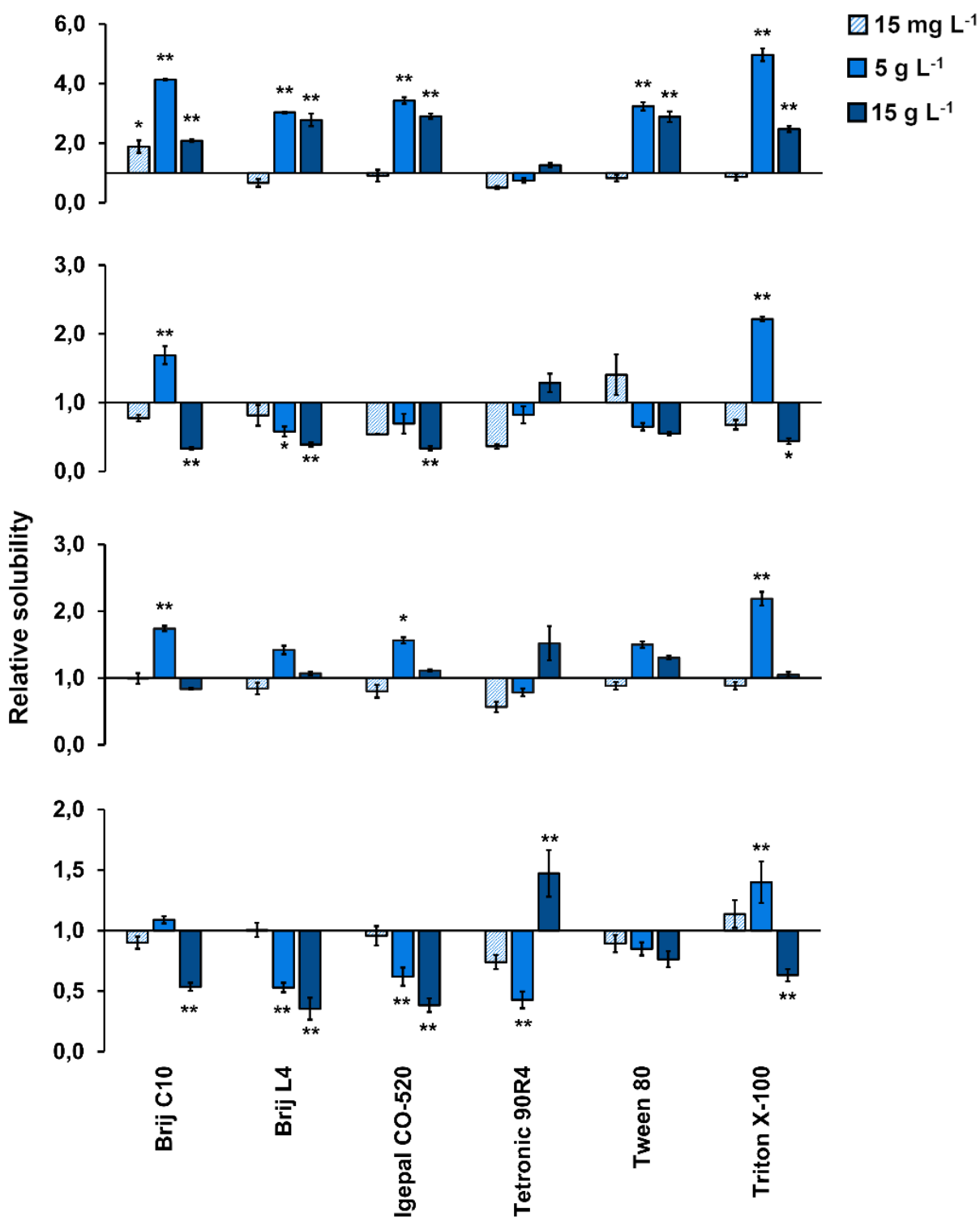


Fig. R12 Changes in the aqueous solubility of α -, β -, γ - and δ -HCH isomers in the presence of nonionic surfactants at 5 and 15 g L⁻¹. Asterisks indicate significant differences relative to the control (*p < 0.05 and **p < 0.01).

As in the case of the previously studied surfactants, α - and γ -HCH were the most efficiently solubilised isomers. With an intermediate concentration of surfactant (5 g L^{-1}) all the surfactants, except Tetronic 90R4, showed positive relative solubilities. It is worth mentioning that this surfactant at the highest concentration (15 g L^{-1}) was able to improve the performance of water solubilisation with all the isomers but α -HCH. The good performance of Triton X-100, at 5 g L^{-1} , regarding Σ HCH is not only due to its capacity for solubilising α - and γ -HCH isomers (with relative solubilities of 5 and 2.2, respectively) but also β - and δ -HCH (with relative solubilities of 2.2 and 1.4, respectively). Nonetheless, for the recalcitrant isomers, Brij C10 only showed a significant positive performance with β -HCH, showing a relative solubility of 1.7.

4.3.4 Synergistic effects in mixed systems

Two blends of the SAIL C1EG and the traditional surfactant SDBS were selected to enhance HCH solubilisation. The selected concentrations were 55.3 and 26.3 wt % C1EG. It has been shown in a previous work (Somoza et al., 2022) that these two blends, in salt solutions, were able to successfully extract oil in enhanced oil recovery processes. Moreover, the formation of electrostatically neutral complexes (catanionic micelles) was found the reason for a low adsorption in rocks, this being a promising factor also for application in soil washing.

The solubilisation capacity of blends 1 (55.3 wt % C1EG) and 2 (26.3 wt % C1EG) is shown in Table R3. The results show that an increase of the concentration from 5 to 15 g L^{-1} did not improve the results of the solubilisation. The ion pairs formed by blending cationic and anionic species exhibit unique properties such as lower CMC than the individual components. CMC of Blend 1 and 2 are 10.5 mg L^{-1} and 16.9 mg L^{-1} , respectively (Somoza et al., 2022). The lowest surfactant concentration tested clearly exceeded these values.

Table R3 Relative solubilities achieved with blends of C1EG and SDBS. Asterisks indicate significant differences relative to the control (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

	Blend 1 ¹		Blend 2 ²	
	5 g L^{-1}	15 g L^{-1}	5 g L^{-1}	15 g L^{-1}
α -HCH	$5.30 \pm 0.40^{**}$	$2.74 \pm 0.17^{**}$	$3.76 \pm 0.58^{**}$	$1.92 \pm 0.10^*$
β -HCH	$0.63 \pm 0.07^*$	$0.41 \pm 0.05^*$	0.83 ± 0.05	$0.31 \pm 0.03^{**}$
γ -HCH	$1.95 \pm 0.04^{**}$	1.12 ± 0.01	$2.01 \pm 0.11^{**}$	0.76 ± 0.03
δ -HCH	$0.46 \pm 0.16^{**}$	$0.17 \pm 0.07^{**}$	0.88 ± 0.13	$0.40 \pm 0.05^{**}$
Σ HCH	1.31 ± 0.06	0.84 ± 0.05	$1.45 \pm 0.05^{**}$	0.71 ± 0.05

¹ Blend 1: 55.3 wt % C1EG + 44.7 wt % SDBS

² Blend 2: 26.3 wt % C1EG + 73.7 wt % SDBS

At 5 g L^{-1} , Blend 2 exhibited superior solubilisation of Σ HCH compared to Blend 1, with the relative solubility achieved (1.5) similar to that obtained with SDBS (1.5) and greater than that obtained with C1EG (1.3). Blend 1 only enhanced the results of Blend 2 in the case of α -HCH, yielding a relative solubility of 5.3, which also markedly surpassed the results achieved with the individual components at the same concentration (2.6 with SDBS and 2.3 with C1EG). Blend 2 performed better for the rest of the isomers, but it only slightly improved the results

achieved with the pure surfactants for γ -HCH, and it worsened those of the most recalcitrant isomers (β - and δ -HCH). Nevertheless, overall, using the highest concentration (15 g L^{-1}) of either SDBS or C1EG generally resulted in higher relative solubilities than those achieved with the blends.

4.3.5 Discussion

The solubilisation efficacy of the investigated surface-active compounds depended on their concentration and structure, as well as the specific HCH isomer (α -, β -, γ - or δ -HCH). Surfactant concentration was fixed in order to identify the highest solubilisation at a given concentration of chemical. Below the CMC, as expected, the solubility of HCH isomers was not enhanced. At concentrations higher than CMC, micelles aggregate. At low concentrations, limited or discrete self-assemblies are expected (spherical, prolate, or cylindrical). However, at higher concentrations of surfactant, the assemblies become more ordered, and liquid crystal phases are formed in some cases. Structural parameters such as head group, chain length, counter ion, and surfactant concentration affect the size and shape of micellar systems, and therefore the micellar solubilisation capacity. This last is also affected by the hydrophobicity of the solubilised compound (Stephenson et al., 2007). HCH isomers show different hydrophobicity (Goss et al., 2008), leading to a different solubilisation using the same surfactant and concentration.

Interestingly, the solubility of HCH did not increase consistently with surfactant concentration. In the case of 221PG, tested concentrations were lower than its CMC, which is why the solubilisation achieved with this compound was negligible. This, in general, discounts this surfactant for the application because a quantity of chemical too high would be required. Ideally, surfactants should operate at low doses in washing solutions to minimise remediation costs, especially considering that the effective CMC in the soil-water system tends to be higher than in aqueous solutions (Laha et al., 2009). In the case of [Ch][Odo], the minor concentration tested (5 g L^{-1}) was also lower than its CMC, reason why only a significative effect was achieved with 15 g L^{-1} . In general, both the cationic and anionic compounds tended to produce higher solubility at the highest concentration (15 g L^{-1}) due to a larger number of micelles and aggregates formed. However, among surfactants leading to positive relative solubilities, in the case of the anionic Na-Alfoterra and Ralufon, and in the case of the cationic [P_{4 4 4 14}]Cl and 221PG, no positive effect was observed by increasing the concentration. In the case of nonionic surfactants, a concentration of 5 g L^{-1} led to the best results (except in the case of Tetronic 90R4). These results may be attributed to the lower CMC of nonionic compounds. In fact, the same behaviour was found with the blends of SDBS and C1EG that exhibit very low CMCs. Micelles of surfactant compounds are continually forming in equilibrium with free monomers. Exceeding a certain concentration may disrupt this equilibrium, destabilizing the forming micelles (Patist et al., 2001). Surfactant compounds exhibit their optimal solubilisation capacity within a specific concentration range, consistently higher than the CMC, and with a well-defined upper limit.

Previous reports have shown that nonionic surfactants displayed a greater capacity than cationic and anionic ones to solubilise PAHs (Lamichhane et al., 2017). Masrat et al. (2013)

compared the capacity of nonionic, anionic and cationic surfactants to solubilise naphthalene and pyrene, observing that the nonionic compounds produced the best results, as also reported by Sales et al. (2011). In this work, in general anionic surfactants performed better for the solubilisation of HCH, a polyhalogenated six-carbon ring. The best relative solubilities achieved for Σ HCH were about 2.4 and they could be achieved with SDBS and Sarkosyl, but close values were also achieved with other anionic (AOT and [Ch][Odo]), cationic [N_{1 1 12 Bz}], and nonionic (Triton X-100) surfactants.

The chemical structure of the surface-active compounds influences the micellar behaviour and, consequently, the solubilisation capacity. In general, the longer the alkyl chain length the greater the HCH solubilisation. This is due to the increase of the size of the hydrophobic nucleus that holds the contaminant. Lan Chun et al. (2002) showed that the presence of aromatic rings in the alkyl chains of the surfactants favoured the solubilisation of PAHs. That effect was also observed in this study. Additionally, it was also found that the presence of certain functional groups in the hydrocarbon tails (such as -COO- or ethylene-oxide units) could improve solubilisation performance. However, the role of the hydrophilic region in micellization and solubilisation of contaminants remains unclear. Some authors have found that an increase in the length of the polar chain affects the solubilisation capacity of compounds (Xiarchos y Doulia, 2006), while others have found no such effect (Tokiwa, 1968). Among cationic surfactants, in this work ammonium ones seem to have performed best. Regarding SAILs, Wang et al. (2008) noted that the nature of the anion on imidazolium SAILs affected the anion-cation interactions and consequently its CMC and aggregation. In the present study, a significant effect of counterions was not found, even when the surface-active compounds showed different CMC.

In the case of nonionic surfactants at 5 g L⁻¹, solubilisation capacity went through a maximum as surfactant HLB increased, with higher relative solubilities at HLB values in the range 12-13.5 (Brij C10 and Triton X-100). Diallo et al. (1994) found a similar behaviour investigating the solubilisation of aromatic hydrocarbons and chloroethene compounds in micellar solutions of dodecyl alcohol ethoxylates. According to the authors, this is due to two opposing effects: a decrease in solubility with increasing HLB (reduction of hydrophobic nucleus) and the enhancement by electron donor-acceptor complexation.

The synergistic effects of surfactants have been extensively investigated (Ji et al., 2021) due to their behaviour in soils. Anionic compounds can cause precipitation and cationic surfactants generally show high adsorption. These drawbacks can be surpassed by blending surfactants. Most studies have focused on PAHs, commonly employing a mixture of ionic and nonionic surfactants. While the results in such cases have been very positive, mixtures of ionic-type surfactants are also promising. Mixtures of anionic and cationic surfactants display a higher level of synergism (Kume et al., 2008). Blends of C1EG and SDBS are promising due to their high surface/interface activity and low adsorption in rocks (Somoza et al., 2022). However, in this case, the blends tested did not show a significant synergy in the HCH solubilisation when compared with the individual surfactants.

Differences in solubilisation performance were also observed based on the different isomers. As in other studies (Manickam et al., 2012; Quintero et al., 2005b), α - and γ -HCH were more easily solubilised than β - and δ -HCH. The α - and γ -HCH isomers, on the one hand, and β - and δ -HCH isomers, on the other, have a similar spatial structure due to the axial (a) or equatorial (e) position of the chlorine atoms: β -HCH, eeeee and δ -HCH, aeeee; α -HCH, aaeeee and γ -HCH, aaaaa, potentially explaining the steric effect of chlorines affecting the solubilisation of different isomers. It was observed that solubility of α -HCH increased by 7 times in the presence of $[N_{11}12Bz]Cl$ (15 g L^{-1}) or Sarkosyl (15 g L^{-1}) and by 5 times in presence of Triton X-100 at a lower concentration (5 g L^{-1}). The anionic surfactant SDBS (15 g L^{-1}) resulted the most effective in improving the solubility of β -HCH, increasing its solubility by 5 times. The solubility of γ -HCH was increased by 3 times in the presence of Sarkosyl (15 g L^{-1}), SDBS and $[Ch][Odo]$ performing slightly worse at the same concentration. Also, anionic surfactants were the most effective to enhance δ -HCH solubility, increasing by 1.5 times in the presence of SDBS, Sarkosyl or $[Ch][Odo]$ (15 g L^{-1}) and by 1.4 times in presence of Triton X-100 (5 g L^{-1}).

Surfactant-enhanced soil washing/flushing is a promising method for the remediation of HCH-contaminated soils, solubility studies being the first required step for the application. In this study anionic surfactants were generally the most effective, although certain cationic and nonionic compounds also significantly improved solubility. The choice of concentration, always above the CMC, is critical and surfactants with high CMC may be less practical due to the larger amounts required. Surface-active ionic liquids offer new opportunities for tailored surfactant design, considering features such as hydrophobic tails, aromatic rings, $-COO^-$ units, ethylene oxide groups, and, for nonionics, an HLB of 12 - 14.

4.4 EFECTOS DE ENMIENDAS EDÁFICAS SOBRE LA MOVILIDAD DE HCH

Se evaluó el efecto de seis enmiendas edáficas aplicadas a distintas dosis (CMP1: vermicompost y CMP2: compost de lodos de depuradora y subproductos de industria agroalimentaria, BC-G: biocarbón de gallinaza, BC-M: biocarbón de carozo de maíz, BC-P: biocarbón de pino, BA: ceniza de biomasa) sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo y su influencia en la movilidad del HCH, considerando los procesos de lixiviación y volatilización.

4.4.1 Efectos sobre las propiedades del suelo

El suelo original sin enmienda era muy ácido ($pH_{H_2O} = 4,6$), con textura franco-arenosa (76 % arena, 15 % limo y 9 % arcilla), bajo contenido en materia orgánica ($4 \text{ g kg}^{-1} \text{ C}$), muy baja capacidad de intercambio catiónico ($0.49 \text{ cmol}_{(+) } \text{ kg}^{-1}$) y completamente desaturado. La adición de las seis enmiendas edáficas modificó notablemente estos parámetros, aunque de manera variable en función del tipo y la dosis de enmienda utilizada: vermicompost (CMP1) y compost de lodos de depuradoras (CMP2) a 2,5, 5, 10 y 20 %; y biocarbón de gallinaza (BC-G), de carozo de maíz (BC-M) y de pino (BC-P) y ceniza de biomasa (BA), a 0,5, 1, 2,5 y 5 %. Los parámetros fisicoquímicos de todos los suelos, con y sin tratamiento, se presentan en la Tabla R4; la composición del complejo de cambio de estos mismos suelos se detalla en la Fig. R13.

Tabla R4 Características fisicoquímicas de los suelos sin tratar (control) y tratados con distintas dosis de enmiendas: vermicompost (CMP1), compost de lodos de depuradora y subproductos de industria agroalimentaria (CMP2), biocarbón de carozo de maíz (BC-M), biocarbón de gallinaza (BC-G), biocarbón de corteza de pino (BC-P) y ceniza de biomasa (BA).

Suelo	Dosis aplicada (%)	pH _{H2O}	C.E. (μS cm ⁻¹)	C (g kg ⁻¹)	N (g kg ⁻¹)	DOC (mg L ⁻¹)	DIC (mg L ⁻¹)
Control	0	4,6	34	4	ND ¹	5,44	0,65
CMP1	2,5 %	5,6	181	7,0	ND	12,55	0,78
	5 %	6,1	374	8,2	ND	16,21	6,58
	10 %	7,3	499	11,0	ND	20,36	5,81
	20 %	7,2	1032	25,2	1,4	47,50	3,87
CMP2	2,5 %	4,6	129	8,2	ND	18,67	0,73
	5 %	6,1	235	12,3	ND	36,36	0,57
	10 %	6,7	592	23,7	2,5	118,60	1,33
	20 %	6,9	1089	44,5	6,3	196,38	5,02
BC-G	0,5 %	5,6	56	5,1	ND	5,97	0,63
	1 %	6,0	86	5,4	ND	6,71	0,71
	2,5 %	6,8	219	6,7	1,2	13,84	2,18
	5 %	7,5	362	11,9	1,0	18,30	3,62
BC-M	0,5 %	5,0	23	5,9	ND	5,84	0,70
	1 %	5,3	35	10,1	ND	5,42	0,69
	2,5 %	6,0	51	18,2	ND	7,60	0,72
	5 %	6,7	87	38,5	ND	30,96	0,63
BC-P	0,5 %	4,9	52	5,5	ND	8,98	0,61
	1 %	5,3	-	8,7	ND	-	-
	2,5 %	5,1	56	21,3	ND	15,37	0,57
	5 %	5,9	62	43,3	ND	13,69	0,80
BA	0,5 %	6,0	108,8	4,8	ND	7,26	0,87
	1 %	7,4	241	5,2	ND	9,56	1,26
	2,5 %	7,7	466	5,7	ND	9,29	5,74
	5 %	7,9	842	6,6	ND	12,84	5,88
M1 (CMP1 +BA)	10 % + 1 %	7,5	649	15,6	ND	18,65	4,77
M2 (CMP1 + BC-M)	10 % + 2,5 %	7,3	658	29,6	ND	20,72	7,09
M3 (BC-M + BA)	2,5 % + 1 %	7,8	308	15,2	ND	11,79	4,27
M4 (CMP1 + BC-M + BA)	10 % + 2,5 % + 1 %	7,9	690	28,1	ND	17,37	3,34

¹ND: no detectado

Todas las enmiendas tuvieron un efecto encalante, neutralizando parcial o totalmente la acidez original del suelo, y este efecto aumentó con la dosis aplicada. El pH del suelo se acercó a la neutralidad con la dosis más alta de cualquiera de las enmiendas utilizadas, con excepción del biocarbón de corteza de pino (BC-P), que incrementó el pH del suelo solo hasta 5,9. Generalmente, la conductividad eléctrica aumentó en los suelos enmendados y, de nuevo, este

aumento fue paralelo a la dosis de la enmienda. El suelo sin enmendar tenía una conductividad eléctrica de $34 \mu\text{S cm}^{-1}$ y alcanzó valores próximos a $1000 \mu\text{S cm}^{-1}$ en los suelos enmendados con la dosis más alta de los dos tipos de compost (CMP1 y CMP 2) y la ceniza de biomasa (BA) (20 % y 5 % p/p, respectivamente). Por el contrario, el efecto de los biocarbones sobre la conductividad del suelo fue escaso (BC-G) o despreciable (BC-P y BC-M), incluso con las dosis más elevadas (5 % p/p).

El aumento del carbono total (C) fue notable con los tratamientos, a excepción de las muestras enmendadas con ceniza de biomasa (BA) y, en menor medida, con biocarbón de gallinaza (BC-G), en las que el incremento máximo fue discreto. El % C en el suelo aumentó linealmente con la dosis aplicada de cada enmienda, llegando a incrementarse hasta diez veces con la dosis máxima del biocarbón BC-P ($43 \text{ g kg}^{-1} \text{ C}$) o el compost CMP2 ($45 \text{ g kg}^{-1} \text{ C}$). Paralelamente, el carbono orgánico disuelto (DOC), con una concentración inicial de 5.4 mg L^{-1} , aumentó notablemente en los tratamientos con compost, especialmente con el CMP2, que alcanzó concentraciones cercanas a 200 mg L^{-1} con la máxima dosis (20 %). La adición de biocarbón o ceniza, también aumentó el DOC, pero en menor medida. El carbono inorgánico disuelto (DIC) aumentó en los suelos enmendados con ceniza y compost en proporción a la dosis de la enmienda. Sin embargo, el efecto de la aplicación de biocarbón fue poco significativo, excepto para BC-M cuando se aplicó con las dosis más altas (2,5 y 5 %). En cuanto al cambio en el nitrógeno del suelo, sólo dosis altas de enmiendas con mayor contenido de este elemento (CMP1, CMP2 y BC-M) provocaron cambios en el suelo.

La aplicación de enmiendas también provocó un notable aumento de la capacidad de intercambio catiónico efectiva (CIC_e), aunque el efecto varió según la enmienda (Fig. R13-A).

Los biocarbones de pino y maíz (BC-P y BC-M) tuvieron un efecto más discreto (hasta $3,3 \text{ cmol}_{(+) } \text{ kg}^{-1}$), seguido del biocarbón de gallinaza (BC-G), que tuvo un efecto cercano al compost (CMP1 y CMP2). La aplicación de ceniza (BA) provocó el mayor aumento de la CIC_e , alcanzando $28 \text{ cmol}_{(+) } \text{ kg}^{-1}$ con la dosis más elevada (5 %). La aplicación de las enmiendas también modificó la composición del complejo de cambio del suelo. La aplicación de ceniza fue la enmienda que mayor cantidad de Ca^{+2} aportó (hasta $21,5 \text{ cmol}_{(+) } \text{ kg}^{-1}$), mientras que el vermicompost (CMP1) contribuyó con los mayores aportes de K^+ , Mg^{+2} y Na^+ (hasta 5,2, 4,0 y $3,5 \text{ cmol}_{(+) } \text{ kg}^{-1}$, respectivamente). Los biocarbones de pino y maíz (BC-P y BC-M) aportaron escasas cantidades de cationes básicos, pero cantidades significativas de Al^{+3} (hasta $1,8 \text{ cmol}_{(+) } \text{ kg}^{-1}$). En los suelos tratados con estas enmiendas, el Al^{+3} descendía con el aumento de la dosis, a diferencia del resto de los cationes, como resultado de la neutralización de la acidez. Con las dosis más bajas el complejo de cambio mostraba saturaciones de Al superiores al 80 % (Fig. R13 B).

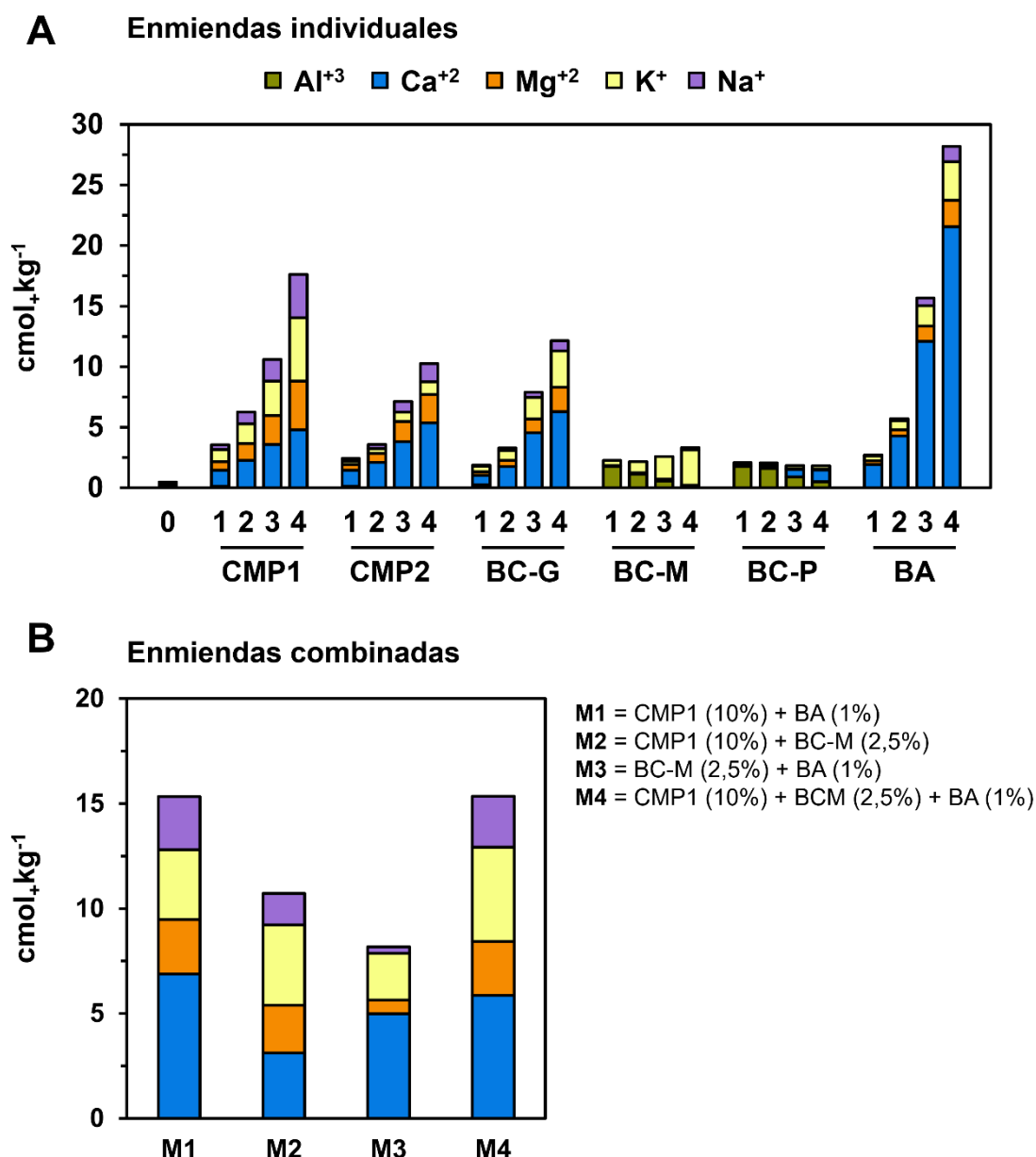


Fig. R13 Composición del complejo de cambio del suelo sin tratar (control, dosis 0) y tratado con diferentes enmiendas individuales (A) y con combinaciones de enmiendas (B). Las enmiendas individuales fueron aplicadas en cuatro dosis (1-4): compost al 2,5 %, 5 %, 10 % y 20 %; biocarbón y ceniza al 0,5 %, 1 %, 2,5 % y 5 %. CMP1: vermicompost, CMP2: compost de lodos de depuradora, BC-G: biocarbón de gallinaza, BC-M: biocarbón de carozo de maíz, BC-P: biocarbón de corteza de pino y BA: ceniza de biomasa.

La aplicación de las enmiendas combinadas también modificó muy notablemente las propiedades del suelo frente al control y, en general, estos efectos eran coherentes con la suma de los efectos individuales de las enmiendas utilizadas en cada mezcla (Tabla R4). Se observó un incremento del pH (7,3 - 7,9), CE (308 - 690 $\mu S\ cm^{-1}$), C (15 - 30 $g\ kg^{-1}$) y CIC_e (8,2 a 15,3 $cmol_{(+)}\ kg^{-1}$). En el complejo de cambio se reflejaba un dominio de Ca cuando la mezcla incorporaba ceniza de biomasa (M1, M3 y M4) y una mayor proporción de K en las mezclas con biocarbón (M2, M3 y M4). Cabe destacar que la incorporación de la ceniza a las mezclas

incrementó el pH del suelo, por encima del efecto individual de cualquiera de las enmiendas, y este incremento fue superior al esperado en el suelo enmendado con las mezclas que contenían ceniza y biocarbón juntos (M3 y M4). Este incremento de pH reducía hasta niveles no detectables el Al^{+3} de cambio que se observaba en los suelos enmendados con el biocarbón individualmente (Fig. R13-A). Además, destaca que la concentración de carbono orgánico disuelto (DOC) era menor que la esperada en todas las mezclas, lo que sugiere una precipitación/floculación de materia orgánica disuelta cuando se combinan las enmiendas.

4.4.2 Efectos sobre la lixiviación de HCH

El suelo sin enmendar (control) estaba contaminado con $177,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ΣHCH ($154,6 \text{ mg kg}^{-1}$ $\alpha\text{-HCH}$; $20,1 \text{ mg kg}^{-1}$ $\beta\text{-HCH}$; $1,7 \text{ mg kg}^{-1}$ $\gamma\text{-HCH}$; $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ $\delta\text{-HCH}$;). Tras 24 h en agitación, se lixiviaron $37,6 \pm 1,9 \text{ mg kg}^{-1}$ ΣHCH ($32,1 \pm 1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ $\alpha\text{-HCH}$; $3,6 \pm 0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ $\beta\text{-HCH}$; $1,1 \pm 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ $\gamma\text{-HCH}$; $0,8 \pm 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ $\delta\text{-HCH}$), lo que representa el 21 % del HCH total presente en el suelo contaminado. La aplicación de enmiendas modificó la movilidad del contaminante respecto al control, con efectos variables según el tipo de enmienda y la dosis utilizada (Fig. R14). La aplicación de CMP1 y CMP2 redujo significativamente la lixiviación de ΣHCH en dosis altas (10 y 20 %), pero en dosis bajas (2,5 y 5 %) había una tendencia a aumentar su lixiviación respecto al control. CMP2, proveniente de lodos de depuradora, resultó más efectivo que CMP1, un vermicompost, logrando una reducción de la lixiviación del 40 % y del 55 % con respecto al control, con dosis del 10 y 20 %, respectivamente. Con las mismas dosis, CMP1 reducía el 11 % y el 48 %, respectivamente. En el caso de los biocarbones, sólo el de corteza de pino (BC-P) redujo significativamente la movilidad de los isómeros de HCH (entre el 12 y el 24%) en todas las dosis aplicadas. Tanto el biocarbón de gallinaza (BC-G) como el de carozo de maíz (BC-M) no mostraron efecto en la lixiviación del contaminante en ninguna de las dosis evaluadas. A pesar de que BC-G no presentaba diferencias significativas con el control, había una tendencia al descenso de la solubilidad con el incremento de dosis, a diferencia de BC-M y BC-P que no mostraban ninguna tendencia con la dosis. Igualmente, la aplicación de ceniza de biomasa (BA) no provocaban diferencias significativas con el control y tampoco se veían tendencias con la dosis.

La distribución de los isómeros del lixiviado del suelo sin enmendar fue 85 % $\alpha\text{-HCH}$ > 10 % $\beta\text{-HCH}$ > 3 % $\delta\text{-HCH}$ > 2 % $\gamma\text{-HCH}$, lo que concuerda con la composición esperada, dada la distribución del residuo original de producción: 87 % $\alpha\text{-HCH}$ > 11 % $\beta\text{-HCH}$ > 1 % $\gamma\text{-HCH}$ > 0.3 % $\delta\text{-HCH}$. No obstante, en el lixiviado se observó una mayor proporción de $\delta\text{-HCH}$ que de $\gamma\text{-HCH}$, lo que refleja la mayor solubilidad $\delta\text{-HCH}$. En los suelos enmendados con la dosis más elevada de compost (CMP1 y CMP2) el lixiviado presentaba una menor proporción de $\beta\text{-HCH}$ que el control, lo que reflejaba una retención relativamente mayor de este isómero. Este efecto también se observó en el suelo enmendado con la combinación M1 (CMP1+BA).

Si evaluamos el efecto de las enmiendas combinadas sobre la lixiviación de HCH en el suelo (Fig. R14 B), observamos que sólo la mezcla M1 (CMP1 + BA) redujo significativamente la lixiviación de HCH respecto al control. El ΣHCH lixiviado disminuyó desde $37,6 \pm 1,9 \text{ mg kg}^{-1}$ en el control hasta $26,9 \pm 2,8 \text{ mg kg}^{-1}$ en M1, lo que suponía una reducción del 28%.

Entonces, esta mezcla fue más eficiente que la aplicación individual de CMP1 (reducción del 11,5 %) o de BA (sin efecto significativo) y sugiere un efecto sinérgico entre las dos enmiendas.

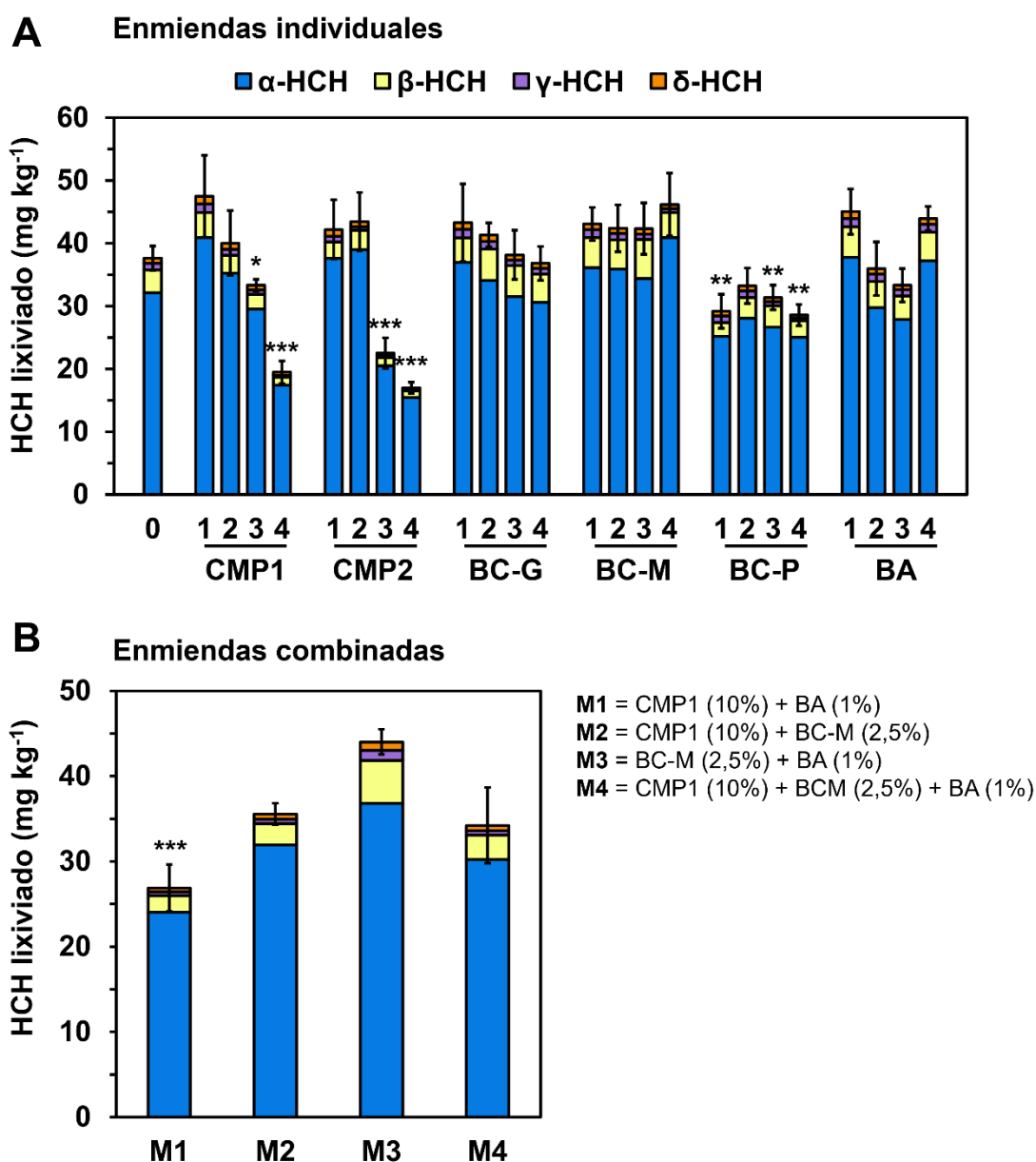


Fig. R14 Concentración de los isómeros de HCH (α , β , γ , δ) en el lixiviado del suelo sin tratar (control, dosis 0) y de los suelos tratados con enmiendas individuales (A) y combinaciones de enmiendas (B). Las enmiendas individuales fueron aplicadas en cuatro dosis (1-4): compost al 2,5 %, 5 %, 10 % y 20 %; biocarbón y ceniza al 0,5 %, 1 %, 2,5 % y 5 %. CMP1: vermicompost, CPM2: compost de residuos de agricultura y lodos de depuradora, BC-P: biocarbón de corteza de pino, BC-G: biocarbón de gallinaza, BC-M: biocarbón de carozo de maíz y BA: ceniza de biomasa. Los asteriscos indican las diferencias significativas de cada tratamiento con el control (* $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) y las barras, el error estándar ($n = 3$).

Sin embargo, las mezclas que incorporaban CMP1 y BC-M, con o sin ceniza (M4 y M2, respectivamente) no tenían efecto sobre la lixiviación y el efecto era incluso negativo (aumento

de HCH lixiviado) cuando la mezcla no incorporaba CMP1 (M3 = BC-M +BA). Esto refleja la persistencia del efecto negativo observado con la aplicación individual de BC-M.

En la mezcla más eficiente (M1) el α -HCH era el isómero predominante en los lixiviados y, al igual que ocurría con la aplicación individual de CMP1, se observaba una menor proporción de β -HCH que en el control, lo que reflejaba una retención relativamente mayor de este isómero.

4.4.3 Efectos sobre la volatilización de HCH

Partiendo del suelo control contaminado con Σ HCH = 177,0 mg kg⁻¹, y después de 24 h de exposición en condiciones experimentales, se detectó en el aire una concentración de Σ HCH de 4,6 ± 0,02 ng m⁻³ (media ± SE) (3,7 ± 0,07 ng m⁻³ α -HCH; 0,1 ± 0,01 ng m⁻³ β -HCH; 0,2 ± 0,02 ng m⁻³ γ -HCH; 0,6 ± 0,03 ng m⁻³ δ -HCH) (Fig. R15). Esto correspondería a una volatilización del 3% del HCH total del suelo. La temperatura promedio durante el experimento fue de 20,5 ± 1,7 °C (media ± SD), con una humedad del 54,5 ± 9,1 % (media ± SD).

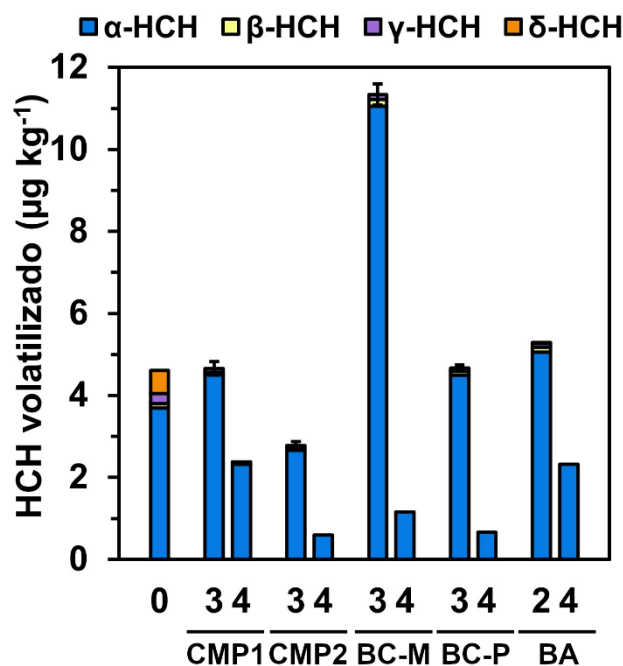


Fig. R15 Concentración de los isómeros de HCH (α -, β -, γ -, δ -) volatilizada tras 24 h desde el suelo sin tratar (control, dosis 0) y los suelos tratados con vermicompost (CMP1) y compost de lodos de depuradora (CMP2) a dosis del 10 % y 20 % (dosis 3 y 4); biocarbón de carozo de maíz (BC-M) y biocarbón corteza de pino (BC-P) a dosis del 2,5 % y 5 % (dosis 3 y 4); y ceniza de biomasa (BA) a dosis del 1 y 5 % (dosis 2 y 4). Los asteriscos indican las diferencias significativas de cada tratamiento con el control (* p<0,1; ** p<0,05; *** p<0,001) y las barras, el error estándar (n = 3).

Se observó una reducción significativa en la volatilización de HCH en todas las muestras con las dosis más altas de enmiendas (20 % en el caso de los compost y 5 % en el caso de los biocarbón y la ceniza). A dosis bajas, solo CMP2 logró una reducción del 50 % en la volatilización de HCH. Utilizando la dosis más alta, CMP2 y BC-P mostraron efectos similares, con reducciones del 87 y 85 %, respectivamente. BC-M y BA también redujeron la

volatilización de HCH, aunque el efecto fue menor, emitiendo $1,2 \pm 0,3$ y $2,3 \pm 0,1$ ng m^{-3} ΣHCH , respectivamente, lo que suponía una reducción de 50 al 75 %, con respecto al control. En dosis bajas, se observó un notable aumento de la volatilización cuando el suelo estaba enmendado con 2,5% de BC-M.

La distribución de los isómeros en aire fue $80 \% \alpha\text{-HCH} > 12 \% \delta\text{-HCH} > 5 \% \gamma\text{-HCH} > 2 \% \beta\text{-HCH}$ en el control, lo que difería de la composición original del HCH del suelo control y del lixiviado obtenido a partir de él (experimento anterior). Esta composición refleja una menor volatilización $\beta\text{-HCH}$ y mayor volatilización de $\gamma\text{-HCH}$ y, sobre todo, de $\delta\text{-HCH}$ a pesar de su baja presencia inicial (0,34 % del total de isómeros). Teniendo en cuenta el coeficiente de partición octanol-aire (K_{oa}), $\beta\text{-HCH}$ y $\delta\text{-HCH}$ tienen preferencia por la fase acuosa y $\alpha\text{-HCH}$ y $\gamma\text{-HCH}$, por la fase gaseosa. Esto explica el comportamiento de $\beta\text{-HCH}$, pero no de $\delta\text{-HCH}$. $\alpha\text{-HCH}$, es el isómero más abundante y volátil, y constituyó el 80 % del ΣHCH volatilizado. En los suelos enmendados a altas dosis, solo se detectó este isómero por encima del límite de cuantificación.

4.4.4 Discusión

La aplicación de enmiendas orgánicas es un elemento clave en estrategias de descontaminación de suelos, bien directamente, porque inmoviliza el contaminante o, indirectamente, porque estimula su biodegradación al incrementar la actividad metabólica del suelo (Xiang et al., 2022). En el presente estudio se evaluó la capacidad potencial de una variedad de enmiendas para reducir la movilidad de los isómeros de HCH, tanto en fase acuosa como gaseosa, en suelos contaminados. Las enmiendas ensayadas procedían de diferentes tipos de residuos orgánicos tratados por compostaje (CM1, CMP2), por pirólisis (BC-G, BC-M, BC-P) o por combustión (BA).

La retención de compuestos orgánicos en el suelo depende de las características intrínsecas del compuesto y de las características del suelo, jugando un papel crítico el contenido de materia orgánica (Sadegh-Zadeh et al., 2017). El suelo utilizado en este estudio era muy ácido, desaturado y con muy bajo contenido en materia orgánica y arcilla, propiedades que generan riesgos de lixiviación y volatilización de HCH en condiciones ambientales. En los ensayos realizados se obtuvo que el 22 % del HCH total presente del suelo se solubilizaba en un sistema acuoso tipo *batch* y el 3 % se volatilizaba en condiciones de laboratorio, confirmando que el suelo podría ser un foco importante de contaminación de aguas y aire. Todas las enmiendas modificaron profundamente las propiedades del suelo, incluso aplicadas a bajas dosis: neutralizaron, parcial o totalmente la acidez, incrementaron notablemente el contenido en carbono (a excepción de BA), aumentaron la CIC_e y el contenido de cationes cambiabiles, condiciones que podrían potenciar la retención de los contaminantes en el suelo y, por tanto, reducir su movilidad y biodisponibilidad. La intensidad de estos efectos dependía del tipo de enmienda y, normalmente, era proporcional a la dosis aplicada. Productos derivados de residuos orgánicos han sido utilizados con frecuencia como enmiendas edáficas, y efectos como el aumento del pH, el contenido de materia orgánica, de nutrientes y de la CIC_e , además de las condiciones físicas y biológicas, han sido ampliamente citados (Hailegnaw et al., 2019; Singh

et al., 2022). Como resultado de la pirólisis, la mayor parte de los biocarbones son alcalinos, debido a la presencia de compuestos inorgánicos y elementos alcalinos en los grupos funcionales de su superficie, lo que hace que estos materiales sean especialmente útiles para la enmienda de suelos ácidos (Berek y Hue, 2016). En nuestro caso, todas las enmiendas eran neutras a alcalinas (pH 6,9 a 10,5), pero los biocarbones obtenidos por pirólisis a mayor temperatura (500 - 550 °C) presentaban los valores más altos de pH (10,5 y 8,8 en BC-M y BC-P, respectivamente). A pesar de ello, aunque todas las enmiendas/dosis tenían un efecto neutralizante de la acidez del suelo original, observándose incrementos del pH de hasta más de 3 unidades, estos biocarbones lo hacían en menor medida, y el pH resultante era menor que el esperado (e.g. con la aplicación de BC-P, el pH máximo alcanzado fue de 5,9 y no presentaba relación directa con la dosis utilizada). Ya que estos biocarbones aportaron aluminio cambiante al suelo, esto podría estar provocando un efecto tampón, neutralizando parcialmente la alcalinidad aportada. La contribución de Ca y K cambiables, pero no de Al, a distintos tipos de suelo enmendados con biocarbón han sido demostrado previamente (Hailegnaw et al., 2019).

Los resultados del ensayo de movilización acuosa mostraron una considerable variación, lo que dependía de la enmienda y de la dosis aplicada. El tipo y condiciones de procesamiento de los residuos orgánicos (compostaje, pirólisis o combustión) y la materia prima utilizada condicionaban fuertemente las características de las enmiendas ensayadas. Tres de ellas, CMP1, CMP2 y BC-P, fueron muy eficientes en la retención de HCH. La aplicación de BC-P redujo la solubilización de HCH con todas las dosis, entre un 11 y un 24 %, mientras que CMP1 y CMP2 lo hicieron a las dosis más altas, llegando a reducir hasta el 54% del HCH solubilizado. No se encontraron efectos significativos con la aplicación de los biocarbones BC-G y BC-M, ni con la ceniza de biomasa (BA). Numerosos estudios han mostrado la capacidad que tienen las enmiendas orgánicas de adsorber pesticidas del suelo (Carpio et al., 2021). Por ejemplo, la incorporación compost aumentaba la retención de pesticidas en los suelos y reducía su lixiviación y biodisponibilidad (Sadegh-Zadeh et al., 2017). Biocarbones de distinta naturaleza mostraron una elevada capacidad de retención de compuestos organoclorados, como la terbutilazina (Wang et al., 2010) o la atracina (Ouyang et al., 2016) y otros contaminantes orgánicos, como compuestos derivados de diésel (Saiz-Rubio et al., 2019). Ali et al. (2019) mostraron una notable reducción de la bioaccesibilidad de pesticidas organoclorados (hasta un 86 % con respecto al control) en suelos incubados con distintos tipos de biocarbón (derivados de lodos de depuradora o de restos de cosecha, como paja de arroz, soja o cáscara de cacahuete). El incremento del contenido de carbono orgánico del suelo era el factor más relevante en la afinidad y proceso de sorción de pesticidas hidrófobos en el suelo (Carpio et al., 2021). En nuestro estudio se encontró una correlación significativa ($r = -0,88$, $p < 0,01$) entre el HCH solubilizado y el % C del suelo, pero notables excepciones se apartaban de esta tendencia, lo que refleja el efecto de otros factores relevantes en los procesos de retención (e.g. naturaleza de la materia orgánica, porosidad, contenido mineral de la enmienda...).

La aplicación de los dos tipos de compost fue muy eficiente en la retención de HCH, lo que se puede relacionar con las estructuras aromáticas y grupos carboxílicos y fenólicos, abundantes en las sustancias húmicas (Lee et al., 2020). No obstante, este efecto se observó sólo con las

dosis más elevadas (>10 %), mientras que las dosis más bajas no tenían efecto o, incluso, tendían a aumentar la solubilidad de HCH (CMP1, 2,5 %). La materia orgánica disuelta (MOD) podría tener un papel importante en el movimiento de plaguicidas en el suelo, ya que constituye una mezcla compleja de una amplia gama de estructuras químicas con potencial de múltiples interacciones (Barriuso et al., 2011). Se ha observado que la MOD puede formar complejos con los plaguicidas aumentando la solubilidad acuosa y su movilidad en el suelo (Sadegh-Zadeh et al., 2017), aunque este efecto ha sido ampliamente discutido y resultados contradictorios han sido obtenidos en otros estudios (Barriuso et al., 2011). La MOD de suelos enmendados con compost de lodos de depuradora y residuos vegetales, aumentó significativamente la movilidad de distintos contaminantes orgánicos, pero el efecto variaba según el carácter hidrofóbico e iónico de las moléculas, siendo más importante para contaminantes hidrofóbicos no iónicos (Chabauty et al., 2016). En nuestro ensayo, todas las enmiendas aumentaron el contenido de MOD en los suelos enmendados, pero este aumento fue sensiblemente más alto con la adición de compost, especialmente con las dosis más altas, coincidiendo con una mayor retención de isómeros de HCH. Este efecto podría reflejar un grado relativamente elevado de aromaticidad de la materia orgánica disuelta. Estudios recientes mostraron que la aromaticidad de la MOD de una gran variedad de tipos de compost oscilaba, en la mayoría de los casos, entre el 20 % y el 27 % y se relacionaba con la presencia de fracciones hidrofóbicas y recalcitrantes resistentes a la degradación (Silva et al., 2025). La tendencia hacia el incremento de solubilidad del HCH con la aplicación de dosis bajas de compost podría estar en línea con los resultados de Ben-Hur et al. (2003), quienes observaron que la MOD reducía la adsorción de atrazina por el suelo, pero esto solo era evidente en suelos con bajo contenido de materia orgánica.

La superficie de los biocarbones tienden a ser hidrófobos y apolares, y se esperaba una elevada afinidad por las moléculas de HCH. Sin embargo, los tres biocarbones ensayados presentaban resultados muy diferentes, lo que reflejaba diferencias significativas en las propiedades relevantes para los procesos de sorción (porosidad, carbono, aromaticidad, grupos funcionales, principalmente). Estas propiedades dependen, en gran medida, de las condiciones de pirólisis (Bornemann et al., 2007) y de la materia prima (Zhang et al., 2016). La mayor retención de HCH fue obtenida tras la aplicación de BC-P, coincidiendo con la elevada temperatura de pirólisis (550 °C) de este biocarbón, mientras que la aplicación de BC-G (300 °C) no tuvo efecto significativo. El incremento de temperatura durante la pirólisis produce un aumento de la porosidad, una mayor carbonización y la pérdida de grupos funcionales que contienen H y O, lo que se refleja en una menor polaridad y una mayor aromaticidad del biocarbón y mayor eficiencia en la retención de contaminantes orgánicos hidrofóbicos (Qiu et al., 2022). En coherencia, el biocarbón BC-P presentaba contenidos muy elevados de carbono (88 %) y valores muy bajos de la relación atómica H/C y O/C, lo que favorecería la repulsión de moléculas de agua y la atracción de compuestos hidrófobos como los isómeros de HCH. La adsorción de HCH en este biocarbón se produciría, principalmente, por procesos de llenado de poros, interacciones hidrofóbicas e interacciones π - π donante-aceptor de electrones (π - π EDA) (Sander y Pignatello, 2005; Zhang et al., 2016). Estas últimas se relacionan con la aromaticidad del biocarbón alcanzada a elevadas temperaturas, que podrían favorecer, incluso, la formación de estructuras similares al grafeno, capaces de interactuar tanto con donantes como con

aceptores de electrones (Sun et al., 2012). La relativa independencia del grado de retención con la dosis aplicada apunta a un posible efecto de saturación, lo que sería coherente también con una retención competitiva no lineal propia de la materia orgánica carbonizada (Beesley et al., 2011). Por el contrario, el biocarbón BC-G presentaba la menor concentración de carbono y las mayores relaciones molares H/C y O/C, reflejando superficies hidrofílicas que podrían evitar la retención de HCH y contrarrestar la posible retención por procesos de reparto, que serían los dominantes en la fracción no carbonizada (Zhang et al., 2016). De hecho, se ha demostrado que los biocarbones producidos a baja temperatura son más eficientes en la retención de contaminantes polares, tanto orgánicos como inorgánicos (Arán et al., 2017, 2016; Qiu et al., 2022; Saiz-Rubio et al., 2019). Además, el BC-G deriva de residuos animales, materiales que dan lugar a biocarbones de menor superficie específica, contenido en C y mayor capacidad de intercambio catiónico en comparación con los biocarbones obtenidos de residuos vegetales. La composición de la materia prima también puede explicar las notables diferencias obtenidas con la aplicación de los biocarbones BC-M y BC-P, pirolizados a temperaturas similares (500 °C y 550 °C, respectivamente). Aunque ambos biocarbones provienen de restos vegetales, el contenido en lignina, componente con el que se asocia la formación de carbono aromático (Zhao et al., 2013), supone en torno al 50 % de la corteza de pino (Barros et al., 2023), mientras que sólo es el 12 % de la carozo de maíz (Pointner et al., 2014). Con la aplicación de BC-M se apreciaba, además, una tendencia al incremento de la solubilidad, incluso con las dosis más bajas. Este efecto, poco observado en la literatura, sugiere el dominio de algún mecanismo de repulsión entre el contaminante y la superficie de BC-M, que podría derivar de la presencia de superficies hidrofílicas (mayor relación O/C), un bloqueo de la porosidad y/o un colapso de los poros durante la carbonización (Beesley et al., 2011). El bloqueo de las superficies externas del biocarbón podría derivar de una competencia de la materia orgánica disuelta con los contaminantes orgánicos por los mismos sitios de adsorción (Cabrera et al., 2014; García-Jaramillo et al., 2014; Marín-Benito et al., 2014). En nuestro estudio, el incremento de DOC al suelo tratado con biocarbones era relativamente bajo, excepto en la dosis más alta de BC-M. Este biocarbón también tenía un elevado contenido de K, elemento que pudo haber contribuido al bloqueo la porosidad superficial.

Se ha mostrado que la aplicación combinada de biocarbón y compost era más efectiva que el uso individual de biocarbón para mejorar las propiedades del suelo, el crecimiento vegetal, el secuestro de carbono y la mitigación de la contaminación (Dewi et al., 2024). Nuestros resultados indicaron que la adición de compost no mejora significativamente el comportamiento de BC-M. Sin embargo, la aplicación de ceniza (BA) mejoraba significativamente la retención del compost, sugiriendo un efecto sinérgico. La interacción de los grupos funcionales del compost con los componentes no cristalinos de la ceniza podría aumentar la hidrofobicidad de las superficies orgánicas y aumentar la retención de HCH por interacciones hidrofóbicas. Además, la ceniza podría también aumentar la retención por reparto y estos mecanismos podrían actuar de forma independiente o sinérgica.

Por otro lado, aunque numerosos estudios han demostrado el transporte de HCH en aire (De La Torre et al., 2018; Isogai et al., 2018; Li et al., 2007), no hay mucha información sobre

los procesos que controlan su movilidad en el sistema suelo-aire y el impacto de la aplicación de enmiendas edáficas. En este estudio se ha visto que las enmiendas orgánicas aplicadas a bajas dosis no tenían efecto sobre la volatilización, incluso se observó un aumento significativo con la aplicación de BC-M. Sin embargo, todas las enmiendas eran muy eficientes cuando se aplicaban a dosis mayores (5 % de biocarbones o cenizas, 20 % de compost), reduciendo la volatilización hasta un 85 %.

Por último, cabe destacar que los experimentos realizados mostraron ciertas diferencias de comportamiento entre los distintos isómeros de HCH. En el suelo sin enmendar, la concentración de isómeros en el lixiviado seguía el orden α -HCH > β -HCH > δ -HCH > γ -HCH, mientras que en aire α -HCH > δ -HCH > γ -HCH > β -HCH. El predominio del isómero α en el residuo contaminante y su mayor solubilidad y volatilidad justifican su presencia mayoritaria tanto en agua como en aire y, por tanto, su mayor potencial de movilización y transferencia. Para el resto de los isómeros, menos móviles, β -HCH sería transportado preferentemente en agua, mientras que δ -HCH lo haría en aire. Las enmiendas orgánicas fueron especialmente eficientes en la retención de β -HCH, que llegaron a reducir hasta un 70 % su solubilidad y hasta un 100 % su volatilización, lo que concuerda con otros estudios en los que se observó una elevada afinidad de este isómero por la materia orgánica del suelo y componentes lipídicos vegetales. Igualmente, se redujo totalmente la volatilización de γ - y δ -HCH.

En conjunto, los resultados demuestran que la selección adecuada de enmiendas edáficas puede reducir simultáneamente la lixiviación y volatilización de HCH en suelos contaminados, mitigando su transferencia a otros compartimentos y mejorando las condiciones edáficas. La eficacia depende tanto del tipo como de la dosis: el biocarbón de pino a bajas dosis (< 2,5 %) y los compost a altas dosis (> 10 %) fueron los más efectivos en reducir la solubilidad del HCH, mientras que todas las enmiendas disminuyeron significativamente su volatilización (hasta un 85 %) a altas dosis. La aplicación de estas enmiendas constituye una alternativa sostenible y económica, alineada con los principios de la economía circular, adecuada para el tratamiento de suelos contaminados de gran extensión.

4.5 ELECTROCHEMICAL OXIDATION AND DEGRADATION KINETICS OF HCH

Thirteen 2 h electrochemical oxidation treatments were applied to optimise the operating parameters (current density -CD-, electrolyte -Na₂SO₄- and HCH concentration) using a BDD-SS electrode (boron-doped diamond-stainless steel). Each parameter was adjusted to different levels (L, M o H, corresponding to low, medium or high). The degradation kinetics of HCH isomers and their degradation in contaminated soil leachates were evaluated under the established electrochemical conditions.

4.5.1 Setting operating parameters

The control experiment conducted without current showed minimal changes in HCH concentration, suggesting that water evaporation and/or adsorption were negligible. Furthermore, no cross-contamination was detected between two consecutive experiments.

All electrochemical treatments resulted in notable changes in the properties of the solution. Specifically, pH dropped from 5.8 ± 1.1 to 3.3 ± 0.7 , while temperature increased from 19.3 ± 0.6 °C to 24.8 ± 5.8 °C. The temperature rise may be attributed to electrochemical reactions and constant stirring, although previous studies suggest this factor has minimal impact on oxidation efficiency (Moreira et al., 2017). The pH reduction is consistent with the findings of Dominguez et al. (2018b), who monitored pH throughout the electrooxidation of lindane using different electrode materials and reported rapid acidification to values around pH 3. This pH change has been attributed to 1) the release of H^+ ions during mineralisation, 2) the formation of acidic by-products (short-chain carboxylic acids) and 3) the oxidation of chloride ions, which also generates H^+ . In the present study, pH was measured at the beginning and end of each treatment. Although continuous pH monitoring was not performed, the final pH values confirm that acidification occurred during the electrochemical oxidation of HCH. According to Dominguez et al. (2018b), this decrease does not significantly affect γ -HCH degradation, as similar removal efficiencies were observed between pH 3 and neutral conditions.

The removal of Σ HCH (sum of HCH isomers) obtained in the different electrochemical treatments ranged from 41 % to a maximum of 76 %, with the applied electric current identified as the primary influencing factor (Table R5). At the lowest CD (1.3 mA cm^{-2}), treatment efficiencies were generally around 40 %, except for treatment LLL, which achieved 67 ± 8 % degradation. At medium CD (5.65 mA cm^{-2}), results improved, with values ranging from 53 ± 7 % to 72 ± 9 %. Notably, higher degradation was observed at lower initial HCH concentrations (e.g. MLL vs. MHL: 69 ± 8 % vs. 53 ± 7 %), a trend that persisted across all CD levels. At the highest CD tested (10 mA cm^{-2}), the overall yield was close to 70 %, and the HLH and HLL treatments (both with low HCH concentration) had the best results: 76 ± 11 % and 76 ± 10 %, respectively.

Table R5 Electrochemical oxidation treatments of HCH isomers using the experimental-design factors at different levels and their corresponding degradation responses. Current density was calculated for an anode surface area of 75 cm^2 . L, M and H denote low, medium and high levels of the evaluated factors (current density, HCH concentration and Na_2SO_4 concentration). MMM represents the central point.

Treatment	Current density (mA cm^{-2})	Σ HCH ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Na_2SO_4 (g L^{-1})	% Degradation response (mean \pm SD)				
				Σ HCH	α -HCH	β -HCH	γ -HCH	δ -HCH
LLL	1.3	310	1	67 ± 8	59 ± 19	44 ± 20	91 ± 15	52 ± 8
LLH	1.3	310	10	47 ± 6	35 ± 10	58 ± 6	65 ± 4	41 ± 5
LHL	1.3	3100	1	42 ± 7	35 ± 8	45 ± 8	49 ± 3	41 ± 12
LHH	1.3	3100	10	41 ± 5	32 ± 21	37 ± 22	57 ± 7	34 ± 8
MLL	5.65	310	1	69 ± 8	62 ± 15	68 ± 5	84 ± 6	63 ± 5
MLH	5.65	310	10	72 ± 9	69 ± 9	67 ± 10	90 ± 4	56 ± 15
MMM	5.65	1705	5.5	63 ± 2	56 ± 16	40 ± 4	87 ± 6	48 ± 1
MHL	5.65	3100	1	53 ± 7	46 ± 11	47 ± 18	72 ± 10	43 ± 4
MHH	5.65	3100	10	67 ± 5	65 ± 16	56 ± 4	88 ± 6	51 ± 5

Treatment	Current density (mA cm ⁻²)	ΣHCH (µg L ⁻¹)	Na ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	% Degradation response (mean ± SD)				
				ΣHCH	α-HCH	β-HCH	γ-HCH	δ-HCH
HLL	10	310	1	76 ± 10	72 ± 11	77 ± 13	90 ± 4	66 ± 14
HLH	10	310	10	76 ± 11	73 ± 21	47 ± 25	95 ± 4	62 ± 11
HHL	10	3100	1	73 ± 2	72 ± 4	63 ± 1	92 ± 8	58 ± 2
HHH	10	3100	10	69 ± 4	67 ± 4	60 ± 6	88 ± 3	53 ± 4

Statistical analysis confirmed current density as a statistically significant positive factor, *i.e.* as current density increased, higher degradation percentages were observed, and initial HCH concentration as a significant negative factor, meaning that higher concentrations led to lower degradation percentages, as depicted in Fig. R16. Interactions among variables were not statistically significant ($p > 0.05$). The Durbin-Watson test ($p = 0.33$) indicated no treatment order effects. Based on these findings, a contour plot (Fig. R16-F) was generated. The combination of factor levels that maximizes the degradation of HCH was a current density of 10 mA cm⁻², an HCH concentration of 310 µg L⁻¹ and a Na₂SO₄ concentration of 1 g L⁻¹ (*i.e.* HLL treatment).

Current density is an important operating factor in electrochemical oxidation, as it directly influences the production of hydroxyl radicals. Consequently, it has been extensively studied in this context. In general, increasing the current density improves the degradation of pollutants such as pharmaceuticals (El-Ghenymy et al., 2013), PFAS (Uwayezu et al., 2021), bisphenol B (Salas-Sandoval et al., 2024), and pesticides (Domínguez et al., 2018c; Herraiz-Carboné et al., 2024a, 2024b; Muñoz-Morales et al., 2017). Herraiz-Carboné et al. (2024b) demonstrated that high CD are more effective for the complete removal and mineralisation of chlorinated organic compounds (including HCH isomers) in contaminated groundwater when using a BDD-stainless steel electrode system. Current densities above 25 mA cm⁻² enhance the generation of reactive species that rapidly degrade pollutants in under 300 min. However, these conditions also lead to increased energy consumption and the formation of toxic by-products, primarily perchlorate. In contrast, lower CDs (5 - 10 mA cm⁻²) can still achieve high removal efficiencies (up to 90%) with reduced energy demand and by-product formation. Dominguez et al. (2018b) also investigated the influence of CD on the electrochemical oxidation of lindane using a BDD-carbon filter electrode system. Although increasing CD from 2.08 to 16.67 mA cm⁻² improved HCH removal and mineralisation, the authors selected 8.33 mA cm⁻² as the optimal level due to its energy efficiency. Indeed, evaluating energy consumption is essential to ensure the environmental, practical and economic viability of electrochemical treatments for contaminated water and soil (Rodrigo et al., 2014).

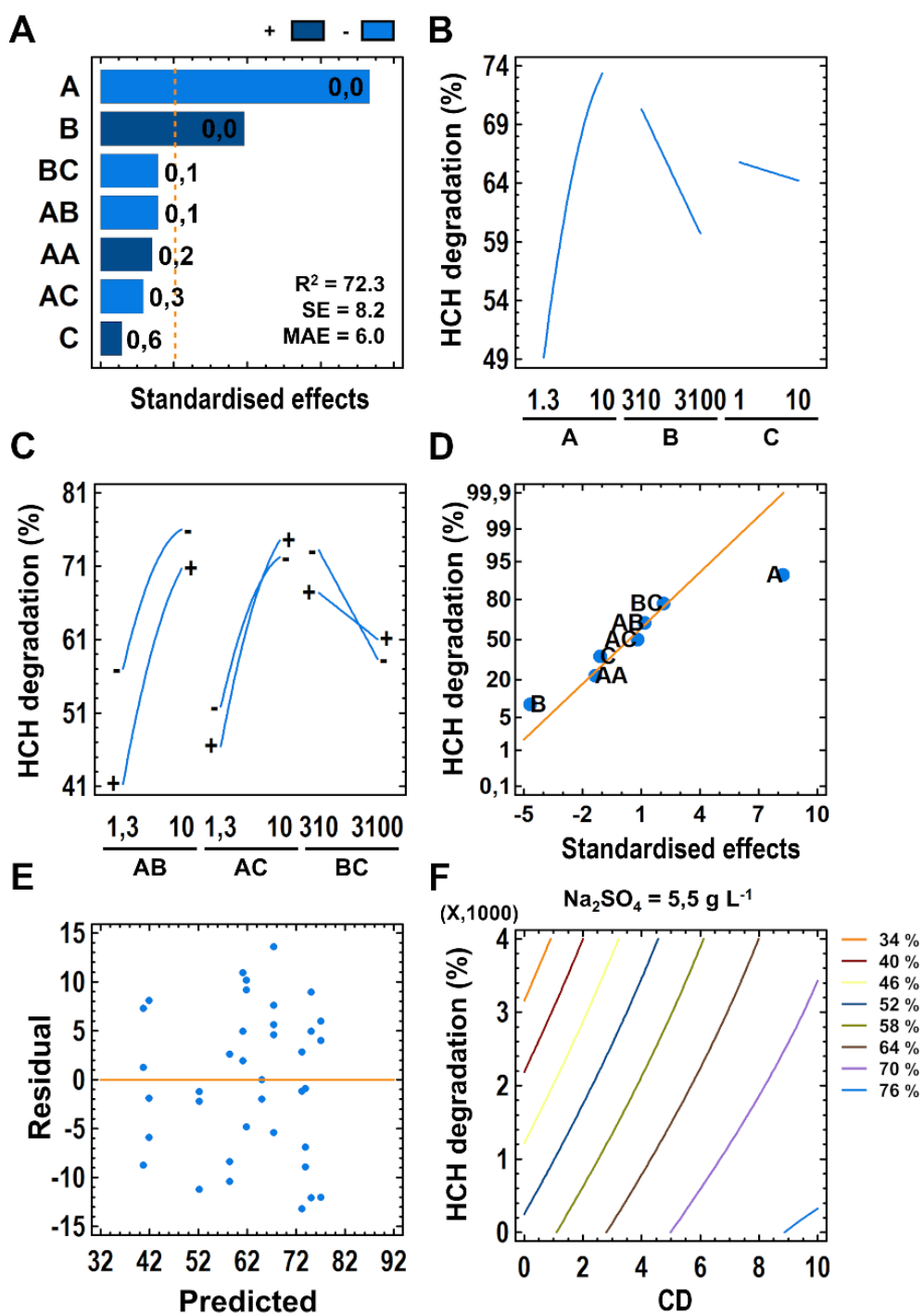


Fig. R16 Graph A shows the magnitude and significance of the factors tested in the experiment (A: current density, B: HCH concentration, and C: Na_2SO_4 concentration); orange dotted line indicates statistical significance (p -value < 0.05; p -values within the bars). Graph B indicates the response to each factor and graph C, the potential interactions between pairs of factors. The normal probability plot of the effects (graph D), the residual plot (graph E) and the contour plot of the estimated response surface (graph F) are included.

In the present study, energy consumption varied according to the CD applied: 2.4 and 2.8 kWh m^{-3} for low CDs, 16.4 and 23.2 kWh m^{-3} for medium CDs and 29.6 and 49.1 kWh m^{-3} for high CDs (Fig. R17). Energy consumption increased with both CD and initial HCH, but decreased with higher electrolyte concentration. For example, increasing Na_2SO_4 concentration

in the HLH treatment (compared to HLL) reduced energy use from 41.0 kWh m⁻³ to 29.6 kWh m⁻³. Furthermore, combining higher electrolyte concentration with lower CD, as in treatment LLH, further reduced energy consumption to 2.4 kWh m⁻³. A detailed evaluation of energy efficiency, expressed as mg HCH per kWh, revealed that lower CD are more efficient: values ranged from 0.07 to 0.49 mg HCH kWh⁻¹ for low CDs, 0.01 to 0.09 mg HCH kWh⁻¹ for medium CDs and 0.01 to 0.07 mg HCH kWh⁻¹ for high CDs. This confirms that lower CDs require less energy per unit of pollutant removed, consistent with previous findings (Dominguez et al., 2018c; Herraiz-Carboné et al., 2024a, 2024b). The reduced efficiency at high CDs is attributed to the promotion of parasitic reactions (Moreira et al., 2017).

Under the experimental conditions, maximum removal (76 %) was obtained with treatments HLH and HLL, with HLH (Na₂SO₄ = 10 g L⁻¹) proving more energy efficiency than HLL (Na₂SO₄ = 1 g L⁻¹). However, the MLH and LLL treatments also offer suitable alternatives, achieving 72 and 67 % degradation, respectively, at significantly lower costs (16.4 kWh m⁻³ and 2.7 kWh m⁻³). In line with the main objective of this study, CD was selected to prioritise pollutant removal; nonetheless, future studies on HCH electrooxidation should consider the trade-off between increased CD, energy consumption and potential formation of toxic by-products.

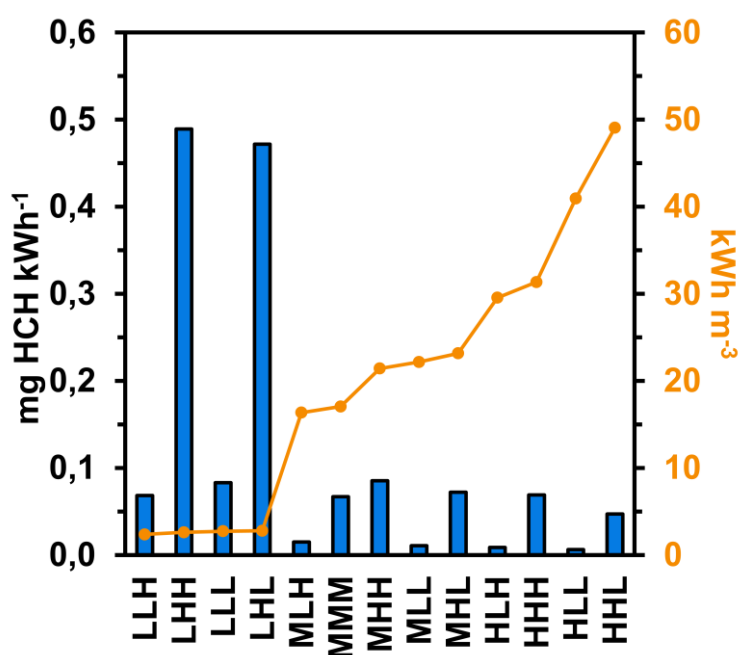


Fig. R17 Energy efficiency (blue bars, left axis) expressed as mg of HCH removed per kWh, and specific energy consumption (yellow line, right axis) in kWh per m³ treated, under various combinations of operational parameters. L = low, M =medium, H = high, corresponding to the levels of the evaluated factors: current density (CD), HCH concentration and Na₂SO₄ concentration.

It is well established that higher initial pollutant concentrations tend to reduce degradation efficiency and require longer treatment times to achieve a given level of contaminant removal (Moreira et al., 2017). In this study, initial HCH concentration showed a statistically significant negative effect on removal efficiency, aligning with the findings of Uwayezu et al. (2021) and Del Rosario Salas-Sandoval et al. (2024), who reported similar trends during the

electrochemical degradation of PFOA and Bisphenol B, respectively. Conversely, Herraiz-Carboné et al. (2024b) observed higher removal efficiency for HCH isomers in synthetically contaminated groundwater at a higher initial concentration, with a reactivity trend of δ -HCH > γ -HCH > α -HCH > β -HCH. This trend was not replicated under the present experimental conditions. The isomers α -, γ - and δ -HCH were present at equal concentrations, while β -HCH was present at a concentration ten times lower. The degradation results revealed that γ -HCH was the most susceptible isomer to electrooxidation, achieving removal efficiencies between $65 \pm 6\%$ to $95 \pm 11\%$, except in LHL and LHH treatments, which involved the least favourable parameters for degradation (i.e., low current density and high HCH concentration). In contrast, α -, β -, and δ -HCH, displayed lower and relatively similar removal efficiencies, ranging from $32 \pm 5\%$ to $73 \pm 21\%$, $37 \pm 21\%$ to $77 \pm 13\%$, and $34 \pm 7\%$ to $66 \pm 14\%$, respectively, regardless of initial concentration.

The varying reactivity among the isomers is likely related to the spatial orientation of the chlorine atoms in the cyclohexane ring, axial or equatorial (Wacławek et al., 2019; Willett et al., 1998), with axial chlorines being more reactive. Based on this, the expected order of reactivity would be β -HCH < δ -HCH < α -HCH < γ -HCH (from zero axial to six axial chlorine). This could explain why β -HCH, despite being present at the lowest concentration, exhibited degradation efficiencies comparable to δ - and α -HCH, or why δ -HCH showed lower efficiencies than α - and γ -HCH, even when present at the same concentration. These findings suggest that while γ -HCH can be effectively removed under a broad range of conditions, the remaining isomers are more recalcitrant and require further optimisation of operational parameters. Differences in degradation trends reported in the literature may arise from variations in matrix composition. For instance, Herraiz-Carboné et al. (2024b) used BDD-SS electrode to treat groundwater containing 26 chlorinated organic compounds, potentially affecting degradation kinetics. Studies employing other treatment technologies have also reported different isomer degradation trends. For example, the photooxidation of a DNAPL polluted groundwater resulted in higher degradation rates of δ - and γ -HCH compared to α -HCH (Conte et al., 2022), while thermally activate persulfate treatment in soil showed the trend: β -HCH > α -HCH > γ -HCH > δ -HCH, attributed to differences in isomer solubility (C. M. Domínguez et al., 2021). These discrepancies highlight the importance of developing isomer-specific strategies in the electrochemical remediation of HCH-contaminated environments.

The role of electrolyte concentration remains unclear. While some studies suggests that higher concentrations enhance degradation, others report that this effect only persists up to a certain threshold (Moreira et al., 2017). Uwayezu et al. (2021) investigated the influence of initial Na_2SO_4 concentration on the degradation of PFOA and the formation of fluoride ions (F^-), an indicator of complete degradation. Although increasing the electrolyte concentration did not significantly affect PFOA removal, it did influence F^- formation. Furthermore, the interaction between electrolyte concentration and other operational factors, such as time and CD, diminished the influence of these variables on overall mineralisation and F^- release. In the present study its effect on HCH degradation was not statistically significant, and $1 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ was selected for subsequent experiments. However, as noted earlier (Fig. 17), increasing

electrolyte concentration may reduce energy consumption. Therefore, further research is needed to clarify the role of electrolyte concentration in the complete mineralisation of HCH.

4.5.2 Kinetic degradation study

To study the degradation kinetics of HCH isomers, an experiment was conducted using the isomers both individually and in combination, sampled at different time intervals (15, 30, 60, 120, and 240 min), under the previously established operational conditions: $CD = 10 \text{ mA cm}^{-2}$, Na_2SO_4 concentration = 1 g L^{-1} and HCH concentration = $310 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. For the individual isomer solutions, concentrations were $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for α -, γ -, or δ -HCH, and $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for β -HCH.

In the mixed solution containing all four HCH isomers, degradation began at 30 min and progressed over time, reaching 89 % after 4 h (Fig. R18). At the initial concentration of $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ of γ -, α - and δ -HCH, the degradation percentages were: 98 % γ -HCH > 85 % α -HCH > 83 % δ -HCH. The β -HCH isomer, starting from a concentration ten times lower, was degraded by 89%, reaching a final concentration of $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. The higher degradation efficiency is likely attributable to the lower initial concentration, despite β -HCH known resistance to degradation due to the absence of axial chlorine atoms. To investigate this, an additional experiment was carried out in which the β -HCH concentration was increased to $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, resulting in 80% degradation. This indicates that concentration influences degradation efficiency. These findings contrast with those reported by Dominguez et al. (2018c), who observed similar degradation behaviour among HCH isomers using a BDD-carbon felt electrode in contaminated groundwater, and with Herraiz-Carboné et al. (2024b), who reported a reactivity trend of δ -HCH > γ -HCH > α -HCH > β -HCH. However, the present results are consistent with the expected reactivity order based on chlorine atom orientation in the cyclohexane ring, as isomers with a greater number of axial chlorines, such as γ -HCH, are more susceptible to electrochemical degradation.

When treated individually, all four isomers began to degrade after 15 min (Fig. R18). For γ -HCH and β -HCH, degradation kinetics were similar whether treated alone or in combination. Both isomers achieved high degradation (98% for γ -HCH and 92% for β -HCH). In contrast, α -HCH showed improved degradation when treated individually, achieving 95 % degradation and reaching a final concentration of $6 \pm 5.3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, compared to 85 % degradation in the mixed-isomer solution. The isomer δ -HCH showed reduced degradation efficiency when isolated. When tested individually, the degradation efficiency trend followed the expected reactivity order: γ -HCH > α -HCH > β -HCH > δ -HCH. These results confirm that under the given experimental conditions, γ -HCH is the most susceptible isomer to degradation, while δ -HCH may act as a limiting factor in a mixed contaminant system.

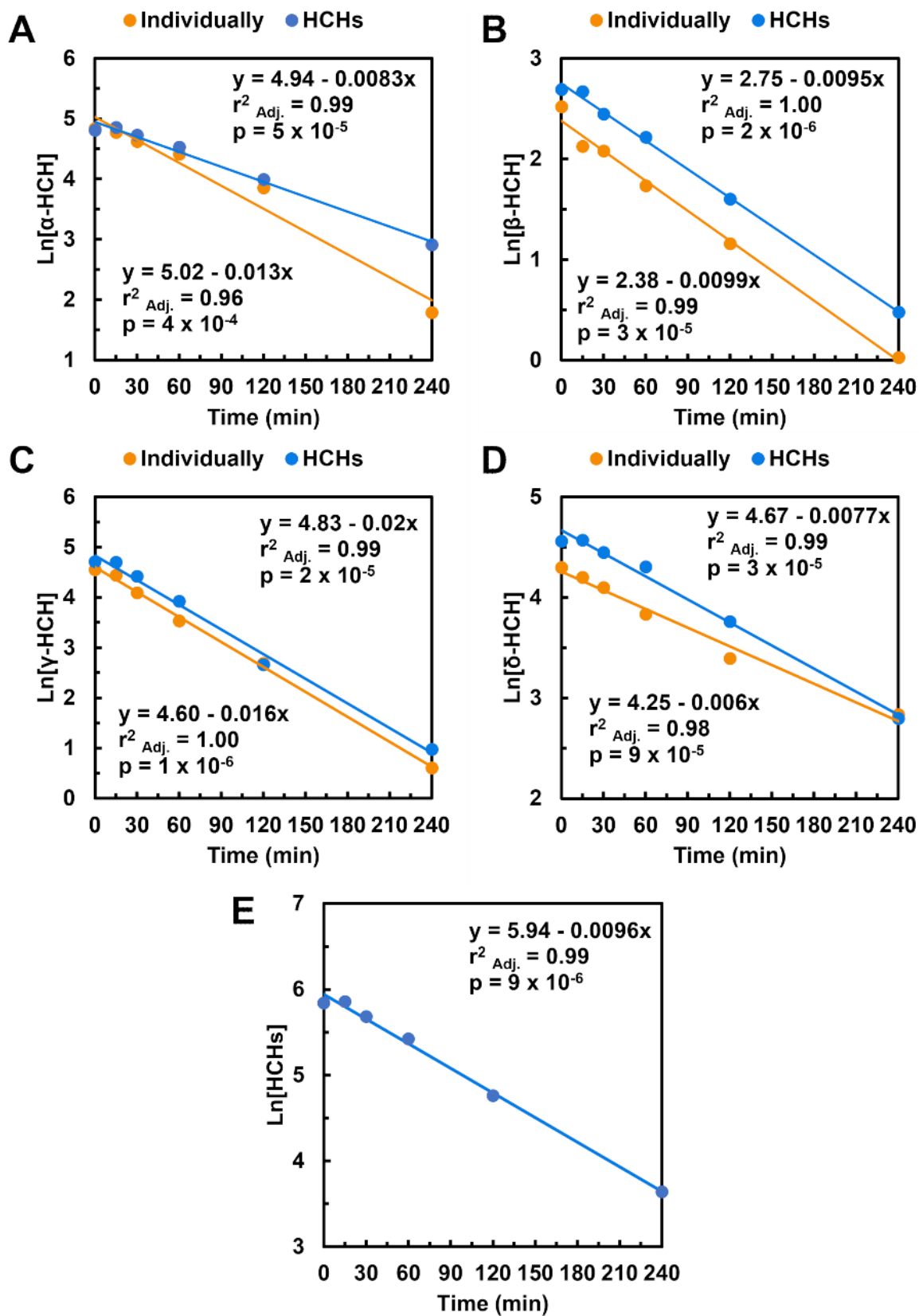


Fig. R18 Degradation kinetics of HCH isomers treated individually (orange lines) and in combination (blue lines). Parameters from the first-order kinetic model fitting, including the curve equation, adjusted r^2 , and p-value (ANOVA), are shown on each plot.

DE COMPOSTELA

Time played a crucial role in the degradation process. In the electrochemical experiment section, a 2 h treatment achieved a maximum degradation of 76 %, while the 4 h degradation kinetics experiment yielded a higher degradation of 89 %, under the same conditions. Uwayezu et al. (2021) also highlighted the importance of treatment duration in the electrochemical degradation of PFOA and F⁻ ion formation, where increased reaction time promoted complete degradation of PFOA.

Anodic oxidation reactions are typically described as pseudo-first reactions (Domínguez et al., 2018c; Moreira et al., 2017), and the experimental data fit a first-order kinetic reaction, as observed in previous studies (Herraiz-Carboné et al., 2024b). Data were fitted to the Equation 6 and kinetic constants are shown in Fig. R18. The pollutant's half-life time and the speed of the reaction were calculated using Equations 7 and 8, included in Table R6.

$$\ln[HCH]_t = \ln[HCH]_0 - kt \quad (6)$$

where [HCH]_t is the concentration of HCH isomers individually (α-, β-, γ-, and δ-HCH) or in combination (ΣHCH) in the corresponding time interval (t), [HCH]₀ is the initial concentration and k is the kinetic rate constant.

$$\ln([HCH]_{0/2}) = \ln[HCH]_0 - kt_{1/2} \quad (7)$$

$$\ln([HCH]_{0/2}) - \ln[HCH]_0 = -kt_{1/2}$$

$$\ln\frac{1}{2} = -kt_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

And the speed of the reaction was calculated as follows:

$$v = k \cdot [HCH]_0 \quad (8)$$

Table R6 Kinetic parameters for HCH isomers treated individually and in combination, including reaction rates (V), half-life times (T_{1/2}), and degradation efficiencies (%), calculated from first-order model fits.

	Combination			Individually		
	V (μg L ⁻¹ min ⁻¹)	T _{1/2} (min)	Degradation (%)	V (μg L ⁻¹ min ⁻¹)	T _{1/2} (min)	Degradation (%)
ΣHCH	3.29	72.43	89	-	-	-
α-HCH	1.01	83.71	85	1.6	54.67	95
β-HCH	0.14	73.27	89	0.12	69.80	92
γ-HCH	1.82	42.34	98	1.57	41.90	98
δ-HCH	0.73	90.49	83	0.46	111.80	77

The degradation rate varied depending on the isomer and whether it was treated individually or in combination with others. γ -HCH and β -HCH exhibited the highest kinetic constants, approximately 0.02 s^{-1} for γ -HCH and 0.009 s^{-1} for β -HCH, regardless of treatment condition. In contrast, the kinetic constant for α -HCH increased from 0.008 s^{-1} in the mixture to 0.013 s^{-1} when isolated, possibly due to reduced competition with other isomers. Unexpectedly, the rate constant of δ -HCH decreased from 0.0077 s^{-1} in the mixture to 0.006 s^{-1} when isolated. Despite this change, δ -HCH still exhibited the lowest rate constant and remained the most recalcitrant isomer. These results differ from those reported by Herraiz-Carboné et al. (2024b), who observed comparable removal rates for all HCH isomers when varying CDs using a BDD-stainless steel electrode configuration. However, similar results were obtained by Domínguez et al. (2018c), who reported higher degradation rates for neonicotinoids pesticides in individual solutions compared to mixtures.

In the mixed solution containing all four HCH isomers, after 4 h, 89 % of Σ HCH were degraded, with a half-life time of approximately 1 h and 12 min. Individual half-life times for the isomers, calculated using Equation 7, showed different resistances to degradation: $\delta > \alpha > \beta > \gamma$ (90 min > 84 min > 73 min > 42 min).

In the individual solutions, half-life times for β - and γ -HCH were similar, but the half-life time of α -HCH decreased notably from 1 h and 20 min to less than 1 h. Surprisingly, δ -HCH was more resistant to degradation when isolated than in the mixture. In these cases, degradation resistance followed the order: $\delta > \beta > \alpha > \gamma$ (112 min > 70 min > 55 min > 42 min).

4.5.3 Electrochemical oxidation of HCH in soil leachates

To evaluate whether the results obtained under controlled conditions are viable in similar real conditions, the optimal conditions for the electrochemical oxidation of HCH isomers (750 mA and $1 \text{ g Na}_2\text{SO}_4 \text{ L}^{-1}$) were applied to leachates derived from two contaminated soils.

The complexity of the aqueous matrix is a critical factor that can influence the efficiency of the treatment technology. This is primarily due to the presence of inorganic ions, which may generate secondary oxidants, and the organic content, which can compete with the target pollutant for reactive species. For example, (Domínguez et al., 2018c) reported complete elimination of four HCH isomers and 90 % TOC removal after 4 h of electrolysis at 400 mA in a groundwater with high salts concentration (SO_4^{2-} , HCO_3^- , Cl^-) and naturally present ferrous iron. In that case, the characteristics of the groundwater enabled a combination of anodic oxidation with the electro-Fenton process (reaction between H_2O_2 and ferrous iron), generating hydroxyl radicals both at the electrode and in solution. Additional oxidation was provided by sulphate and chloride ions forming reactive radicals and chlorine species, contributing to the high TOC removal. In contrast, other studies have reported lower degradation rates of target pollutants in wastewaters with high organic loads (J. R. Domínguez et al., 2021; El-Ghenymy et al., 2013; Llompарт et al., 2019; Salas-Sandoval et al., 2024; Santos et al., 2018; Uwayezu et al., 2021).

The characteristics of the soils were described in Table M5. Briefly, both were acid soils with moderate to high organic matter content and low cation exchange capacity (CEC) composed mainly of Ca and Mg. Notably, the soils differed significantly in HCH concentrations and in carbon content, which influences HCH sorption. Soil 1 exhibited higher HCH contamination, with a total HCH concentration of 28 mg kg^{-1} , primarily composed β -HCH (64%), followed by α -HCH (35 %), γ -HCH (0.7 %), and δ -HCH (0.5 %), and a lower carbon content of 31.7 g kg^{-1} . In contrast, Soil 2 had lower HCH contamination, with a concentration of 10 mg kg^{-1} , also primarily composed of β -HCH (70 %), with α -HCH (30 %), γ -HCH (0.4 %), and δ -HCH (0.3 %), alongside a higher carbon content of 68.2 g kg^{-1} .

After leaching, HCH concentrations in the leachates were 0.2 mg L^{-1} in Soil leachate 1 (74 % α -HCH, 26 % β -HCH and 1 % γ -HCH) and 0.1 mg L^{-1} in Soil leachate 2 (68 % α -HCH, 30 % β -HCH, 1 % γ -HCH, and 1 % δ -HCH). These compositions reflect the corresponding soil concentrations and isomer solubilities. Electrochemical oxidation was performed over 4 h at room temperature ($18 \text{ }^\circ\text{C}$) and under natural pH conditions (Soil leachate 1: 6.6 and Soil leachate 2: 5.9). Electrical conductivity was also measured (Soil leachate 1: 1.9 mS cm^{-1} and Soil leachate 2: 1.8 mS cm^{-1}). After treatment, ΣHCH concentration were reduced by 92 ± 0.4 and 89 ± 4.2 % in Soil leachate 1 and Soil leachate 2, respectively (Fig. R19). Notably, after the first 2 h, approximately 70 % of ΣHCH were removed (64 ± 5.8 % in Soil leachate 1 and 71 ± 8.7 % in Soil leachate 2). These results were comparable to those obtained in synthetic water, demonstrating that this method is effective and reproducible under real conditions.

Again, the reactivity and concentration of the individual HCH isomers influenced their respective degradation efficiencies. After 2 h, the degradation trend in both leachates was $\gamma\text{-HCH} > \alpha\text{-HCH} > \delta\text{-HCH} > \beta\text{-HCH}$ (except for $\delta\text{-HCH}$, which was absent in Soil leachate 1). After 4 h, the order shifted to $\alpha\text{-HCH} > \gamma\text{-HCH} > \beta\text{-HCH}$ (Soil leachate 1) and to $\delta\text{-HCH} > \gamma\text{-HCH} > \alpha\text{-HCH} > \beta\text{-HCH}$ (Soil leachate 2), confirming the influence of matrix composition.

Total carbon analysis indicated initial concentrations of 35 mg L^{-1} in Soil leachate 1 and 55 mg L^{-1} in Soil leachate 2, with organic carbon accounting for over 90 % in both cases. ΣHCH represented only a minor fraction of the organic carbon (0.6% in Soil leachate 1 and 0.3% in Soil leachate 2); thus, their degradation had minimal influence on TOC values.

Electrochemical treatment resulted in a 56 % TOC reduction in Soil leachate 1 and a 206 % increase in inorganic carbon, suggesting mineralisation of organic compounds. In contrast, Soil leachate 2 showed only a 32 % TOC reduction, considerably lower than that observed in Soil leachate 1. Although HCH degradation remained high (89 %), it was slightly lower than in Soil leachate 1 (92 %). This suggests that the higher TOC in Soil leachate 2 may have reduced both TOC removal and HCH degradation efficiency, likely due to competition for oxidising species. A similar effect was reported by Uwayezu et al. (2021), who observed that the sample with the highest TOC had the lowest PFAS degradation efficiency. However, the relationship was not strictly proportional, as PFAS degradation efficiency remained comparable to that observed in other samples with up to three times lower initial TOC.

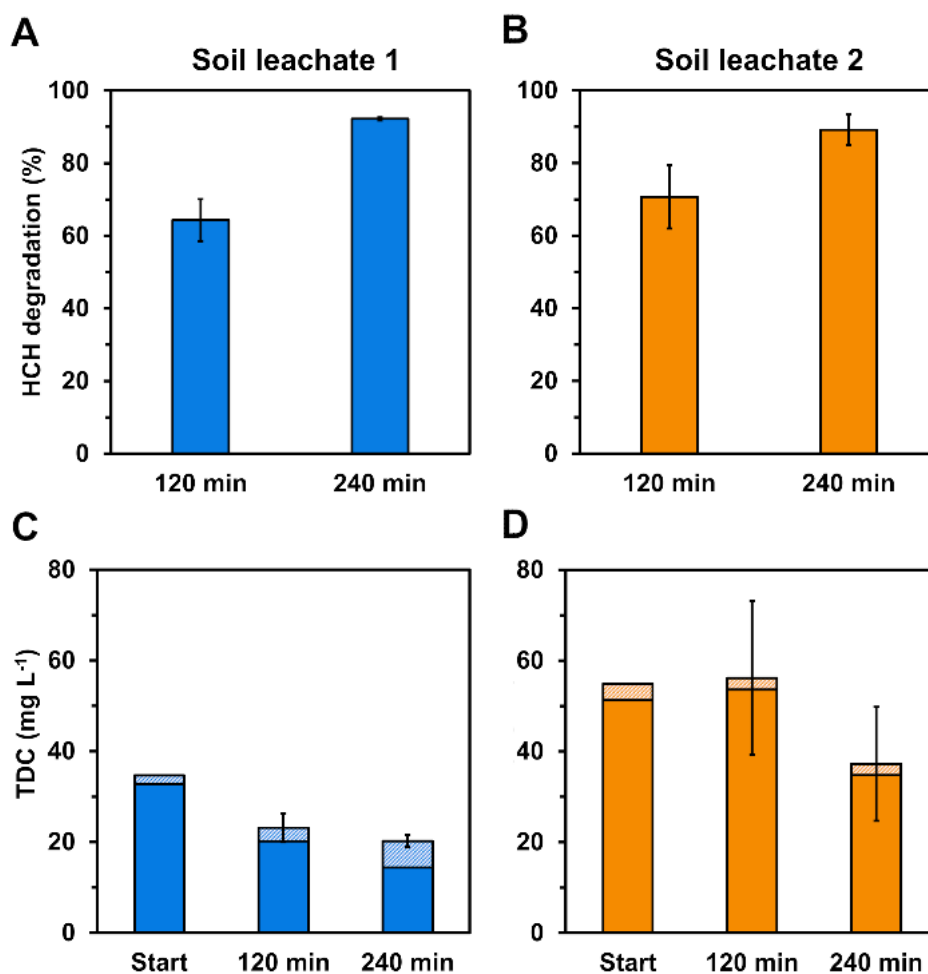


Fig. R19 Electrochemical oxidation of Σ HCH (sum of isomers) in leachate samples (graphs A and B) and corresponding total dissolved carbon (TDC) reduction (graphs C and D). The experimental conditions were $CD = 10 \text{ mA cm}^{-2}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 1 \text{ g L}^{-1}$, and sampled at 2 h and 4 h. In TDC graphs, dark bars represent organic carbon, and light bars indicate inorganic carbon. Error bars show standard deviation, except for initial samples, which were measured only once.

Current efficiency is a key parameter in assessing electrochemical oxidation performance. Therefore, mineralisation current efficiency (MCE; equation 4) or energy consumption per unit TOC mass removed (EC_{TOC} ; equation 5) were evaluated. In Soil leachate 1, the MCE after 2 h (1.9 %) was higher than after 4 h (1.4 %), while the energy consumption increased over time (3.8 vs. 5.1 kWh g^{-1} TOC). In Soil leachate 2, the MCE at 4 h was equal to 1.2 % with energy consumption of 5.7 kWh g^{-1} TOC; no TOC reduction was observed at 2 h. Soil leachate 1 had a lower initial TOC concentration and reached a noticeably higher degradation efficiency. However, the values of MCE and EC_{TOC} were similar in both leachates. In addition, in the Soil leachate 1, the EC_{TOC} increased over time, likely due to the presence of recalcitrant organic compounds. The MCE values were similar to those reported by Dominguez et al. (2018c) using a BDD-carbon felt electrode ($< 1.2 \%$), confirming that stainless steel is also effective for HCH electrooxidation. Electrode cost and resistance to wear are important factors in electrode selection, and porous materials could be more disadvantageous in this regard.

Finally, the effects of electrochemical oxidation on pH, temperature, and electrical conductivity were assessed. The pH of Soil leachate 1 increased from 6.5 to 7.5, and the temperature rose from 19.2 to 33.4 °C after 4 h. Soil leachate 2 showed a slight decrease in pH, from 5.9 to 5.2, while the temperature also increased from 18.2 to 33.4 °C. In both leachates, electrical conductivity remained unchanged.

The observed temperature increases are consistent with those seen in the electrochemical experiment. However, the pH changes in the leachates differed from those observed in the synthetic contaminated solutions. These results suggest that compounds present in the leachates may buffer pH variations, preventing acidification. Furthermore, the mineralisation of organic carbon in Soil leachate 1 may have contributed to the observed alkalinisation.

This study demonstrated that electrochemical oxidation using BDD anode can effectively reduce HCH concentrations in both synthetic water and simulated leachate, achieving removal efficiencies of up to 80% and 90 %, respectively. Current density was identified as the most important factor for enhancing HCH degradation, while higher initial HCH concentrations reduced efficiency and Na₂SO₄ concentration had a limited effect on removal, though it influenced energy consumption. These findings emphasise the need to optimise electrolyte concentration and reaction time to balance treatment performance with energy cost, particularly when scaling up for potential soil remediation applications.

4.5.4 Degradation products

To verify the occurrence of electrochemical oxidation, the obtained SPME-GC-MS chromatograms from different experiments were analysed to identify degradation products of HCH (see Appendix 1). Compound identification was carried out using the NIST V2.0 mass spectral library, along with the electrooxidation pathway proposed by Domínguez et al. [18].

Prior to the application of current, tetra- and pentachlorocyclohexene isomers were tentatively detected. These compounds, reported as initial metabolites in the electrodegradation pathway, were considered degradation products only when increases in their peak areas were observed, indicating formation during treatment.

Chromatograms from low current density treatments were prioritised for intermediate identification, as slower degradation under these conditions promotes the accumulation of intermediates and yields more distinct chromatographic peaks. After 2 h of treatment, results from experiments conducted at high HCH concentration revealed the presence of four tetrachlorocyclohexene isomers and one pentachlorocyclohexene isomer. At low HCH concentrations, three tetrachlorocyclohexene isomers and the same pentachlorocyclohexene isomer were observed.

In the kinetic experiment involving a mixture of HCH isomers, one tetrachlorocyclohexene isomer was detected after 30 min, followed by the appearance of two additional isomers after 1 h. No pentachlorocyclohexene formation was detected. All degradation products were removed by the end of the 4-hour treatment, suggesting their further transformation into more oxidised products or complete mineralisation. These results highlight the importance of treatment

duration, as intermediate accumulation was observed after 2 h of treatment but not after 4 h, suggesting further degradation beyond detectable intermediates. The final products were not identified due to limitations in detecting small molecules such as carboxylic acids or mineralisation products (*e.g.* CO₂, H₂O). Chromatograms are shown in Figure S1.

In the experiments using individual HCH isomers, only α -HCH generated one tetrachlorocyclohexene isomer, which persisted throughout the 4 h treatment and reached its maximum intensity at the end.

Interestingly, treatment of soil leachates under the same electrochemical conditions led to the formation of 1,3,5-trichloro-methoxybenzene after 2 h, which was completely removed by the end of the experiment.

5 CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONS

This thesis addresses key gaps in the environmental monitoring of HCH and in the evaluation of remediation strategies. Through the integration of field research, biosorption experiments, and the evaluation of remediation techniques, the following conclusions are presented:

1. Environmental monitoring in O Porriño confirmed the long-term persistence of HCH, with contamination still evident in the historically affected area PV4, and evidence of transfer through the soil-air-plant system. Oak leaves showed potential for biomonitoring, although temporal variability indicates that their use should be approached cautiously.
2. Biosorption studies demonstrated that the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* retained HCH more effectively than the terrestrial moss *Sphagnum palustre* with molecular and histochemical differences helping to explain this behaviour. This work is pioneering in investigating HCH loading mechanisms in mosses, particularly in the gas phase, and highlights the importance of tissue composition in the selection of species for biomonitoring organic pollutants.
3. Surfactants and surface-active ionic liquids increased the apparent solubility of HCH, demonstrating their potential for remediation processes. Solubility enhancement depended on concentration and structural factors, and the tunability of ionic liquids offers scope for future design; this study provides the first demonstration of their application to HCH solubilisation.
4. Soil amendments influenced physicochemical soil properties and HCH mobility, with retention governed by the amount and type of organic matter. Pine bark biochar at low doses and composts at high doses reduced the risk of HCH leaching most effectively, while all amendments decreased volatilisation when applied at high doses. This shows the need to select suitable amendment types and doses to immobilise HCH in soils.
5. Electrochemical oxidation of HCH proved effective for degrading HCH, with performance driven by current density and initial concentration. The high removal achieved in soil leachates highlights the potential of this technique, while the distinct degradation kinetics of the isomers indicates that isomer composition must be considered when it is applied.

Future research directions

The persistence of HCH in O Porriño highlights the importance of long-term monitoring strategies in historically affected areas and the urgency of taking action at contaminated sites, such as the PV4 area. Transplanted mosses (“moss-bags”), which allow precise, multisite and multipollutant monitoring, should be further explored for the monitoring of organic pollutants, with particular emphasis on understanding uptake mechanisms in devitalised mosses.

Regarding remediation studies, priority should be given to surface-active compounds capable of maximising HCH solubilisation while minimising toxicity and soil adsorption, requiring further soil studies to identify compounds with the lowest environmental impact. Soil amendments show strong potential for immobilising HCH in both soil-water system and soil-air system and merit further investigation for integration into sequential bioremediation projects. For electrochemical oxidation, future work should focus on improving selectivity and reliability by elucidating degradation pathways of individual isomers, assessing the toxicity of transformation products, as well as optimising energy efficiency. The results presented here represent a first step towards scaling up this method for application in soil systems.

6 BIBLIOGRAFÍA

Abhilash, P.C., Jamil, S., Singh, V., Singh, A., Singh, N., Srivastava, S.C., 2008. Occurrence and distribution of hexachlorocyclohexane isomers in vegetation samples from a contaminated area. *Chemosphere* 72, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.056>

Abhilash, P.C., Singh, N., 2009. Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 727–740. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0133-5>

Aboal, J.R., Concha-Graña, E., De Nicola, F., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Giordano, S., Capozzi, F., Di Palma, A., Reski, R., Zechmeister, H., Martínez-Abaigar, J., Fernández, J.A., 2020. Testing a novel biotechnological passive sampler for monitoring atmospheric PAH pollution. *Journal of Hazardous Materials* 381, 120949. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120949>

Addison, R.F., Muir, D.C.G., Ikonomou, M.G., Harwood, L., Smith, T.G., 2009. Hexachlorocyclohexanes (HCH) in ringed seal (*Phoca hispida*) from Ulukhaktok (Holman), NT: Trends from 1978 to 2006. *Science of The Total Environment* 407, 5139–5146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.05.049>

Adithya, S., Jayaraman, R.S., Krishnan, A., Malolan, R., Gopinath, K.P., Arun, J., Kim, W., Govarthanan, M., 2021. A critical review on the formation, fate and degradation of the persistent organic pollutant hexachlorocyclohexane in water systems and waste streams. *Chemosphere* 271, 129866. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129866>

Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology* 34, 4259–4265. <https://doi.org/10.1021/es001069+>

Ali, N., Khan, S., Li, Y., Zheng, N., Yao, H., 2019. Influence of biochars on the accessibility of organochlorine pesticides and microbial community in contaminated soils. *Science of The Total Environment* 647, 551–560. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.425>

Álvarez, A., Rodríguez-Garrido, B., Cerdeira-Pérez, A., Tomé-Pérez, A., Kidd, P., Prieto-Fernández, A., 2022. Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by *Sphingobium* sp. strain D4 in the presence of root exudates or in co-culture with HCH-mobilizing strains. *Journal of Hazardous Materials* 433, 128764. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128764>

Andreas, J., Draxler, J., Marr, R., Lohner, H., 1997. The effect of sodium dodecyl sulfate and M- α -Cyclodextrin on the solubility and partitioning of xylenes in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* 185, 306–312. <https://doi.org/10.1006/jcis.1996.4556>

Ara, T., Nisa, W.-U., Anjum, M., Riaz, L., Saleem, A.R., Hayat, M.T., 2021. Hexachlorocyclohexane toxicity in water bodies of Pakistan: challenges and possible reclamation technologies. *Water Science and Technology* 83, 2345–2362. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.120>

Arán, D., Antelo, J., Fiol, S., Macías, F., 2016. Influence of feedstock on the copper removal capacity of waste-derived biochars. *Bioresource Technology* 212, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.043>

Arán, D., Antelo, J., Lodeiro, P., Macías, F., Fiol, S., 2017. Use of waste-derived biochar to remove copper from aqueous solution in a continuous-flow system. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 56, 12755–12762. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b03056>

Aravind Kumar, J., Krithiga, T., Sathish, S., Renita, A.A., Prabu, D., Lokesh, S., Geetha, R., Namasivayam, S.K.R., Sillanpaa, M., 2022. Persistent organic pollutants in water resources: fate, occurrence, characterization and risk analysis. *Science of The Total Environment* 831, 154808. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154808>

Ares, A., Aboal, J.R., Carballeira, A., Giordano, S., Adamo, P., Fernández, J.A., 2012. Moss bag biomonitoring: A methodological review. *Science of The Total Environment* 432, 143–158. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.087>

Balázs, H.E., Schmid, C.A.O., Cruzeiro, C., Podar, D., Szatmari, P.-M., Buegger, F., Hufnagel, G., Radl, V., Schröder, P., 2021. Post-reclamation microbial diversity and functions in hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soil in relation to spontaneous HCH tolerant vegetation. *Science of The Total Environment* 767, 144653. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144653>

Barriada-Pereira, M., González-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., Fernández-Fernández, E., 2005. Organochlorine pesticides accumulation and degradation products in vegetation samples of a contaminated area in Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 58, 1571–1578. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.016>

Barriuso, E., Andrades, M.-S., Benoit, P., Houot, S., 2011. Pesticide desorption from soils facilitated by dissolved organic matter coming from composts: experimental data and modelling approach. *Biogeochemistry* 106, 117–133. <https://doi.org/10.1007/s10533-010-9481-y>

Barro, R., Ares, S., García-Jares, C., Llompart, M., Cela, R., 2005. A simple and fast micromethod for the analysis of polychlorinated biphenyls in air by sorbent enrichment and ultrasound-assisted solvent extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 255–260. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2869-6>

Barro, R., García-Jares, C., Llompart, M., Herminia Bollain, M., Cela, R., 2006. Rapid and sensitive determination of pyrethroids indoors using active sampling followed by ultrasound-assisted solvent extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1111, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.093>

Barros, D., Fernandes, É., Jesus, M., Barros, L., Alonso-Esteban, J.I., Pires, P., Vaz Velho, M., 2023. The chemical characterisation of the maritime pine bark cultivated in northern Portugal. *Plants* 12, 3940. <https://doi.org/10.3390/plants12233940>

Battisti, S., Boselli, C., Ubaldi, A., Roffi Isabelli, C., Mauti, T., Della Marta, U., Scaramozzino, P., 2017. Measurements of β and α hexachlorocyclohexane in *Juglans regia* and *Prunus spinosa* trees in a contaminated area, central Italy. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 20876–20882. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9680-3>

Becerra-Castro, C., 2012. Role of plant-associated bacteria in the remediation of contaminated soils. Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Becerra-Castro, C., Kidd, P.S., Prieto-Fernández, Á., Weyens, N., Acea, M.-J., Vangronsveld, J., 2011. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. *Plant and Soil* 340, 413–433. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0613-x>

Becerra-Castro, C., Kidd, P.S., Rodríguez-Garrido, B., Monterroso, C., Santos-Ucha, P., Prieto-Fernández, Á., 2013a. Phytoremediation of hexachlorocyclohexane (HCH)-contaminated soils using *Cytisus striatus* and bacterial inoculants in soils with distinct organic matter content. *Environmental Pollution* 178, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.027>

Becerra-Castro, C., Prieto-Fernández, Á., Kidd, P.S., Weyens, N., Rodríguez-Garrido, B., Touceda-González, M., Acea, M.J., Vangronsveld, J., 2013b. Improving performance of *Cytisus striatus* on substrates contaminated with hexachlorocyclohexane (HCH) isomers using bacterial inoculants: developing a phytoremediation strategy. *Plant and Soil* 362, 247–260. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1276-6>

Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J.L., Harris, E., Robinson, B., Sizmur, T., 2011. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Environmental Pollution* 159, 3269–3282. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.023>

Beike, A.K., Spagnuolo, V., Lüth, V., Steinhart, F., Ramos-Gómez, J., Krebs, M., Adamo, P., Rey-Asensio, A.I., Angel Fernández, J., Giordano, S., Decker, E.L., Reski, R., 2015. Clonal in vitro propagation of peat mosses (*Sphagnum L.*) as novel green resources for basic and applied research. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 120, 1037–1049. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0658-2>

Ben-Hur, M., Letey, J., Farmer, W.J., Williams, C.F., Nelson, S.D., 2003. Soluble and solid organic matter effects on atrazine adsorption in cultivated soils. *Soil Science Society of America Journal* 67, 1140–1146. <https://doi.org/10.2136/sssaj2003.1140>

Berek, A.K., Hue, N.V., 2016. Characterization of biochars and their use as an amendment to acid soils. *Soil Science* 181, 412–426. <https://doi.org/10.1097/SS.0000000000000177>

Beyaz, A., Oh, W.S., Reddy, V.P., 2004. Ionic liquids as modulators of the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulfate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 35, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.02.014>

Blesic, M., Canongia Lopes, J.N., Costa Gomes, M.F., Rebelo, L.P.N., 2010. Solubility of alkanes, alkanols and their fluorinated counterparts in tetraalkylphosphonium ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics* 12, 9685–9692.

Boquete, M.T., Aboal, J.R., Carballeira, A., Fernández, J.A., 2017. Do mosses exist outside of Europe? A biomonitoring reflection. *Science of The Total Environment* 593–594, 567–570. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.196>

Borghini, F., Grimalt, J.O., Sanchez-Hernandez, J.C., Bargagli, R., 2005. Organochlorine pollutants in soils and mosses from Victoria Land (Antarctica). *Chemosphere* 58, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.07.025>

Bornemann, L.C., Kookana, R.S., Welp, G., 2007. Differential sorption behaviour of aromatic hydrocarbons on charcoals prepared at different temperatures from grass and wood. *Chemosphere* 67, 1033–1042. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.052>

Bowman, B.T., 1979. Method of repeated additions for generating pesticide adsorption-desorption data. *Canadian Journal of Soil Science* 59, 435–437. <https://doi.org/10.4141/cjss79-050>

Bradley, A.E., Shoenfelt, J.L., Durda, J.L., 2016. Carcinogenicity and mode of action evaluation for alpha-hexachlorocyclohexane: Implications for human health risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 76, 152–173. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.12.007>

Breivik, K., Pacyna, J.M., Münch, J., 1999. Use of α -, β - and γ -hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996. *Science of The Total Environment* 239, 151–163. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00291-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00291-0)

Cabrera, A., Cox, L., Spokas, K., Hermosín, M.C., Cornejo, J., Koskinen, W.C., 2014. Influence of biochar amendments on the sorption–desorption of aminocyclopyrachlor, bentazone and pyraclostrobin pesticides to an agricultural soil. *Science of The Total Environment* 470–471, 438–443. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.080>

Calvelo Pereira, R., 2008. Estudio del comportamiento del hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta para su aplicación en técnicas de fitocorrección. Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Calvelo Pereira, R., Camps-Arbestain, M., Rodríguez Garrido, B., Macías, F., Monterroso, C., 2006. Behaviour of α -, β -, γ -, and δ -hexachlorocyclohexane in the soil–plant system of a contaminated site. *Environmental Pollution* 144, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.030>



Calvelo Pereira, R., Monterroso, C., Macías, F., 2010a. Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: Effect on germination and early growth of different plant species. *Chemosphere* 79, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.01.035>

Calvelo Pereira, R., Monterroso, C., Macías, F., Camps-Arbestain, M., 2008a. Distribution pathways of hexachlorocyclohexane isomers in a soil-plant-air system. A case study with *Cynara scolymus* L. and *Erica* sp. plants grown in a contaminated site. *Environmental Pollution* 155, 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.11.009>

Calvelo Pereira, R., Monterroso Martínez, C.M., Macías, F., 2008b. El hexaclorociclohexano en Galicia: algunos datos sobre producción, uso y contaminación. *EDAFOLÓGIA. Revista de la Sociedad Española de Ciencia del Suelo*. 15, 3–24.

Calvelo Pereira, R., Monterroso Martínez, M.C., Martínez Cortizas, A., Macías, F., 2010b. Analysis of composition, distribution and origin of hexachlorocyclohexane residues in agricultural soils from NW Spain. *Science of The Total Environment* 408, 5583–5591. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.072>

Capozzi, F., Giordano, S., Aboal, J.R., Adamo, P., Bargagli, R., Boquete, T., Di Palma, A., Real, C., Reski, R., Spagnuolo, V., Steinbauer, K., Tretiach, M., Varela, Z., Zechmeister, H., Fernández, J.A., 2016. Best options for the exposure of traditional and innovative moss bags: A systematic evaluation in three European countries. *Environmental Pollution* 214, 362–373. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.043>

Carpio, M.J., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., Marín-Benito, J.M., 2021. Effect of organic residues on pesticide behavior in soils: a review of laboratory research. *Environments* 8, 32. <https://doi.org/10.3390/environments8040032>

Carrieri, V., Fernández, J.Á., Aboal, J.R., Picariello, E., De Nicola, F., 2021. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the devitalized aquatic moss *Fontinalis antipyretica*: From laboratory to field conditions. *Journal of Environmental Quality* 50, 1196–1206. <https://doi.org/10.1002/jeq2.20267>

Chabauty, F., Pot, V., Bourdat-Deschamps, M., Bernet, N., Labat, C., Benoit, P., 2016. Transport of organic contaminants in subsoil horizons and effects of dissolved organic matter related to organic waste recycling practices. *Environ Sci Pollut Res* 23, 6907–6918. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5938-9>

Chaos, Z., Balseiro-Romero, M., Calviño-Vázquez, B., Somoza, A., Soto, A., Monterroso, C., 2024a. Enhancing hexachlorocyclohexane solubility with surfactants and ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids* 399, 124329. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124329>

Chaos, Z., Fernández, J.A., Balseiro-Romero, M., Celeiro, M., García-Jares, C., Méndez, A., Pérez-Alonso, P., Estébanez, B., Kaal, J., Nierop, K.G.J., Aboal, J.R., Monterroso, C., 2024b. What potential do mosses have as biomonitors of POPs? A comparative study of hexachlorocyclohexane sorption. *Science of The Total Environment* 934, 173021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173021>

Chaves Padín, R., 2017. Revisión del uso agrícola de plaguicidas en Galicia y su comportamiento en el suelo (Tesis Doctoral). Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Chaves, R., Monterroso, C., 2023. Agricultural Use of Pesticides in Galicia (NW Spain) During the 20th Century: Inventory of Active Substances and Their Geographic Distribution. *Spanish Journal of Soil Science* 13, 11197. <https://doi.org/10.3389/sjss.2023.11197>

Cheng, N., Ma, X., Sheng, X., Wang, T., Wang, R., Jiao, J., Yu, L., 2014. Aggregation behavior of anionic surface active ionic liquids with double hydrocarbon chains in aqueous solution: Experimental and theoretical investigations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 453, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.083>

Chu, S., Covaci, A., Schepens, P., 2003. Levels and chiral signatures of persistent organochlorine pollutants in human tissues from Belgium. *Environmental Research* 93, 167–176. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00016-1](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00016-1)

Concha-Graña, E., 2004. Desarrollo de métodos de análisis de pesticidas organoclorados en matrices ambientales (Tesis Doctoral). Universidade da Coruña, A Coruña.

Concha-Graña, E., Pereira, M., Turnes Carou, I., González Castro, M.J., Muniategui Lorenzo, S., López Mahía, P., Prada Rodríguez, D., 2008. Metodologías de análisis y caracterización de hexaclorociclohexano en el entorno del Polígono Industrial de Torneiros (Porriño-Pontevedra). *EDAFOLOGÍA. Revista de la Sociedad Española de Ciencia del Suelo*. 15, 169–192.

Consejo de las Comunidades Europeas, 2000. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, DOCE: Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

Consejo de las Comunidades Europeas, 1998. Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 16 de febrero de 1998, relativa a la comercialización de biocidas, DOCE: Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

Consejo de las Comunidades Europeas, 1992. Directiva 92/43/CEE del Consejo de 21 de mayo de 1992 relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres, DOCE: Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

Consejo de las Comunidades Europeas, 1991. Directiva 91/414/CEE del Consejo del 15 de julio de 1991 relativa a la comercialización de productos fitosanitarios, DOCE: Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

Consejo de las Comunidades Europeas, 1978. Directiva 79/117/CEE del Consejo de 21 de diciembre de 1978, relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas, DOCE: Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

Conte, L.O., Cotillas, S., Sánchez-Yepes, A., Lorenzo, D., Santos, A., 2022. LED visible light assisted photochemical oxidation of HCHs in aqueous phases polluted with DNAPL. *Process Safety and Environmental Protection* 168, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.10.015>

Corsolini, S., Covaci, A., Ademollo, N., Focardi, S., Schepens, P., 2006. Occurrence of organochlorine pesticides (OCPs) and their enantiomeric signatures, and concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the Adélie penguin food web, Antarctica. *Environmental Pollution* 140, 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.04.039>

Cousins, I.T., Mackay, D., 2001. Strategies for including vegetation compartments in multimedia models. *Chemosphere* 44, 643–654. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00514-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00514-2)

Crespo González, N., Pan-Montojo González, F., Rega Piñeiro, J., Casas, J.L., 2001. HCH-polluted soils in highly populated areas in “O Porriño” (Galicia, Northwest Spain), in: 6th International HCH and Pesticides Forum Book.

Das, D., Dey, J., Chandra, A.K., Thapa, U., Ismail, K., 2012. Aggregation behavior of sodium dioctylsulfosuccinate in aqueous ethylene glycol medium. A case of hydrogen bonding between surfactant and solvent and its manifestation in the surface tension isotherm. *Langmuir* 28, 15762–15769. <https://doi.org/10.1021/la302876z>

Das, P., Mukherjee, S., Sen, R., 2008. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere* 72, 1229–1234. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.015>

De La Torre, A., Navarro, I., Sanz, P., Arjol, M.A., Fernández, J., Martínez, M.A., 2018. HCH air levels derived from Bailín dumpsite dismantling (Sabiñánigo, Spain). *Science of The Total Environment* 626, 1367–1372. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.178>

De Nicola, F., Claudia, L., MariaVittoria, P., Giulia, M., Anna, A., 2011. Biomonitoring of PAHs by using *Quercus ilex* leaves: Source diagnostic and toxicity assessment. *Atmospheric Environment* 45, 1428–1433. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.12.022>

De Nicola, F., Concha-Graña, E., López Mahía, P., Muniategui Lorenzo, S., Prada Rodríguez, D., Retuerto, R., Carballeira, A., Aboal, J.R., Fernández, J.Á., 2017. Evergreen or deciduous trees for capturing PAHs from ambient air? A case study. *Environmental Pollution* 221, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.074>

Debén, S., Aboal, J.R., Carballeira, A., Cesa, M., Fernández, J.A., 2017. Monitoring river water quality with transplanted bryophytes: A methodological review. *Ecological Indicators* 81, 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.014>

Debén, S., Aboal, J.R., Giráldez, P., Varela, Z., Fernández, J.Á., 2019. Developing a biotechnological tool for monitoring water quality: In vitro clone culture of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. *Water* 11, 145. <https://doi.org/10.3390/w11010145>

Debén, S., Fernández, J.A., Carballeira, A., Aboal, J.R., 2016. Using devitalized moss for active biomonitoring of water pollution. *Environmental Pollution* 210, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.009>

Delle Site, A., 2001. Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 30, 187–439. <https://doi.org/10.1063/1.1347984>

Dewi, T., Erwinda, Ardiwinata, A.N., Hindersah, R., 2024. The role of biochar and compost to mitigate agrochemical contamination impact on agricultural soils. *AIP Conference Proceedings* 2957, 100014.

Diallo, M.S., Abriola, L.M., Weber, W.J., 1994. Solubilization of nonaqueous phase liquid hydrocarbons in micellar solutions of dodecyl alcohol ethoxylates. *Environmental Science & Technology* 28, 1829–1837. <https://doi.org/10.1021/es00060a012>

Domínguez, C.M., Checa-Fernández, A., Romero, A., Santos, A., 2021. Degradation of HCHs by thermally activated persulfate in soil system: Effect of temperature and oxidant concentration. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, 105668. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105668>

Domínguez, C.M., Oturan, N., Romero, A., Santos, A., Oturan, M.A., 2018a. Removal of organochlorine pesticides from lindane production wastes by electrochemical oxidation. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 34985–34994. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1425-4>

Domínguez, C.M., Oturan, N., Romero, A., Santos, A., Oturan, M.A., 2018b. Optimization of electro-Fenton process for effective degradation of organochlorine pesticide lindane. *Catalysis Today* 313, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.10.028>

Domínguez, C.M., Oturan, N., Romero, A., Santos, A., Oturan, M.A., 2018c. Lindane degradation by electrooxidation process: Effect of electrode materials on oxidation and mineralization kinetics. *Water Research* 135, 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.037>

Domínguez, J.R., González, T., Correia, S., 2021. BDD electrochemical oxidation of neonicotinoid pesticides in natural surface waters. Operational, kinetic and energetic aspects. *Journal of Environmental Management* 298, 113538. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113538>

Durante, C.A., Santos-Neto, E.B., Azevedo, A., Crespo, E.A., Lailson-Brito, J., 2016. POPs in the South Latin America: Bioaccumulation of DDT, PCB, HCB, HCH and Mirex in blubber of common dolphin (*Delphinus delphis*) and Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei*) from Argentina. *Science of The Total Environment* 572, 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.176>

Eda, Y., Takisawa, N., Shirahama, K., 1997. Solubilization of isomeric alkanols in ionic micelles. *Langmuir* 13, 2432–2435. <https://doi.org/10.1021/la960856a>

El-Ghenymy, A., Garrido, J.A., Rodríguez, R.M., Cabot, P.L., Centellas, F., Arias, C., Brillas, E., 2013. Degradation of sulfanilamide in acidic medium by anodic oxidation with a boron-doped diamond anode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 689, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.11.013>

El-Shahawi, M.S., Hamza, A., Bashammakh, A.S., Al-Saggaf, W.T., 2010. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta* 80, 1587–1597. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.055>

Estellano, V.H., Pozo, K., Harner, T., Franken, M., Zaballa, M., 2008. Altitudinal and Seasonal Variations of Persistent Organic Pollutants in the Bolivian Andes Mountains. *Environmental Science & Technology* 42, 2528–2534. <https://doi.org/10.1021/es702754m>

Fang, G., Gao, J., Liu, C., Dionysiou, D.D., Wang, Y., Zhou, D., 2014. Key role of persistent free radicals in hydrogen peroxide activation by biochar: Implications to organic contaminant degradation. *Environmental Science & Technology* 48, 1902–1910. <https://doi.org/10.1021/es4048126>

Fang, Y., Nie, Z., Die, Q., Tian, Y., Liu, F., He, J., Huang, Q., 2017. Organochlorine pesticides in soil, air, and vegetation at and around a contaminated site in southwestern China: Concentration, transmission, and risk evaluation. *Chemosphere* 178, 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.151>

Fernández, J., Arjol, M.A., Cacho, C., 2013. POP-contaminated sites from HCH production in Sabinánigo, Spain. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 1937–1950. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1433-8>

Fuscoletti, V., Achene, L., Gismondi, F., Lamarra, D., Lucentini, L., Spina, S., Veschetti, E., Turrio-Baldassarri, L., 2015. Presence of epsilon HCH together with four other HCH isomers in drinking water, groundwater and soil in a former lindane production site. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 95, 108–115. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1516-6>

García-Delgado, C., Delgado-Moreno, L., Toro, M., Puñal, M., Martín-Trueba, M., Eymar, E., Ruíz, A.I., 2023. The role of biochar and green compost amendments in the adsorption, leaching, and degradation of sulfamethoxazole in basic soil. *Chemosphere* 344, 140364. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140364>

García-Delgado, C., Marín-Benito, J.M., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2020. Organic carbon nature determines the capacity of organic amendments to adsorb pesticides in soil. *Journal of Hazardous Materials* 390, 122162. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122162>

García-Jaramillo, M., Cox, L., Cornejo, J., Hermosín, M.C., 2014. Effect of soil organic amendments on the behavior of bentazone and tricyclazole. *Science of The Total Environment* 466–467, 906–913. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.088>

García-Seoane, R., Antelo, J., Fiol, S., Fernández, J.A., Aboal, J.R., 2023. Unravelling the metal uptake process in mosses: Comparison of aquatic and terrestrial species as air pollution biomonitors. *Environmental Pollution* 333, 122069. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122069>

Ghosh, S.K., Khatua, P.K., Bhattacharya, S.Ch., 2003. Aggregation of non ionic surfactant Igepal in aqueous solution: Fluorescence and light scattering studies. *International Journal of Molecular Sciences* 4, 562–571. <https://doi.org/10.3390/i4110562>

González, A.G., Pokrovsky, O.S., 2014. Metal adsorption on mosses: Toward a universal adsorption model. *Journal of Colloid and Interface Science* 415, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.10.028>

González, A.G., Pokrovsky, O.S., Beike, A.K., Reski, R., Di Palma, A., Adamo, P., Giordano, S., Angel Fernandez, J., 2016. Metal and proton adsorption capacities of natural and cloned *Sphagnum* mosses. *Journal of Colloid and Interface Science* 461, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.09.012>

González-Pérez, A., Czapkiewicz, J., Prieto, G., Rodríguez, J.R., 2003. Second critical micelle concentration of dodecyldimethylbenzylammonium chloride in aqueous solution at 25°C. *Colloid & Polymer Science* 281, 1191–1195. <https://doi.org/10.1007/s00396-003-0905-2>

Goo, Y.T., Sa, C.-K., Choi, J.Y., Kim, M.S., Kim, C.H., Kim, H.K., Choi, Y.W., 2021. Development of a solid supersaturable micelle of Revaprazan for improved dissolution and oral bioavailability using Box-Behnken design. *International Journal of Nanomedicine Volume* 16, 1245–1259. <https://doi.org/10.2147/IJN.S298450>

Goss, K.-U., Arp, H.P.H., Bronner, G., Niederer, C., 2008. Partition behavior of hexachlorocyclohexane isomers. *Journal of Chemical & Engineering Data* 53, 750–754. <https://doi.org/10.1021/jc700595y>

Grieco, M., Giorgi, A., Giacobazzo, G., Maggiore, A., Ficchi, S., d'Erme, M., Mosca, L., Mignogna, G., Maras, B., Coccurello, R., 2024. β -Hexachlorocyclohexane triggers neuroinflammatory activity, epigenetic histone post-translational modifications and cognitive dysfunction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 279, 116487. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116487>

Hąc-Wydro, K., Pałasińska, I., Miśkowiec, P., 2016. The comparative studies on the ability of anionic surfactants to bind lead(II) ions. *Journal of Molecular Liquids* 219, 1071–1077. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.02.067>

Hailegnaw, N.S., Mercl, F., Pračke, K., Száková, J., Tlustoš, P., 2019. Mutual relationships of biochar and soil pH, CEC, and exchangeable base cations in a model laboratory experiment. *Journal of Soils and Sediments* 19, 2405–2416. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02264-z>

Hait, S.K., Majhi, P.R., Blume, A., Moulik, S.P., 2003. A critical assessment of micellization of sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS) and its interaction with poly(vinyl

pyrrolidone) and hydrophobically modified polymers, JR 400 and LM 200C. *The Journal of Physical Chemistry B* 107, 3650–3658. <https://doi.org/10.1021/jp027379r>

Halvorsen, H.L., Bohlin-Nizzetto, P., Eckhardt, S., Gusev, A., Moeckel, C., Shatalov, V., Skogeng, L.P., Breivik, K., 2023. Spatial variability and temporal changes of POPs in European background air. *Atmospheric Environment* 299, 119658. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2023.119658>

Han, D., Currell, M.J., 2017. Persistent organic pollutants in China's surface water systems. *Science of The Total Environment* 580, 602–625. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.007>

Hao, Y., Li, Y., Wania, F., Yang, R., Wang, P., Zhang, Q., Jiang, G., 2021. Atmospheric concentrations and temporal trends of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in the Arctic during 2011–2018. *Chemosphere* 267, 128859. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128859>

Harmens, H., Foan, L., Simon, V., Mills, G., 2013. Terrestrial mosses as biomonitors of atmospheric POPs pollution: A review. *Environmental Pollution* 173, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.005>

Hermanson, M.H., Isaksson, E., Hann, R., Ruggirello, R.M., Teixeira, C., Muir, D.C.G., 2021. Historic atmospheric organochlorine pesticide and halogenated industrial compound inputs to glacier ice cores in antarctica and the arctic. *ACS Earth and Space Chemistry* 5, 2534–2543. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.1c00211>

Hernández, M., Fernández, J., Fontecha, G., Gómez, J., 2024. Spatial dynamics of lindane concentration in a soil-plant system at the Bailín landfill site (Sabiñánigo, Huesca, Spain). *Environmental Pollution* 363, 125198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.125198>

Hernández, M., Fernández, J., Fontecha, G., Valladares, Y., Gómez, J., 2025a. Natural attenuation of contamination by hexachlorocyclohexanes in the soils around the Bailín landfill site (Sabiñánigo, Huesca province, NE Spain). *Journal of Hazardous Materials* 490, 137738. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.137738>

Hernández, M., Valladares, Y., López, E., Fernández, J., Gómez, J., 2025b. Dendrochronological and dendrochemical approaches to assess lindane contamination in pine tree rings at the Bailín landfill site (Sabiñánigo, Huesca, Spain). *Science of The Total Environment* 999, 180342. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.180342>

Herraiz-Carboné, M., Santos, A., Checa-Fernández, A., Domínguez, C.M., Cotillas, S., 2024a. Removal of organochlorine pollutants from DNAPL-saturated groundwater using electrolysis with MMO anodes. *Chemical Engineering Journal* 486, 150238. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.150238>

Herraiz-Carboné, M., Santos, A., Hayat, A., Domínguez, C.M., Cotillas, S., 2024b. Remediation of groundwater polluted with lindane production wastes by conductive-diamond

electrochemical oxidation. *Science of The Total Environment* 926, 171848. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171848>

Holoubek, I., Kořínek, P., Šeda, Z., Schneiderová, E., Holoubková, I., Pacl, A., Tříška, J., Cudlín, P., Čáslavský, J., 2000. The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environmental Pollution* 109, 283–292. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00260-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00260-2)

International Agency for Research on Cancer, 1974. *Some Organochlorine Pesticides*, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Lyon.

Isogai, N., Hogarh, J.N., Seike, N., Kobara, Y., Oyediran, F., Wirmvem, M.J., Ayonghe, S.N., Fobil, J., Masunaga, S., 2018. Atmospheric monitoring of organochlorine pesticides across some West African countries. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 31828–31835. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7284-y>

IUSS Working Group WRB, 2015. *Base referencial mundial del recurso suelo 2014, Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. (Informes sobre recursos mundiales de suelos No. 106)*. FAO, Roma.

Jensen, W.A., 1962. *Botanical Histochemistry. Principles and Practice*. Freeman, San Francisco, USA.

Ji, W., Abou Khalil, C., Parameswarappa Jayalakshamma, M., Zhao, L., Boufadel, M.C., 2021. Behavior of surfactants and surfactant blends in soils during remediation: A review. *Environmental Challenges* 2, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2020.100007>

Kaur, I., Gaur, V.K., Regar, R.K., Roy, A., Srivastava, P.K., Gaur, R., Manickam, N., Barik, S.K., 2021. Plants exert beneficial influence on soil microbiome in a HCH contaminated soil revealing advantage of microbe-assisted plant-based HCH remediation of a dumpsite. *Chemosphere* 280, 130690. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130690>

Keyte, I., Wild, E., Dent, J., Jones, K.C., 2009. Investigating the foliar uptake and within-leaf migration of phenanthrene by moss (*Hypnum Cupressiforme*) using two-photon excitation microscopy with autofluorescence. *Environmental Science & Technology* 43, 5755–5761. <https://doi.org/10.1021/es900305c>

Khalid, S., Shahid, M., Murtaza, B., Bibi, I., Natasha, Asif Naeem, M., Niazi, N.K., 2020. A critical review of different factors governing the fate of pesticides in soil under biochar application. *Science of The Total Environment* 711, 134645. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134645>

Kidd, P.S., Prieto-Fernández, A., Monterroso, C., Acea, M.J., 2008. Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil* 302, 233–247. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9475-2>

Klánová, J., Čupr, P., Baráková, D., Šeda, Z., Anděl, P., Holoubek, I., 2009. Can pine needles indicate trends in the air pollution levels at remote sites? *Environmental Pollution* 157, 3248–3254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.030>

Klein, R., Touraud, D., Werner, K., 2008. Choline carboxylate surfactants: biocompatible and highly soluble in water. *Green Chem.* 10, 433–435.

Kolaříková, K., Von Tümpling, W., Bartels, P., 2013. Bioaccumulation of HCH isomers in selected macroinvertebrates from the Elbe River: sources and environmental implications. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 4333–4346. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2872-x>

Kumar, A., Saxena, P., Kisku, G.C., 2024. Recent advancements in environmental biodegradation of organochlorine pesticides: a review. *Environmental Sustainability* 7, 461–476. <https://doi.org/10.1007/s42398-024-00331-x>

Kume, G., Gallotti, M., Nunes, G., 2008. Review on anionic/cationic surfactant mixtures. *Journal of Surfactants and Detergents* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11743-007-1047-1>

Kylin, H., Sjödin, A., 2003. Accumulation of airborne hexachlorocyclohexanes and DDT in pine needles. *Environmental Science & Technology* 37, 2350–2355. <https://doi.org/10.1021/es0201395>

Laha, S., Tansel, B., Ussawarujikulchai, A., 2009. Surfactant–soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: A review. *Journal of Environmental Management* 90, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.08.006>

Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., Kumari, K., Malhotra, S., Pandey, R., Raina, V., Kohler, H.-P.E., Holliger, C., Jackson, C., Oakeshott, J.G., 2010. Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74, 58–80. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00029-09>

Lamichhane, S., Bal Krishna, K.C., Sarukkalige, R., 2017. Surfactant-enhanced remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Journal of Environmental Management* 199, 46–61. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.037>

Lammel, G., Ghim, Y.-S., Grados, A., Gao, H., Hühnerfuss, H., Lohmann, R., 2007. Levels of persistent organic pollutants in air in China and over the Yellow Sea. *Atmospheric Environment* 41, 452–464. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.08.045>

Lan Chun, C., Lee, J.-J., Park, J.-W., 2002. Solubilization of PAH mixtures by three different anionic surfactants. *Environmental Pollution* 118, 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00304-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00304-9)

Leal-Duaso, A., Salvatella, L., Fraile, J.M., 2025. Physical-chemical transformations for the remediation and valorization of hexachlorocyclohexanes (HCHs) including lindane: A review. *Journal of Environmental Management* 375, 124262. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2025.124262>

Lee, M.-H., Han, S.-J., Lee, Y.K., Ike, I.A., Ok, Y.S., Hur, J., 2020. Enhancing copper binding property of compost-derived humic substances by biochar amendment: Further insight from two-dimensional correlation spectroscopy. *Journal of Hazardous Materials* 390, 121128. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121128>

Leermakers, F., Eriksson, J.C., Lyklema, H., 2005. Association colloids and their equilibrium modelling, in: *Fundamentals of Interface and Colloid Science*. Elsevier Academic Press, Amsterdam. [https://doi.org/10.1016/S1874-5679\(13\)60002-1](https://doi.org/10.1016/S1874-5679(13)60002-1)

Li, C., Cheng, Y., Tang, Q., Lin, S., Li, Y., Hu, X., Nian, J., Gu, H., Lu, Y., Tang, H., Dai, S., Zhang, Hongqun, Jin, C., Zhang, Haijing, Jin, Yuanyuan, Jin, Yinlong, 2014. The association between prenatal exposure to organochlorine pesticides and thyroid hormone levels in newborns in Yancheng, China. *Environmental Research* 129, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.12.009>

Li, J., Zhang, G., Guo, L., Xu, W., Li, X., Lee, C.S.L., Ding, A., Wang, T., 2007. Organochlorine pesticides in the atmosphere of Guangzhou and Hong Kong: Regional sources and long-range atmospheric transport. *Atmospheric Environment* 41, 3889–3903. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.12.052>

Li, Y., Lohmann, R., Zou, X., Wang, C., Zhang, L., 2020. Air-water exchange and distribution pattern of organochlorine pesticides in the atmosphere and surface water of the open Pacific ocean. *Environmental Pollution* 265, 114956. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114956>

Li, Y.F., 1999. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *Science of The Total Environment* 232, 121–158. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00114-X)

Lim, T.B., Xu, R., Tan, B., Obbard, J.P., 2006. Persistent organic pollutants in moss as bioindicators of atmospheric pollution in Singapore. *Chemosphere* 64, 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.007>

Liu, X., Bonhomme, J., Merbach, I., Kümmel, S., Richnow, H.H., 2021a. Uptake of α -HCH by wheat from the gas phase and translocation to soil analyzed by a stable carbon isotope labeling experiment. *Chemosphere* 264, 128489. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128489>

Liu, X., Kümmel, S., Trapp, S., Richnow, H.H., 2023. Uptake and transformation of hexachlorocyclohexane isomers (HCHs) in tree growth rings at a contaminated field site. *Environmental Science & Technology* 57, 8776–8784. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c01929>

Liu, X., Peng, P., Fu, J., Huang, W., 2003. Effects of FeS on the Transformation Kinetics of γ -Hexachlorocyclohexane. *Environmental Science & Technology* 37, 1822–1828. <https://doi.org/10.1021/es0259178>

Liu, X., Wu, L., Kümmel, S., Richnow, H.H., 2021b. Characterizing the biotransformation of hexachlorocyclohexanes in wheat using compound-specific stable isotope analysis and

enantiomer fraction analysis. *Journal of Hazardous Materials* 406, 124301. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124301>

Liu, X., Yang, A., Kümmel, S., Richnow, H.H., 2022. Uptake and metabolization of HCH isomers in trees examined over an annual growth period by Compound-Specific Isotope Analysis and Enantiomer Fractionation. *Environmental Science & Technology* 56, 10120–10130. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c02697>

Liu, Y., Wang, F., Wang, Z., Xiang, L., Fu, Y., Zhao, Z., Kengara, F.O., Mei, Z., He, C., Bian, Y., Naidu, R., Jiang, X., 2024. Soil properties and organochlorine compounds co-shape the microbial community structure: A case study of an obsolete site. *Environmental Research* 240, 117589. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117589>

Llompart, M., Celeiro, M., García-Jares, C., Dagnac, T., 2019. Environmental applications of solid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 112, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.020>

López, J., Otero, X.L., Carballeira, A., 1996. Calidad de las aguas y contaminación metálica en el río Louro (SW Galicia) analizada a través de briófitos acuáticos. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)* 6, 83–90.

Łozowicka, B., Kaczyński, P., Wolejko, E., Piekutin, J., Sagitov, A., Toleubayev, K., Isenova, G., Abzeitova, E., 2016. Evaluation of organochlorine pesticide residues in soil and plants from East Europe and Central Asia. *Desalination and Water Treatment* 57, 1310–1321. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.996008>

Łuczak, J., Markiewicz, M., Thöming, J., Hupka, J., Jungnickel, C., 2011. Influence of the Hofmeister anions on self-organization of 1-decyl-3-methylimidazolium chloride in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* 362, 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.06.058>

Lukyanova, O.N., Tsygankov, V.Yu., Boyarova, M.D., Khristoforova, N.K., 2016. Bioaccumulation of HCHs and DDTs in organs of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) from the Sea of Okhotsk and the Bering Sea. *Chemosphere* 157, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.039>

Ma, J., Hung, H., Tian, C., Kallenborn, R., 2011. Revolatilization of persistent organic pollutants in the Arctic induced by climate change. *Nature Climate Change* 1, 255–260. <https://doi.org/10.1038/nclimate1167>

Ma, Y., Yun, X., Ruan, Z., Lu, C., Shi, Y., Qin, Q., Men, Z., Zou, D., Du, X., Xing, B., Xie, Y., 2020. Review of hexachlorocyclohexane (HCH) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) contamination in Chinese soils. *Science of The Total Environment* 749, 141212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141212>

Mackay, D. (Ed.), 2006. *Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals*, 2. ed., rev. ed. ed. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, Fla.

Mandal, A.B., Balachandran, N.U., Ramaswamy, D., 1988. Determination of the critical micelle concentration of surfactants and the partition coefficient of an electrochemical probe by using cyclic voltammetry. *Langmuir* 4, 736–739. <https://doi.org/10.1021/la00081a041>

Manickam, N., Bajaj, A., Saini, H.S., Shanker, R., 2012. Surfactant mediated enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by *Sphingomonas* sp. NM05. *Biodegradation* 23, 673–682. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9543-z>

Maranghi, F., Rescia, M., Macrì, C., Di Consiglio, E., De Angelis, G., Testai, E., Farini, D., De Felici, M., Lorenzetti, S., Mantovani, A., 2007. Lindane may modulate the female reproductive development through the interaction with ER- β : an in vivo–in vitro approach. *Chemico-Biological Interactions* 169, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.04.008>

Marín-Benito, J.M., Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., 2014. Effect of different organic amendments on the dissipation of linuron, diazinon and myclobutanil in an agricultural soil incubated for different time periods. *Science of The Total Environment* 476–477, 611–621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.052>

Masrat, R., Maswal, M., Dar, A.A., 2013. Competitive solubilization of naphthalene and pyrene in various micellar systems. *Journal of Hazardous Materials* 244–245, 662–670. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.057>

Moreira, F.C., Boaventura, R.A.R., Brillas, E., Vilar, V.J.P., 2017. Electrochemical advanced oxidation processes: A review on their application to synthetic and real wastewaters. *Applied Catalysis B: Environmental* 202, 217–261. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.08.037>

Morillo, E., Villaverde, J., 2017. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of The Total Environment* 586, 576–597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.020>

Mrema, E.J., Rubino, F.M., Brambilla, G., Moretto, A., Tsatsakis, A.M., Colosio, C., 2013. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology* 307, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.11.015>

Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology* 60, 371–380. [https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(00\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00117-4)

Muñoz-Morales, M., Braojos, M., Sáez, C., Cañizares, P., Rodrigo, M.A., 2017. Remediation of soils polluted with lindane using surfactant-aided soil washing and electrochemical oxidation. *Journal of Hazardous Materials* 339, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.021>

Nakata, H., Hirakawa, Y., Kawazoe, M., Nakabo, T., Arizono, K., Abe, S.-I., Kitano, T., Shimada, H., Watanabe, I., Li, W., Ding, X., 2005. Concentrations and compositions of organochlorine contaminants in sediments, soils, crustaceans, fishes and birds collected from

Lake Tai, Hangzhou Bay and Shanghai city region, China. *Environmental Pollution* 133, 415–429. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.07.003>

Ni, M., Tian, S., Huang, Q., Yang, Y., 2018. Electrokinetic-Fenton remediation of organochlorine pesticides from historically polluted soil. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 12159–12168. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1479-3>

Ondrasek, G., Zovko, M., Kranjčec, F., Savić, R., Romić, D., Rengel, Z., 2021. Wood biomass fly ash ameliorates acidic, low-nutrient hydromorphic soil & reduces metal accumulation in maize. *Journal of Cleaner Production* 283, 124650. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124650>

Orgiazzi, A., Panagos, P., Fernández-Ugalde, O., Wojda, P., Labouyrie, M., Ballabio, C., Franco, A., Pistocchi, A., Montanarella, L., Jones, A., 2022. LUCAS soil biodiversity and LUCAS soil pesticides, new tools for research and policy development. *European Journal of Soil Science* 73, e13299. <https://doi.org/10.1111/ejss.13299>

Orton, T.G., Saby, N.P.A., Arrouays, D., Jolivet, C.C., Villanneau, E.J., Marchant, B.P., Caria, G., Barriuso, E., Bispo, A., Briand, O., 2013. Spatial distribution of Lindane concentration in topsoil across France. *Science of The Total Environment* 443, 338–350. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.103>

Ouyang, W., Zhao, X., Tysklind, M., Hao, F., 2016. Typical agricultural diffuse herbicide sorption with agricultural waste-derived biochars amended soil of high organic matter content. *Water Research* 92, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.055>

Pacín, C., Martínez-Abaigar, J., Núñez-Olivera, E., Aboal, J.R., De Nicola, F., Fernández, J.Á., 2023. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in PM10 and bulk deposition using Mosspheres: A pilot study in an urban environment. *Environmental Research* 223, 115406. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115406>

Paria, S., 2008. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances in Colloid and Interface Science* 138, 24–58. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.11.001>

Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2019. Reglamento (UE) 2019/1021 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de junio de 2019 sobre contaminantes orgánicos persistentes, DOUE: Diario Oficial de la Unión Europea.

Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2005. Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE, DOUE: Diario Oficial de la Unión Europea.

Patist, A., Oh, S.G., Leung, R., Shah, D.O., 2001. Kinetics of micellization: its significance to technological processes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 176, 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00610-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00610-5)

Payá-Pérez, A., Rodríguez Eugenio, N., 2018. Status of local soil contamination in Europe: revision of the indicator “Progress in the management contaminated sites in Europe,” EUR. Publications Office of the European Union, Luxembourg. <https://doi.org/10.2760/093804>

Pillai, P., Kumar, A., Mandal, A., 2018. Mechanistic studies of enhanced oil recovery by imidazolium-based ionic liquids as novel surfactants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 63, 262–274. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.02.024>

Pointner, M., Kuttner, P., Obrlik, T., Jäger, A., Kahr, H., 2014. Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agronomy Research* 12, 391–396.

Porta, M., Puigdomènech, E., Ballester, F., Selva, J., Ribas-Fitó, N., Llop, S., López, T., 2008. Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: The international experience. *Environment International* 34, 546–561. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.10.004>

Qiu, M., Liu, L., Ling, Q., Cai, Y., Yu, S., Wang, S., Fu, D., Hu, B., Wang, X., 2022. Biochar for the removal of contaminants from soil and water: a review. *Biochar* 4, 19. <https://doi.org/10.1007/s42773-022-00146-1>

Qu, C., Albanese, S., Chen, W., Lima, A., Doherty, A.L., Piccolo, A., Arienzo, M., Qi, S., De Vivo, B., 2016. The status of organochlorine pesticide contamination in the soils of the Campanian Plain, southern Italy, and correlations with soil properties and cancer risk. *Environmental Pollution* 216, 500–511. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.089>

Qu, C., Albanese, S., Li, J., Cicchella, D., Zuzolo, D., Hope, D., Cerino, P., Pizzolante, A., Doherty, A.L., Lima, A., De Vivo, B., 2019. Organochlorine pesticides in the soils from Benevento provincial territory, southern Italy: Spatial distribution, air-soil exchange, and implications for environmental health. *Science of The Total Environment* 674, 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.029>

Quintero Díaz, J.C., 2004. Biorrecuperación de suelos contaminados con hexaclorociclohexano (Tesis Doctoral). Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Quintero, J.C., Lú-Chau, T.A., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, J.M., 2007. Bioremediation of HCH present in soil by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* in a slurry batch bioreactor. *International Biodeterioration & Biodegradation* 60, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.05.005>

Quintero, J.C., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, J.M., 2005a. Anaerobic degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. *Chemosphere* 61, 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.010>

Quintero, J.C., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, J.M., 2005b. Effect of surfactants on the soil desorption of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers and their anaerobic biodegradation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 80, 1005–1015. <https://doi.org/10.1002/jctb.1277>

Quintero, J.C., Moreira, M.T., Lema, J.M., Feijoo, G., 2006. An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry. *Chemosphere* 63, 1005–1013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.08.043>

Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A.S., Srivastav, A.L., Kaushal, J., 2021. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production* 283, 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>

Richardson, J.R., Roy, A., Shalat, S.L., Buckley, B., Winnik, B., Gearing, M., Levey, A.I., Factor, S.A., O'Suilleabhain, P., German, D.C., 2011. β -Hexachlorocyclohexane levels in serum and risk of Parkinson's disease. *NeuroToxicology* 32, 640–645. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.04.002>

Rivas Martínez, S., 1987. Memoria del Mapa de Series de Vegetación de España, Serie técnica nº 1. I.C.O.N.A.

Rodrigo, M.A., Oturan, N., Oturan, M.A., 2014. Electrochemically assisted remediation of pesticides in soils and water: A review. *Chemical Reviews* 114, 8720–8745. <https://doi.org/10.1021/cr500077e>

Rodríguez-Garrido, B., 2009. Movilidad, biodisponibilidad y degradación inducida de isómeros de Hexaclorociclohexano (HCH) en suelos contaminados (Tesis Doctoral). Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Rodríguez-Garrido, B., Balseiro-Romero, M., Kidd, P.S., Monterroso, C., 2020. Effect of plant root exudates on the desorption of hexachlorocyclohexane isomers from contaminated soils. *Chemosphere* 241, 124920. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124920>

Rodríguez-Garrido, B., Camps Arbestain, M., Monterroso, M.C., Macías, F., 2004. Reductive dechlorination of α -, β -, δ -, and γ -hexachlorocyclohexane isomers by hydroxocobalamin in the presence of either dithiothreitol or titanium(III) citrate as reducing agents. *Environmental Science & Technology* 38, 5046–5052. <https://doi.org/10.1021/es030153x>

Rodríguez-Garrido, B., Lú-Chau, T.A., Feijoo, G., Macías, F., Monterroso, M.C., 2010. Reductive dechlorination of α -, β -, δ -, and γ -hexachlorocyclohexane isomers by hydroxocobalamin in the presence of either dithiothreitol or titanium(III) citrate as reducing agents. *Environmental Science & Technology* 44, 7063–7069. <https://doi.org/10.1021/es1012438>

Rombolà, A.G., Torri, C., Vassura, I., Venturini, E., Reggiani, R., Fabbri, D., 2022. Effect of biochar amendment on organic matter and dissolved organic matter composition of agricultural soils from a two-year field experiment. *Science of The Total Environment* 812, 151422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151422>

Rongsayamanont, W., Tongcumpou, C., Phasukarratchai, N., 2020. Diesel-contaminated soil washing by mixed nonionic surfactant emulsion and seed germination test. *Water, Air, & Soil Pollution* 231, 267. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04649-0>

Roy, A., Vajpayee, P., Srivastava, S., Srivastava, P.K., 2023. Revelation of bioremediation approaches for hexachlorocyclohexane degradation in soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 39, 243. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03692-3>

Rubinos, D.A., Villasuso, R., Muniategui, S., Barral, M.T., Díaz-Fierros, F., 2007. Using the landfarming technique to remediate soils contaminated with hexachlorocyclohexane isomers. *Water, Air, and Soil Pollution* 181, 385–399. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9309-5>

Růžičková, P., Klánová, J., Čupr, P., Lammel, G., Holoubek, I., 2008. An assessment of air–soil exchange of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides across central and southern Europe. *Environmental Science & Technology* 42, 179–185. <https://doi.org/10.1021/es071406f>

Sadegh-Zadeh, F., Abd Wahid, S., Jalili, B., 2017. Sorption, degradation and leaching of pesticides in soils amended with organic matter: A review. *Advances in Environmental Technology*. <https://doi.org/10.22104/aet.2017.1740.1100>

Saeedi, M., Li, L.Y., Grace, J.R., 2019. Simultaneous removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals from natural soil by combined non-ionic surfactants and EDTA as extracting reagents: Laboratory column tests. *Journal of Environmental Management* 248, 109258. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.07.029>

Saiz-Rubio, R., Balseiro-Romero, M., Antelo, J., Díez, E., Fiol, S., Macías, F., 2019. Biochar as low-cost sorbent of volatile fuel organic compounds: potential application to water remediation. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 11605–11617. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3798-9>

Salas-Sandoval, E.D.R., Pérez-Segura, T., Garcia-Segura, S., Dos Santos, A.J., 2024. Innovative approaches to electrochemical oxidation of Bisphenol B in synthetic and complex water environments. *Science of The Total Environment* 955, 176762. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176762>

Sales, P.S., De Rossi, R.H., Fernández, M.A., 2011. Different behaviours in the solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in water induced by mixed surfactant solutions. *Chemosphere* 84, 1700–1707. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.073>

Sander, M., Pignatello, J.J., 2005. Characterization of charcoal adsorption sites for aromatic compounds: Insights drawn from single-solute and bi-solute competitive experiments. *Environmental Science & Technology* 39, 1606–1615. <https://doi.org/10.1021/es0491351>

Santos, A., Fernández, J., Rodríguez, S., Domínguez, C.M., Lominchar, M.A., Lorenzo, D., Romero, A., 2018. Abatement of chlorinated compounds in groundwater contaminated by

HCH wastes using ISCO with alkali activated persulfate. *Science of The Total Environment* 615, 1070–1077. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.224>

Semple, K.T., Doick, K.J., Wick, L.Y., Harms, H., 2007. Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environmental Pollution* 150, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.07.023>

Shen, L., Wania, F., 2005. Compilation, evaluation, and selection of physical–chemical property data for organochlorine pesticides. *Journal of Chemical & Engineering Data* 50, 742–768. <https://doi.org/10.1021/je049693f>

Silva, A.C., Rocha, P., Valderrama, P., Antelo, J., Geraldo, D., Proença, M.F., Fiol, S., Bento, F., 2025. A correlation-based approach for predicting humic substance bioactivity from direct compost characterization. *Molecules* 30, 1511. <https://doi.org/10.3390/molecules30071511>

Silva, V., Mol, H.G.J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C.J., Geissen, V., 2019. Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Science of The Total Environment* 653, 1532–1545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>

Silva, V., Montanarella, L., Jones, A., Fernández-Ugalde, O., Mol, H.G.J., Ritsema, C.J., Geissen, V., 2018. Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Science of The Total Environment* 621, 1352–1359. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.093>

Silvani, L., Cornelissen, G., Hale, S.E., 2019. Sorption of α -, β -, γ - and δ -hexachlorocyclohexane isomers to three widely different biochars: Sorption mechanisms and application. *Chemosphere* 219, 1044–1051. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.070>

Singh, H., Northup, B.K., Rice, C.W., Prasad, P.V.V., 2022. Biochar applications influence soil physical and chemical properties, microbial diversity, and crop productivity: a meta-analysis. *Biochar* 4, 8. <https://doi.org/10.1007/s42773-022-00138-1>

Singh, N., Chhillar, N., Banerjee, B., Bala, K., Basu, M., Mustafa, M., 2013. Organochlorine pesticide levels and risk of Alzheimer’s disease in north Indian population. *Human & Experimental Toxicology* 32, 24–30. <https://doi.org/10.1177/0960327112456315>

Singh, S., Rawat, M., Malyan, S.K., Singh, R., Tyagi, V.K., Singh, K., Kashyap, S., Kumar, S., Sharma, M., Panday, B.K., Pandey, R.P., 2023. Global distribution of pesticides in freshwater resources and their remediation approaches. *Environmental Research* 225, 115605. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115605>

Somoza, A., Flor García-Mayoral, M., Soto, A., 2023. A formulation based on a cationic surface-active ionic liquid and an anionic surfactant for enhanced oil recovery at a carbonate reservoir. *Fuel* 346, 128363. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.128363>

Somoza, A., Tafur, N., Arce, A., Soto, A., 2022. Design and performance analysis of a formulation based on SDBS and ionic liquid for EOR in carbonate reservoirs. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 209, 109856. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2021.109856>

Spagnuolo, V., Figlioli, F., De Nicola, F., Capozzi, F., Giordano, S., 2017. Tracking the route of phenanthrene uptake in mosses: An experimental trial. *Science of The Total Environment* 575, 1066–1073. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.174>

Stephenson, B.C., Goldsipe, A., Beers, K.J., Blankschtein, D., 2007. Quantifying the hydrophobic effect. 1. a computer simulation–molecular-thermodynamic model for the self-assembly of hydrophobic and amphiphilic solutes in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry B* 111, 1025–1044. <https://doi.org/10.1021/jp065696i>

Sun, K., Jin, J., Keiluweit, M., Kleber, M., Wang, Z., Pan, Z., Xing, B., 2012. Polar and aliphatic domains regulate sorption of phthalic acid esters (PAEs) to biochars. *Bioresource Technology* 118, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.008>

Szulc, A., Ambrożewicz, D., Sydow, M., Ławniczak, Ł., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R., Chrzanowski, Ł., 2014. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. *Journal of Environmental Management* 132, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.11.006>

Tarcau, D., Cucu-Man, S., Boruvkova, J., Klanova, J., Covaci, A., 2013. Organochlorine pesticides in soil, moss and tree-bark from North-Eastern Romania. *Science of The Total Environment* 456–457, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.103>

Tennouga, L., Mansri, A., Medjahed, K., Chetouani, A., Warad, I., 2015. The micelle formation of cationic and anionic surfactants in aqueous medium: Determination of CMC and thermodynamic parameters at different temperatures. *Journal of Materials and Environmental Science* 6, 2711–2716.

Tokiwa, F., 1968. Solubilization behavior of sodium dodecylpolyoxyethylene sulfates in relation to their polyoxyethylene chain lengths. *The Journal of Physical Chemistry* 72, 1214–1217. <https://doi.org/10.1021/j100850a024>

Tørseth, K., Aas, W., Breivik, K., Fjæraa, A.M., Fiebig, M., Hjellbrekke, A.G., Lund Myhre, C., Solberg, S., Yttri, K.E., 2012. Introduction to the European Monitoring and Evaluation Programme (EMEP) and observed atmospheric composition change during 1972–2009. *Atmospheric Chemistry and Physics* 12, 5447–5481. <https://doi.org/10.5194/acp-12-5447-2012>

Traina, M., 2003. Long-lasting effects of lindane on mouse spermatogenesis induced by in utero exposure. *Reproductive Toxicology* 17, 25–35. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00101-6)

Tripathi, V., Edrisi, S.A., Chaurasia, R., Pandey, K.K., Dinesh, D., Srivastava, R., Srivastava, P., Abhilash, P.C., 2019. Restoring HCHs polluted land as one of the priority

activities during the UN-International Decade on Ecosystem Restoration (2021–2030): A call for global action. *Science of The Total Environment* 689, 1304–1315. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.444>

United Nations Environment Programme, 2009. Report of the conference of the parties of the Stockholm Convention on persistent organic pollutants on the work of its fourth meeting. Geneva.

Uwayezu, J.N., Carabante, I., Lejon, T., Van Hees, P., Karlsson, P., Hollman, P., Kumpiene, J., 2021. Electrochemical degradation of per- and poly-fluoroalkyl substances using boron-doped diamond electrodes. *Journal of Environmental Management* 290, 112573. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112573>

Varela, Z., Boquete, M.T., Fernández, J.A., Martínez-Abaigar, J., Núñez-Olivera, E., Aboal, J.R., 2023. Mythbusters: Unravelling the pollutant uptake processes in mosses for air quality biomonitoring. *Ecological Indicators* 148, 110095. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.110095>

Varela-Castejón, C., Martínez Lozano, F., Blasco Herguedas, O., 2008. Investigación y confinamiento de suelos contaminados por hexaclorociclohexano en el Polígono de Torneiros -O Porriño- (Pontevedra). *EDAFOLOGÍA. Revista de la Sociedad Española de Ciencia del Suelo*. 15, 33–52.

Varela-Castejón, C., Martínez-Lozano, F., 2008. Antecedentes históricos sobre la contaminación por lindano en O Porriño (Pontevedra). *EDAFOLOGÍA. Revista de la Sociedad Española de Ciencia del Suelo*. 15, 25–32.

Vasiljević, J., Simončič, B., Kert, M., 2015. The influence of a surfactant's structure and the mode of its action during reactive wool dyeing. *Tekstilec* 58, 301–313. <https://doi.org/10.14502/Tekstilec2015.58.301-313>

Vega, F.A., Covelo, E.F., Andrade, M.L., 2007. Accidental organochlorine pesticide contamination of soil in Porriño, Spain. *Journal of Environmental Quality* 36, 272–279. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0053>

Vega, M., Romano, D., Uotila, E., 2016. Lindane (persistent organic pollutant) in the EU. European Parliament, Directorate-General for Internal Policies.

Verreault, J., Muir, D.C.G., Norstrom, R.J., Stirling, I., Fisk, A.T., Gabrielsen, G.W., Derocher, A.E., Evans, T.J., Dietz, R., Sonne, C., Sandala, G.M., Gebbink, W., Riget, F.F., Born, E.W., Taylor, M.K., Nagy, J., Letcher, R.J., 2005. Chlorinated hydrocarbon contaminants and metabolites in polar bears (*Ursus maritimus*) from Alaska, Canada, East Greenland, and Svalbard: 1996–2002. *Science of The Total Environment* 351–352, 369–390. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.10.031>

Vieira, D., Franco, A., De Medici, D., Martín Jiménez, J., Wojda, P., Jones, A., 2023. Pesticides residues in European agricultural soils: Results from LUCAS 2018 soil module (Joint

Research Centre Technical Report No. EUR 31586). Publications Office of the European Union, Luxembourg.

Vijgen, J., 2006. The legacy of lindane HCH isomer production: a global overview of residue management, formulation and disposal. International HCH & Pesticides Association (IHPA), The Netherlands.

Vijgen, J., Abhilash, P.C., Li, Y.F., Lal, R., Forter, M., Torres, J., Singh, N., Yunus, M., Tian, C., Schäffer, A., Weber, R., 2011. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environmental Science and Pollution Research* 18, 152–162. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0417-9>

Vijgen, J., De Borst, B., Weber, R., Stobiecki, T., Forter, M., 2019. HCH and lindane contaminated sites: European and global need for a permanent solution for a long-time neglected issue. *Environmental Pollution* 248, 696–705. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.029>

Vijgen, J., Fokke, B., Van De Coterlet, G., Amstaetter, K., Sancho, J., Bensaïah, C., Weber, R., 2022. European cooperation to tackle the legacies of hexachlorocyclohexane (HCH) and lindane. *Emerging Contaminants* 8, 97–112. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2022.01.003>

Wacławek, S., Silvestri, D., Hrabák, P., Padil, V.V.T., Torres-Mendieta, R., Wacławek, M., Černík, M., Dionysiou, D.D., 2019. Chemical oxidation and reduction of hexachlorocyclohexanes: A review. *Water Research* 162, 302–319. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.072>

Walker, K., Vallero, D.A., Lewis, R.G., 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environmental Science & Technology* 33, 4373–4378. <https://doi.org/10.1021/es990647n>

Wang, H., Lin, K., Hou, Z., Richardson, B., Gan, J., 2010. Sorption of the herbicide terbuthylazine in two New Zealand forest soils amended with biosolids and biochars. *Journal of Soils and Sediments* 10, 283–289. <https://doi.org/10.1007/s11368-009-0111-z>

Wang, H., Wang, J., Zhang, S., Xuan, X., 2008. Structural effects of anions and cations on the aggregation behavior of ionic liquids in aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry B* 112, 16682–16689. <https://doi.org/10.1021/jp8069089>

Weber, R., Girones, L., Förstner, U., Tysklind, M., Laner, D., Hollert, H., Forter, M., Vijgen, J., 2025. Review on the need for inventories and management of reservoirs of POPs and other persistent, bioaccumulating and toxic substances (PBTs) in the face of climate change. *Environmental Sciences Europe* 37, 48. <https://doi.org/10.1186/s12302-025-01060-6>

Willett, K.L., Ulrich, E.M., Hites, R.A., 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science & Technology* 32, 2197–2207. <https://doi.org/10.1021/es9708530>



Wöhrnschimmel, H., Scheringer, M., Bogdal, C., Hung, H., Salamova, A., Venier, M., Katsoyiannis, A., Hites, R.A., Hungerbühler, K., Fiedler, H., 2016. Ten years after entry into force of the Stockholm Convention: What do air monitoring data tell about its effectiveness? *Environmental Pollution* 217, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.090>

Wöhrnschimmel, H., Tay, P., von Walvow, H., Hung, H., Yi-Fan, L., MacLeod, M., Hungerbühler, K., 2012. Comparative assessment of the global fate of α - and β -hexachlorocyclohexane before and after phase-out. *Environmental Science & Technology* 46, 2047–2054. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/es203109q>

Wu, L., Liu, Y., Liu, X., Bajaj, A., Sharma, M., Lal, R., Richnow, H.H., 2019. Isotope fractionation approach to characterize the reactive transport processes governing the fate of hexachlorocyclohexanes at a contaminated site in India. *Environment International* 132, 105036. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105036>

Wu, Z., Lin, T., Hu, L., Guo, T., Guo, Z., 2020. Atmospheric legacy organochlorine pesticides and their recent exchange dynamics in the Northwest Pacific Ocean. *Science of The Total Environment* 727, 138408. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138408>

Xiang, L., Harindintwali, J.D., Wang, F., Redmile-Gordon, M., Chang, S.X., Fu, Y., He, C., Muhoza, B., Brahusi, F., Bolan, N., Jiang, X., Ok, Y.S., Rinklebe, J., Schaeffer, A., Zhu, Y., Tiedje, J.M., Xing, B., 2022. Integrating biochar, bacteria, and plants for sustainable remediation of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Science & Technology* 56, 16546–16566. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c02976>

Xiao, H., Li, N., Wania, F., 2004. Compilation, evaluation, and selection of physical-chemical property data for α -, β -, and γ -hexachlorocyclohexane. *Journal of Chemical & Engineering Data* 49, 173–185. <https://doi.org/10.1021/jc034214i>

Xiarchos, I., Doulia, D., 2006. Effect of nonionic surfactants on the solubilization of alachlor. *Journal of Hazardous Materials* 136, 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.01.027>

Xue, H., He, S., Kang, C., Liu, H., Peng, F., Tang, X., 2021. Photochemical degradation of β -hexachlorocyclohexane in snow and ice. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 68244–68250. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15341-z>

Xunta de Galicia, 1999. Decreto 263/1999, de 30 de septiembre, por el que se fija la concentración límite en suelos afectados por vertidos de residuos de HCH., DOG: Diario Oficial de Galicia.

Yadav, I.C., Devi, N.L., Syed, J.H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., Jones, K.C., 2015. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of The Total Environment* 511, 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.041>

Yang, D., Qi, S., Zhang, J., Wu, C., Xing, X., 2013. Organochlorine pesticides in soil, water and sediment along the Jinjiang River mainstream to Quanzhou Bay, southeast China.

Ecotoxicology and Environmental Safety 89, 59–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.014>

Yang, Y., Wang, L., Zhao, H., Yan, F., Li, S., Guo, B., Luo, C., Huang, X., Ji, P., 2023. Utilization of KOH-modified fly ash for elimination from aqueous solutions of potentially toxic metal ions. Environmental Research 223, 115396.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115396>

Yu, Y., Tao, S., Liu, W., Lu, X., Wang, X., Wong, M., 2009. Dietary intake and human milk residues of hexachlorocyclohexane isomers in two chinese cities. Environmental Science & Technology 43, 4830–4835. <https://doi.org/10.1021/es900082v>

Zhang, A., Liu, W., Yuan, H., Zhou, S., Su, Y., Li, Y.-F., 2011. Spatial distribution of hexachlorocyclohexanes in agricultural soils in Zhejiang Province, China, and correlations with elevation and temperature. Environmental Science & Technology 45, 6303–6308.
<https://doi.org/10.1021/es200488n>

Zhang, W., Jiang, S., Qin, T., Sun, J., Dong, C., Hu, Q., 2019. Effect of ionic liquid surfactants on coal oxidation and structure. Journal of Analytical Methods in Chemistry 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/1868265>

Zhang, X., McGrouther, K., He, L., Huang, H., Lu, K., Wang, H., 2016. Biochar for organic contaminant management in soil, in: Biochar: Production, Characterization, and Applications. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, Fla., pp. 140–165.

Zhao, L., Cao, X., Mašek, O., Zimmerman, A., 2013. Heterogeneity of biochar properties as a function of feedstock sources and production temperatures. Journal of Hazardous Materials 256–257, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.04.015>

Zheng, G., Selvam, A., Wong, J.W.C., 2012. Enhanced solubilization and desorption of organochlorine pesticides (OCPs) from soil by oil-swollen micelles formed with a nonionic surfactant. Environmental Science & Technology 46, 12062–12068.
<https://doi.org/10.1021/es302832z>

Zhu, N., Schramm, K.-W., Wang, T., Henkelmann, B., Fu, J., Gao, Y., Wang, Y., Jiang, G., 2015. Lichen, moss and soil in resolving the occurrence of semi-volatile organic compounds on the southeastern Tibetan Plateau, China. Science of The Total Environment 518–519, 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.024>

Zhu, S., Niu, L., Aamir, M., Zhou, Y., Xu, C., Liu, W., 2017. Spatial and seasonal variations in air-soil exchange, enantiomeric signatures and associated health risks of hexachlorocyclohexanes (HCHs) in a megacity Hangzhou in the Yangtze River Delta region, China. Science of The Total Environment 599–600, 264–272.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.181>

7 APÉNDICES

APÉNDICE 1

METODOLOGÍA

MODELO TRACE 1310 GC – TSQ 8000 TRIPLE CUADRUPOLO

En este equipo se utilizó el modo de adquisición por monitorización de reacciones seleccionadas (SRM, *Selected Reaction Monitoring*) para la identificación y cuantificación de los compuestos objetivo. Los detalles se incluyen en la tabla A1.

Tabla A1 Tiempos de retención y transiciones MS/MS para los isómeros de HCH analizados mediante GC-MS/MS (triple cuadrupolo)

Isómero	Tiempo de retención (min)	Transiciones MS/MS Ion precursor → Ion producto (energía de colisión, eV) ¹
α -HCH	7.41	<u>181.0 → 109.0 (25)</u>
		181.0 → 109.0 (30)
		181.0 → 109.0 (35)
β -HCH	7.75	<u>180.9 → 146.0 (15)</u>
		180.9 → 146.0 (20)
γ -HCH	8.30	<u>181.0 → 145.0 (15)</u>
		183.0 → 147.0 (15)
		218.9 → 183.0 (10)
δ -HCH	7.90	<u>180.9 → 146 (20)</u>
		181.0 → 109 (30)
		181.0 → 109 (35)

¹Las transiciones MS/MS subrayadas fueron usadas para cuantificación

EFFECT OF SURFACTANTS AND SAILS ON THE SOLUBILITY OF HCH

La concentración micelar crítica (CMC) de los compuestos con actividad surfactante que no habían sido previamente caracterizados en la literatura fue determinada mediante el método de la placa de Wilhelmy por el grupo EQUIFASE. La tensión superficial de una serie de soluciones del surfactante a distintas concentraciones se midió utilizando un tensiómetro Krüss K11 a 298,15 K. La CMC se obtuvo a partir de la intersección entre la recta de regresión de la región linealmente dependiente y la recta correspondiente al tramo en meseta (Tabla A2 y Fig. A2).

Table A2 Contenido de agua, concentración micelar crítica (CMC) y tensión superficial a la CMC para compuestos surfactantes no caracterizados previamente en la literatura.

Compuesto con actividad surfactante	Contenido de agua (ppm)	CMC (mg L ⁻¹)	Tensión superficial (mN/m)
221PG	3190	31,170	33.73
Tetronic 90R4	89.3	28.96	48.05
[C ₈ C ₁ im][OAc]	77.4	11,153	30.57
Na-Alfoterra	529	25.52	35.27
N ₀₀₀₂ OH-Alfoterra	431	12.15	36.72
Ralufon	302.0	207.65	41.65

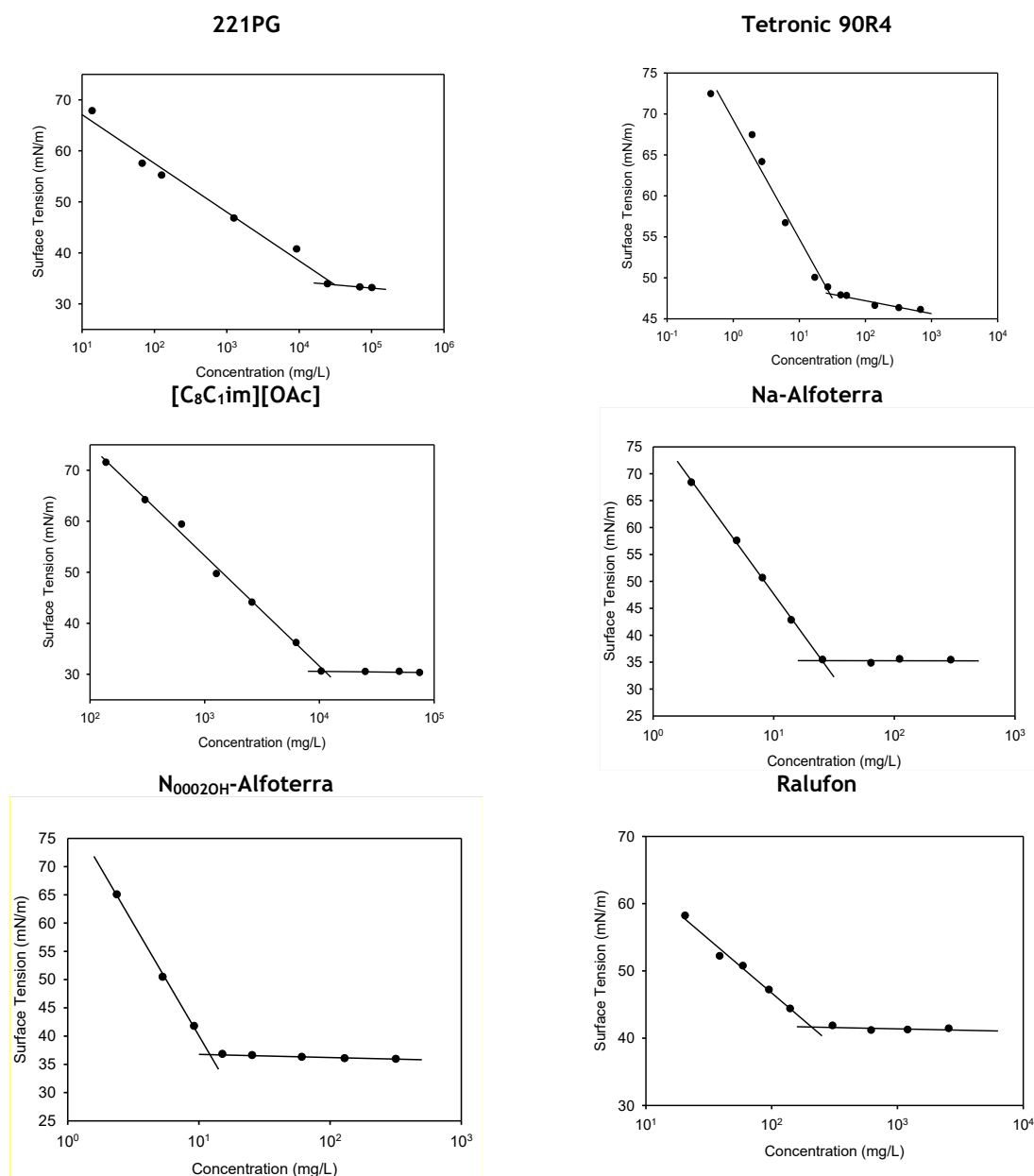


Fig. A1 Determinación de la concentración micellar crítica (CMC) para los compuestos con actividad surfactant incluidos en la Tabla A2.

RESULTADOS

BIOSORPTION OF HCH IN MOSSES

Molecular characterization

The Py-GC-MS chromatogram of *S. palustre* revealed large peaks of polysaccharide products (5-hydroxymethylfurfural, furaldehydes and anhydrosugars) and C₁₆ and C₁₈ saturated and unsaturated fatty acids, including a C_{20:4} polyunsaturated fatty acid tentatively identified as arachidonic acid, which is a valuable compound in bryophytes (Lu et al., 2019). Furthermore,

peaks of phytadienes originate from phytol chains in chlorophyll; 4-isopropenylphenol is the pyrolysis product of sphagnum acid, and a series of other phenols (phenol, 4-methylphenol, 4-vinylphenol) indicate the presence of other phenolic constituents based on the p-hydroxyphenyl structure. In summary, the pyrolyzate is composed of polysaccharides, fatty acids, chlorophyll and phenolic materials. *F. antipyretica* also contained numerous polysaccharide products, albeit with a different distribution. The fatty acid signal was more intense; in addition to C₁₆ and C₁₈ saturated and unsaturated fatty acids, large peaks were observed for acetylenic fatty acids which could not be identified. Plant sterols (*e.g.* sitosterol), tocopherols, nitrogen-containing compounds (from protein and/or alkaloids) and phytadienes (from chlorophyll) were also observed. The phenolic signal was dominated by the unspecific phenol, methylphenol and methoxycatechol.

The THM-GC-MS chromatogram of *S. palustre* included large peaks of fatty acid methyl esters (FAMES), especially in the C₁₆-C₂₆ range, and a series of unidentified polysaccharide products, phytol methyl ether, and the sphagnum acid marker trans 3-(4'-hydroxyphen-1-yl)but-2-enoic acid ME (Abbott et al., 2013). On the other hand, *F. antipyretica* contained C₁₆-C₂₈ FAMES, including the acetylenic FAMES. The more intense chlorophyll signal was confirmed by peaks of phytadiene and phytol. The phenolic signal was dominated by 4-methoxybenzoic acid ME (P6) and 3,4-dimethoxy-hydrocinnamic acid ME (G12), and several short-chain (C₆-C₉) diacid dimethyl esters and benzenecarboxylic acid methyl esters were detected. No cutin products were observed.

Finally, the GC-MS of the TLE of the *S. palustre* sample was composed of plant sterols (*e.g.* sitosterol), phytol fatty acid esters, C₁₆-C₂₆ fatty acids and some low molecular weight carbohydrates. The TLE of *F. antipyretica* contained large amounts of C₁₆-C₂₀ fatty acids and several acetylenic acids (C₁₈-C₂₀), in addition to phytol fatty acid esters and sterols.

Histochemical characterization

In *F. antipyretica*, the staining generally resulted in a dark blue coloration, which was particularly intense in the caulid, and fainter, but clearly observed, in most phyllids, especially in dead cells (Fig. A3-A). In mature phyllids, staining was observed in the walls of both living and dead cells, with a few exceptions (Fig. A3-B(i) and A3-B(ii)). Staining of the cell cytoplasm was occasionally observed, and it was quite irregular, although intense (Fig. A3-B(i), A3-B(ii) and A3-C). By contrast, in young phyllids, in which the cuticle is still undeveloped, the cell walls were not stained, and the dye was only retained in the cytoplasm, apparently in the plastids (Fig. A3-D).

Staining of *S. palustre* generally yielded fainter coloration (Fig. A3-E), particularly in the caulids, which appeared transparent, almost unstained; in general, the dark appearance of some areas is due to surface curvature and not to staining, as in the case of the phyllid margins. The Sudan Black B staining was mainly restricted to the walls of cells with cytoplasm (sometimes dead), in both chlorocysts and as yet undifferentiated cells, being weaker in the latter (Fig. A3-F). Occasionally some isolated cells showed intense staining (cell indicated by an arrow in Fig.

ester, P12=3,4-dimethoxy-hydrocinnamic acid methyl ester) are shown in red. Unidentified carbohydrate products (“carb”) and a methylated C6-metasaccharinic acid (C6MSA) are shown in light blue. Plant sterols are shown in dark blue. Chlorophyll products are shown in green. B1CA-B2CA=benzenecarboxylic acids with 1-2 ester groups are shown in black. C) Total ion current chromatograms after GC-MS of total lipid extracts. Methylated fatty acids (purple), numbered according to chain length and double bonds, are shown in purple. Carbohydrates (“carb”) are shown in light blue. Chlorophyll-derived products are shown in green. Plant sterols are shown in dark blue. ME=methyl ester or ether.

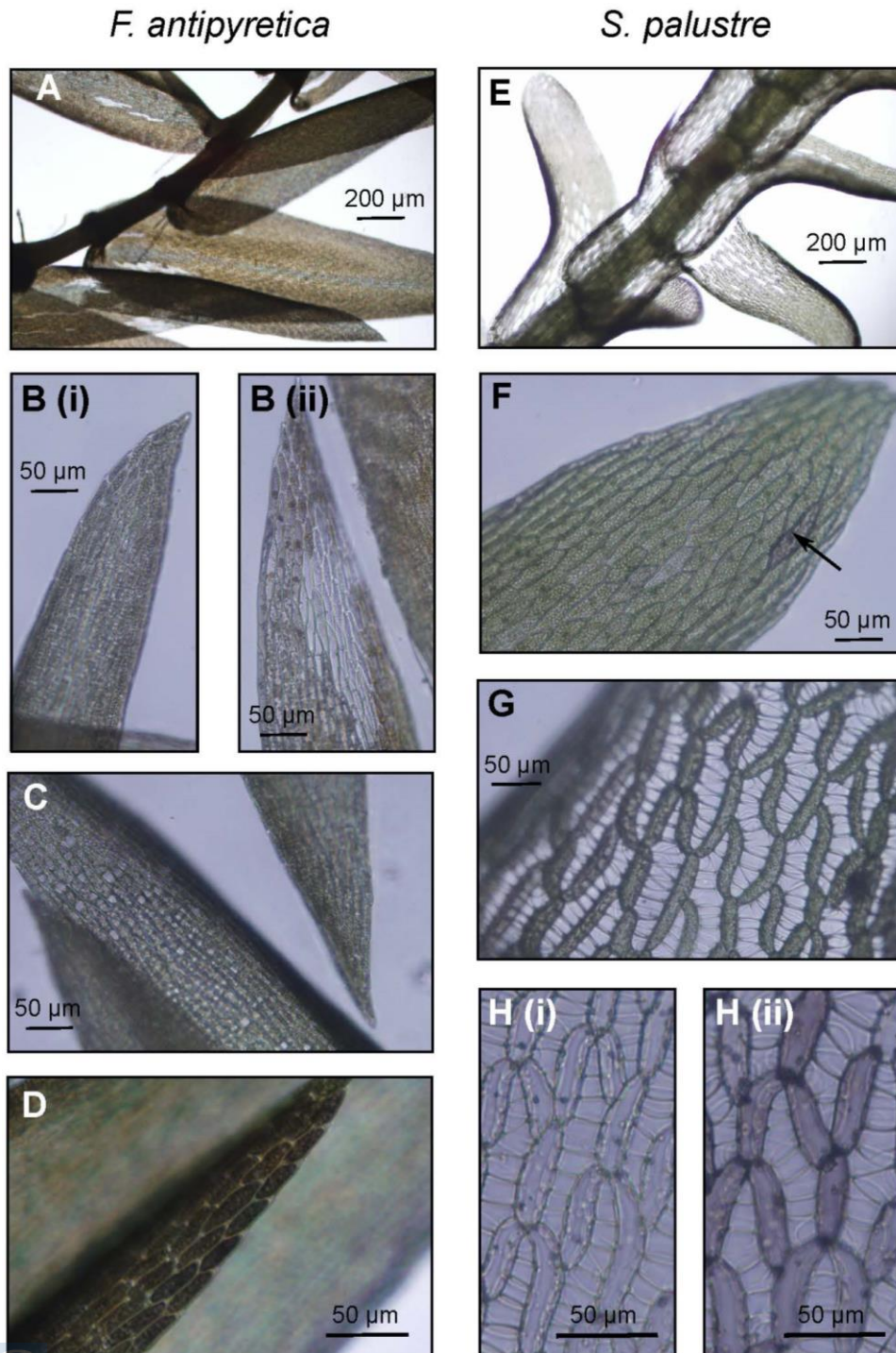


Fig. A3 *Fontinalis antipyretica* (A to D) and *Sphagnum palustre* (E to H) shoots after Sudan Black B staining. A) Heavily stained caulids, and less-intensely stained phyllid cells; dead cells stained more intensely. B(i), B(ii) and

C) stained phyllid cells. D) Young phyllid with undeveloped cuticle showing cells with stained plastids in the cytoplasm. E) Unstained caulids and weakly stained phyllid cells. F) Undifferentiated phyllid cells showing weakly stained cell walls (the arrow indicates a single isolated cell with more intense staining). G) Phyllid with stained chlorocysts and unstained hyalocysts H(i) Weakly stained chlorocysts and unstained hyalocysts. H(ii) occasionally the cell walls showed a thin, stained film.

Liquid phase batch biosorption experiment

Relationship between the $\log K_F / \log K_D$ obtained from the sorption isotherms of individual HCH on the mosses and the $\log K_{OW} /$ isomer volume

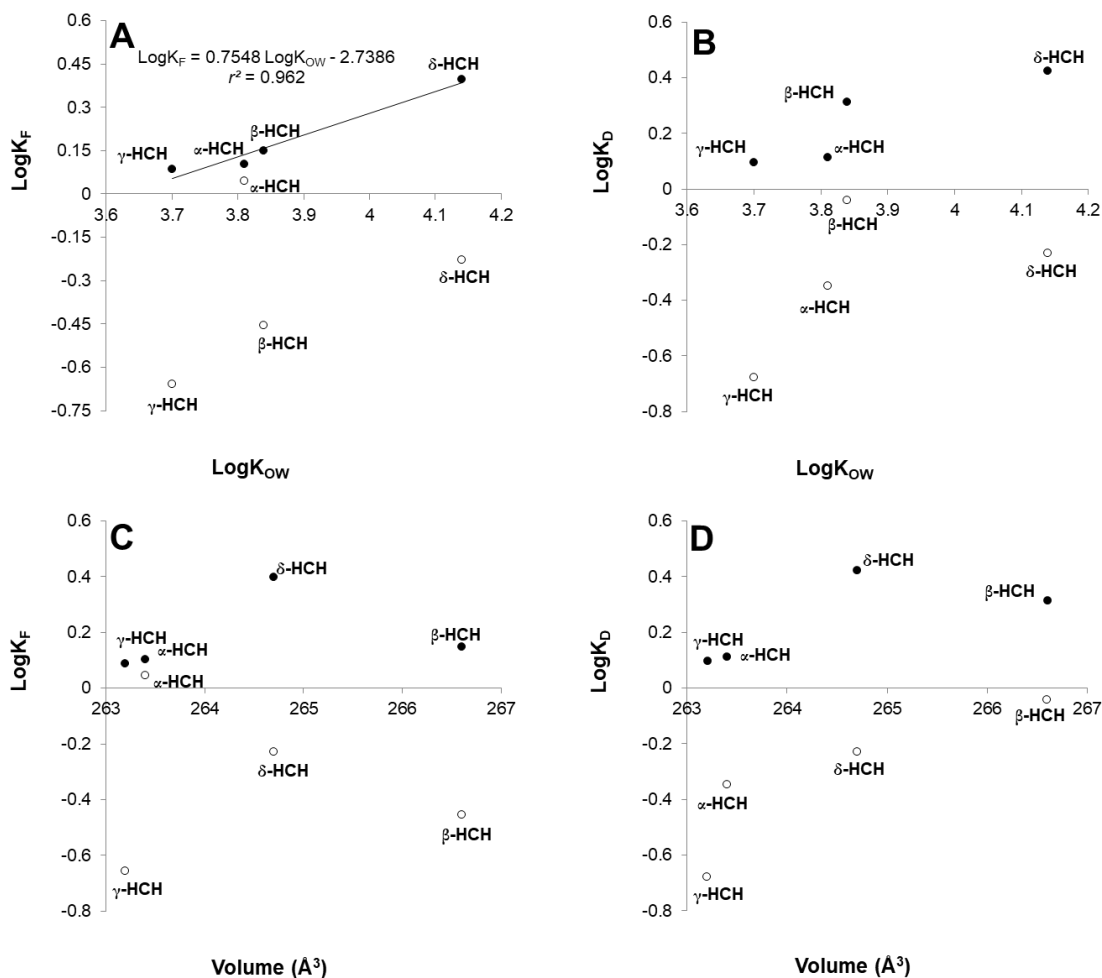


Fig. A4 A) Relationship between the LogK_F and the log K_{OW}; B) Relationship between the log K_D and the log K_{OW}; C) Relationship between the log K_F and the isomer volume; and D) Relationship between the log K_D and the isomer volume. Log K_F and log K_D were obtained from the sorption isotherms of individual HCH on the devitalized clones of mosses *Fontinalis antipyretica* (black dots) and *Sphagnum palustre* (open dots). The Pearson correlation coefficient for these variables is also included when significant results were obtained ($p < 0.05$). For HCH isomers, log K_{OW} were obtained from Wactawek et al. (2019) and the volume from Silvani et al. (2019).

References

Abbott, G.D. Swain, E.Y., Muhammad, A.B., Allton, K., Belyea, L.R., Laing C.G., Cowie G.L. 2013. Effect of water-table fluctuations on the degradation of *Sphagnum* phenols in surficial peats. *Geochim. Cosmochim. Acta* 106:177–191.

Lu, Y., Eiriksson, F.F., Thorsteinsdóttir, M., Simonsen, H.T. 2019. Valuable Fatty Acids in Bryophytes-Production, Biosynthesis, Analysis and Applications. *Plants* 8(11):524.

Silvani, L. Cornelissen, G., Hale, S.E. 2019. Sorption of α -, β -, γ - and δ -hexachlorocyclohexane isomers to three widely different biochars: Sorption mechanisms and application. *Chemosphere* 219: 1044 – 1051.

Wacławek, S., Silvestri, D., Hrabák, P., Padil, V.V.T., Torres-Mendieta, R., Wacławek, M., Černík, M., Dionysiou, D.D. 2019 Chemical oxidation and reduction of hexachlorocyclohexanes: A review. *Water Res.* 162: 302-319.

ELECTROCHEMICAL OXIDATION OF HCH

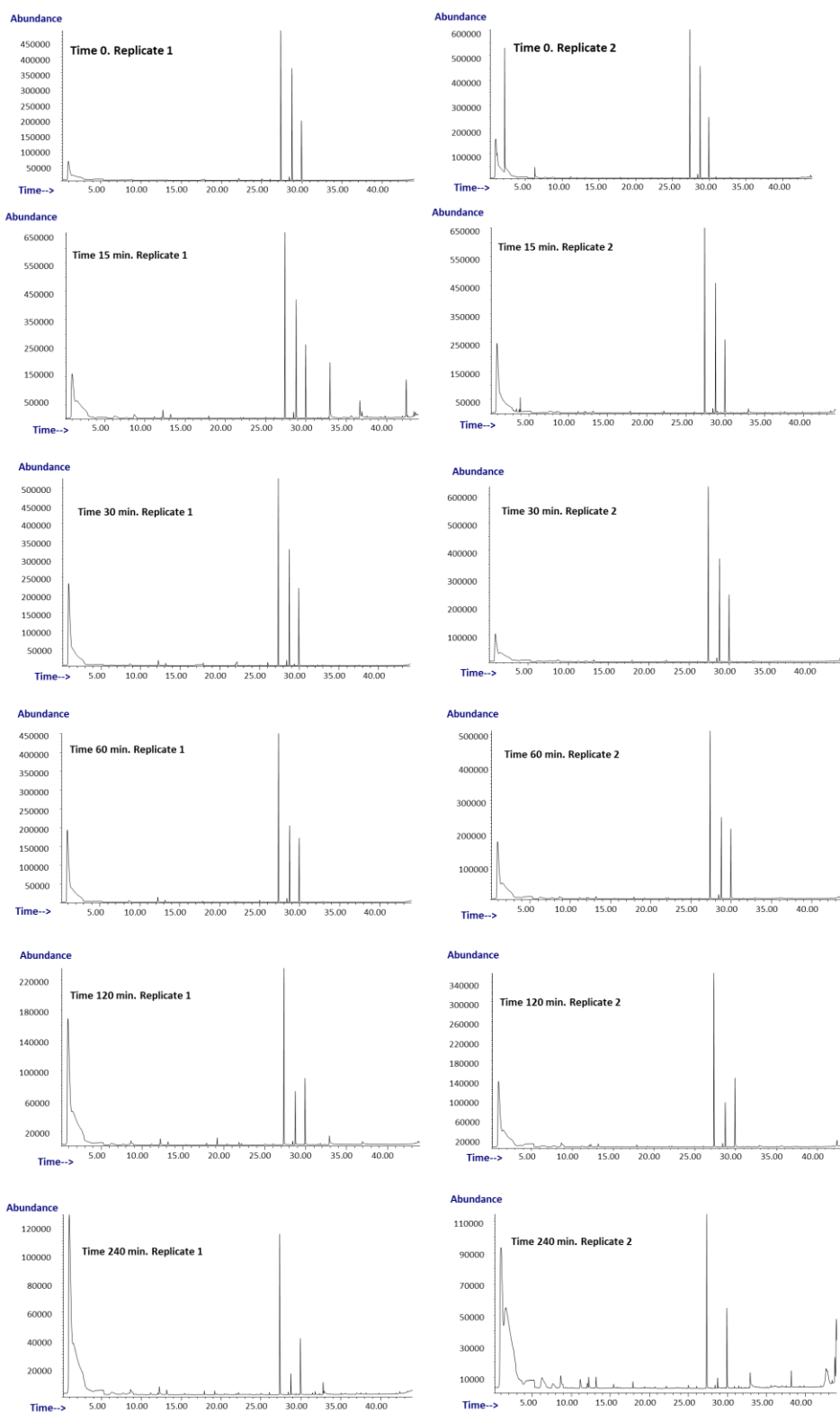


Fig. A5 Chromatograms obtained from the analysis of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers following 4-hour electrochemical oxidation. Samples were collected and analysed at various time intervals during the treatment (0, 15, 30, 60, 120, 240 min).

APÉNDICE 2

Las publicaciones incluidas en la tesis son de acceso abierto (*Open Access*) y están publicadas bajo una licencia CC BY-NC.

La declaración de libre acceso por parte de la editorial correspondiente, Elsevier, puede consultarse en el siguiente enlace oficial: <https://www.elsevier.com/open-access#0-open-access-at-elsevier>



El lindano (γ -hexaclorociclohexano o γ -HCH) fue un pesticida organoclorado ampliamente utilizado durante la segunda mitad del siglo XX. Su producción, altamente ineficiente, generó entre 4,8 y 7,2 millones de toneladas de residuos compuestos por otros isómeros de HCH. Aunque hoy se conocen bien su toxicidad, capacidad de bioacumulación y transporte a larga distancia, durante décadas estos residuos no se gestionaron adecuadamente, lo que desembocó en una contaminación global de suelos que persiste hasta la actualidad. Esta tesis doctoral se centra en la monitorización ambiental del HCH y en la investigación de alternativas para la descontaminación de suelos. En particular, se evaluaron técnicas para modificar la movilidad del HCH en el suelo y su degradación mediante oxidación electroquímica.