



**Departamento de Edafología y Química Agrícola  
Facultad de Biología**

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL  
HEXACLOROCICLOHEXANO EN EL SISTEMA SUELO-PLANTA  
PARA SU APLICACIÓN EN TÉCNICAS DE FITOCORRECCIÓN**

**Fdo. Roberto Calvelo Pereira  
Santiago de Compostela, Mayo 2008**





**Departamento de Edafología y Química Agrícola**  
**Facultad de Biología**

D. Felipe Macías Vázquez, Catedrático de Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Biología y D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> del Carmen Monterroso Martínez, Profesora Titular del Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Biología,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada “ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL HEXACLOROCICLOHEXANO EN EL SISTEMA SUELO-PLANTA PARA SU APLICACIÓN EN TÉCNICAS DE FITOCORRECCIÓN”, que para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas presenta Roberto Calvelo Pereira, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela.

Considerando que representa trabajo de Tesis, se autoriza su presentación ante la Comisión de Doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste, se expide el siguiente certificado,

Santiago de Compostela, a 9 de Mayo de 2008

Fdo.: Dr. D. Felipe Macías Vázquez

Fdo.: Dr. D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> del Carmen Monterroso Martínez



*Camina plácido entre el ruido y la prisa y piensa en la paz que se puede encontrar en el silencio  
(...) Si te comparas con los demás, te volverás vano y amargado, pues siempre habrá personas más  
grandes y más pequeñas que tu (...) escucha a los demás, incluso al torpe e ignorante; también ellos tienen  
su propia historia. (...) Mantén el interés en tu propia carrera por humilde que sea, ella es un verdadero  
tesoro en el fortuito cambiar del tiempo (...) Se sincero contigo mismo (...)*

**Max Ehrmann**, *Desiderata* (1927)



## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar un agradecimiento muy especial a D. Felipe Macías, no solo como tutor, sino también como máximo responsable de mi estancia en este Departamento y de ofrecerme una oportunidad que espero haber correspondido como se merece. Asimismo, deseo agradecer los esfuerzos y tutoría de la Profesora Carmela Monterroso, especialmente en los últimos meses, tan ajetreados.

Por otro lado, sería injusto no reconocer el trabajo la Dr. Marta Camps, siempre dispuesta y siempre sorprendente. Esta memoria no sería posible sin su inestimable ayuda.

Gracias, asimismo, al Departamento de Edafología y Química Agrícola, en su conjunto, profesores, alumnos, colaboradores. Mucha gente en un espacio tan pequeño, muchos años, unos que van y otros que vienen... No he conocido ni tratado con todos por igual, pero siempre tendrán mi respeto, pues pertenecen a una Institución que merece la pena. En especial, debo reconocer la labor de D. Antonio Martínez Cortizas, que en se ha visto involucrado en una parte de esta Tesis casi por accidente; gracias, asimismo, por su paciencia y consejos. Mención particular para la gente del Laboratorio, especialmente las más veteranas, de las que he aprendido muchas cosas. ¿Qué decir de los verdaderos compañeros de fatigas? Cariño y ánimo.

Desde luego, el trabajo en Torneiros-O Porriño ha involucrado a mucha gente durante varios años. Ahora los caminos se han separado, pero el esfuerzo común queda ahí: mi reconocimiento a todos por un trabajo bien hecho. Esta memoria es tan solo una pequeña parte de un gran proyecto.

A todos los amigos de cuyo cariño disfruto, aún sin merecerlo, gracias.



En recuerdo de quien empezó conmigo esta etapa, soportó los peores momentos y ahora no está para disfrutar de lo mejor; su memoria me inspira, como antaño lo hacía su lucha; siempre contigo, coronel

*Al mejor ejemplo en mi vida, mis padres*



# ÍNDICE GENERAL

	<i>Pág.</i>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<i>iii</i>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<i>vii</i>
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> El contexto de la presente memoria	 1
<b>CAPÍTULO 1</b> Introducción General	 7
<b>CAPÍTULO 2</b> Residuos de hexaclorociclohexano en suelos agrícolas de Galicia: composición y distribución	 63
<b>CAPÍTULO 3</b> Comportamiento de $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - y $\delta$ -hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta de una zona contaminada	 93
<b>CAPÍTULO 4</b> Distribución de los isómeros de hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta-aire: estudio de campo	 115
<b>CAPÍTULO 5</b> Evaluación inicial de la toxicidad del hexaclorociclohexano en plantas: crecimiento en disolución nutriente contaminada	 137
<b>CAPÍTULO 6</b> Efecto de un suelo contaminado con hexaclorociclohexano en la germinación y el desarrollo inicial de diferentes especies vegetales	 161
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	189



## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



### EL CONTEXTO DE LA PRESENTE MEMORIA

Los problemas de contaminación de origen orgánico e inorgánico en los distintos ecosistemas (terrestres, marinos, fluviales, etc.) se han incrementado enormemente en las últimas décadas. Se considera prioritario estudiar el comportamiento de estos compuestos en los distintos sistemas, dados los efectos negativos sobre el medio ambiente y sobre la salud humana. Tradicionalmente, este tipo de estudios se enfocaban a investigar cada compartimiento por separado sin tener en cuenta las múltiples relaciones que se establecen entre los mismos. Sin embargo, es necesaria una visión de conjunto para una comprensión global del comportamiento y destino de los contaminantes. La vegetación tiene un papel clave, no sólo como un sumidero de contaminación, sino también como distribuidor de los compuestos en los diferentes ecosistemas (naturales o no). Por otro lado, los suelos agrícolas constituyen un sumidero de pesticidas persistentes, dado que han sufrido durante décadas la aplicación continua y en ocasiones indiscriminada de multitud de productos. La caracterización de la persistencia y distribución de los residuos de estos productos es muy importante a la hora de considerar el riesgo potencial que pueden constituir para el ser humano.

Los diferentes isómeros de hexaclorociclohexano (HCH) son compuestos pesticidas organoclorados que causan contaminación en el medio ambiente debido a su toxicidad y persistencia. Existen distintos isómeros que responden a una única fórmula molecular (1-,2-,3-,4-,5-,6-hexaclorociclohexano), pero que se diferencian en la posición axial-ecuatorial de las moléculas de cloro alrededor del anillo de 6 átomos de carbono. De estos ocho isómeros ( $\alpha$ -, que presenta una pareja de estereoisómeros,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\eta$ -, y  $\theta$ -HCH), tan solo el isómero gamma, también conocido como lindano, presenta actividad biocida. La producción de este insecticida de uso agrícola en la industria de productos fitosanitarios ha sido muy elevada, siendo utilizado en todo el mundo desde la década de 1940. Todos los isómeros de hexaclorociclohexano son productos xenobióticos tóxicos para organismos superiores, habiéndose observado efectos teratogénicos, mutagénicos, carcinogénicos, etc. En los últimos años, el HCH y el lindano han sido considerados como Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs), una categoría especialmente peligrosa sometida a severa legislación internacional<sup>1</sup>.

Hace algunas décadas los compuestos derivados de la fabricación de insecticidas comerciales, considerados como residuos inútiles, eran vertidos sin control de ningún tipo en las cercanías de las zonas de producción, contaminando suelos y aguas subterráneas. Este es el caso de los vertidos de los residuos de la fabricación de lindano (isómero  $\gamma$ -HCH) que se produjeron en terrenos localizados en el Polígono de Torneiros, en O Porriño (Pontevedra). La realización de estos vertidos tuvo lugar entre 1948 y 1954 y es probable que se prolongaran hasta 1964. Con posterioridad tuvo lugar un esparcimiento por todo el terreno de los residuos depositados, sobre todo como consecuencia de diferentes procesos de utilización secundaria de los residuos (aglomerante en caminos y edificios, insecticida de baja eficiencia). A esto también contribuyó el traslado de tierras y allanamiento durante la construcción de autovías, polígonos residenciales, etc., por lo que es imposible conocer con precisión su composición, cantidad, distribución espacial o el grado de transformación que han experimentado por acción de la intemperie y la actividad

---

<sup>1</sup> UNECE, 1998. Protocolo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs). United Nations Economic Commission for Europe. Aarhus. Reglamento 850/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes.

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

biológica de los suelos. Hasta la fecha, hay muy pocos estudios que profundicen en el conocimiento de los mecanismos de reparto de los distintos isómeros de hexaclorociclohexano entre los diferentes compartimentos de un ecosistema, por lo que se considera prioritario determinar el comportamiento de estos isómeros en el sistema suelo-planta-atmósfera previo al diseño definitivo del plan de descontaminación de la zona. En relación con este problema, se estableció un Convenio de Investigación entre la Consellería de Medio Ambiente de la Xunta de Galicia, el CSIC y la Universidad de Santiago de Compostela en el año 2001. Siguiendo las disposiciones de este convenio se desarrollaron varios proyectos de investigación, patrocinados por la Xunta de Galicia<sup>2</sup> y por el Gobierno de España<sup>3</sup>, que constituyen el marco en el cual se ha elaborado el trabajo de campo y laboratorio de la presente Tesis Doctoral.

En los últimos años, la tendencia de las medidas de descontaminación de suelos y aguas ha sido buscar métodos y tecnologías cada vez más limpias y económicamente más viables. Por ello, la investigación ha derivado en la búsqueda de soluciones menos cercanas a la ingeniería y más próximas a los procesos naturales que tienen lugar en los compartimentos del medio ambiente (aguas, sedimentos, suelos, vegetación, animales). En este sentido, la experimentación con plantas ha cobrado gran impulso en las dos últimas décadas. Ciertas especies vegetales son capaces de resistir ante elevadas cargas contaminantes, sobre todo en el caso de los contaminantes orgánicos, sin mostrar efectos nocivos. El estudio de la **fitocorrección** de suelos y aguas contaminados por metales pesados se ha desarrollado mucho en la última década; se considera que la fitocorrección (o fitorrecuperación) consiste en el empleo de la vegetación (autóctona o no, es decir, ya perteneciente al ecosistema afectado o bien introducida por el hombre por sus cualidades óptimas) y microorganismos asociados para llevar a cabo la recuperación *in situ* de suelos y aguas.

Dada la importancia de la vegetación en el reparto de los compuestos orgánicos en el sistema suelo-planta-atmósfera existe la posibilidad de utilizar la técnica de fitoextracción como una de las medidas a considerar para la limpieza de suelos contaminados por compuestos orgánicos. Esta técnica consiste en la acumulación en la parte aérea y/o la parte subterránea de los contaminantes. Tiene la ventaja de que, una vez cosechada la parte aérea, estos tejidos contaminados pueden ser tratados/eliminados *ex situ* y, con ello, reducir paulatinamente la degradación de la zona afectada. Por otro lado, la vegetación se podría utilizar como filtro atmosférico, reduciendo la transferencia de los contaminantes a otras áreas vía atmósfera (fitoestabilización). Asimismo, el estímulo de la actividad microbiana en la rizosfera puede ayudar en la destrucción de los compuestos orgánicos (rizodegradación o fitoestimulación).

Si bien la fitocorrección es una técnica de gran interés, hasta el momento no se ha aplicado en suelos contaminados con los isómeros de HCH. La presente Memoria pretende describir una serie de estudios y experimentos de campo trabajando con muestras de suelo y vegetación recogidas *in situ* en la parcela de estudio que la USC dispone en Torneiros, así como ensayos de laboratorio enfocadas a conocer los procesos que rigen el comportamiento del HCH en el medio. Asimismo, en relación con esto, se han iniciado estudios enfocados al conocimiento de la contaminación difusa ocasionada por el uso agrícola de

---

<sup>2</sup>Evaluación y bioremediación de suelos contaminados por isómeros de HCH en el polígono de Torneiros, Porriño (Pontevedra). 2001-2003. Consellería de Medio Ambiente, Xunta de Galicia.

<sup>3</sup> Bioremediación de suelos y aguas contaminados con lindano y otros isómeros de hexaclorociclohexano. 2002-2005. Ministerio de Ciencia y Tecnología, Gobierno de España.

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

estos compuestos durante décadas. En función de lo anteriormente expuesto, los **objetivos generales** planteados, *a priori*, en esta Tesis Doctoral se pueden resumir del siguiente modo:

- ✓ Evaluar la posibilidad de la presencia de residuos de HCH y lindano en suelos agrícolas de la Comunidad Autónoma de Galicia; cuantificar dichos residuos y evaluar la contaminación.
- ✓ Investigar el comportamiento / movimiento del HCH en el sistema suelo-planta, prestando especial atención a los procesos que ocurren en las interfases aire:planta y agua:planta. Esto facilitaría el conocimiento del potencial de limpieza *in situ* de los suelos contaminados con HCH aplicando técnicas de fitocorrección.
- ✓ Ahondar en el papel de la rizosfera en la limpieza de suelos contaminados por HCH.
- ✓ Seleccionar especies vegetales candidatas para utilizar en técnicas de fitocorrección e investigar los mecanismos a través de los cuales las plantas seleccionadas interactúan con el HCH.

La estructura de la presente Memoria se caracteriza por la división del trabajo en apartados bien definidos, relacionados con cada una de las fases del estudio, que desde un principio se concibieron como CAPÍTULOS, relacionados entre sí pero con una entidad suficiente como para presentarse independientemente. Esta Memoria se podría dividir en tres grandes apartados: (i) Introducción General (CAPÍTULO 1); (ii) experiencias de campo, relacionadas con la presencia de los residuos de HCH (suelos agrícolas y zonas de contaminación antrópica) (CAPÍTULOS 2, 3 y 4); y (iii) ensayos de invernadero, orientados a la selección de especies vegetales susceptibles de ser utilizadas en experiencias de fitocorrección *in situ* (CAPÍTULOS 5 y 6). Las características específicas de cada uno de los seis capítulos son:

El **CAPÍTULO 1** comprende una visión introductoria que revisa conceptos de gran interés en el desarrollo de la Memoria: definición y características del HCH, problema de la contaminación, legislación aplicable; se hace especial hincapié en dos apartados: por un lado, la importancia que tiene la vegetación a la hora de acumular la contaminación de carácter orgánico, y por otro lado, la acción clave que dicha vegetación puede tener a la hora de proceder a la limpieza de un suelo (fitocorrección).

El **CAPÍTULO 2** esta dedicado a la caracterización de la presencia y concentración de los isómeros mayoritarios de hexaclorociclohexano ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -HCH) en los suelos agrícolas de la Comunidad Autónoma de Galicia, en relación con las posibles fuentes de contaminación.

En el **CAPÍTULO 3** se inicia el estudio del comportamiento del hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta en una zona de gran contaminación por vertido de residuos de la fabricación de lindano, prestando especial interés a las interacciones que las raíces establecen con el HCH.

Por su parte, el **CAPÍTULO 4** pretende dilucidar las rutas principales de acumulación del hexaclorociclohexano en el sistema aire-suelo-planta. Para ello se ha diseñado un experimento en campo con dos especies vegetales alóctonas y de características contrastadas.

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

El **CAPÍTULO 5** resume una experiencia de crecimiento en cámara de cultivo, diseñada para caracterizar la toxicidad de los isómeros de hexaclorociclohexano con 13 especies vegetales en condiciones de crecimiento en disolución nutriente contaminada, con vistas a la selección de las plantas más adecuadas para la fitocorrección de suelos. Se considera un ensayo preliminar de la toxicidad causada por el hexaclorociclohexano.

Finalmente, el **CAPÍTULO 6** se orienta a la caracterización de la respuesta de 9 especies vegetales en cuanto a la germinación y desarrollo inicial en condiciones de gran concentración de hexaclorociclohexano en un suelo. Para ello se ha utilizado un ensayo de crecimiento de duración intermedia.

El trabajo forma parte de los Proyectos de Investigación "Evaluación y bioremediación de suelos contaminados por isómeros de HCH en el Polígono Industrial de Torneiros, Porriño (Pontevedra)", convenio firmado entre la Xunta de Galicia y la Universidad de Santiago de Compostela (2001-2003) y "Bioremediación de suelos y aguas contaminados con lindano y otros isómeros de hexaclorociclohexano. II. Factores del sistema suelo-planta" Ministerio de Educación y Ciencia (2002-2005).

# **CAPÍTULO 1**

## **Introducción General**



	<i>Pág.</i>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>1.1. EL HEXACLOROCICLOHEXANO (HCH)</b>	<b>10</b>
1.1.1. Qué es el hexaclorociclohexano	10
1.1.2. Propiedades del hexaclorociclohexano	12
1.1.3. Producción, comercialización y uso del hexaclorociclohexano	14
1.1.4. Toxicidad de los diferentes isómeros de hexaclorociclohexano	17
<b>1.2. COMPORTAMIENTO DEL HEXACLOROCICLOHEXANO EN EL MEDIO</b>	<b>18</b>
1.2.1. Fuentes de contaminación	18
1.2.2. Comportamiento en la atmósfera	20
1.2.3. Comportamiento en las aguas	21
1.2.4. Comportamiento en los suelos	23
1.2.5. Acumulación de HCH en la vegetación	28
1.2.6. Comportamiento en la biota	35
<b>1.3. REGULACIÓN LEGAL DE LOS CONTAMINANTES ORGÁNICOS</b>	<b>36</b>
<b>1.4. TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS POR COMPUESTOS ORGÁNICOS</b>	<b>41</b>
1.4.1. Fitocorrección	42
1.4.2. Mecanismos y procesos vegetales en los que se basa la fitocorrección	44
1.4.3. Aspectos prácticos de la fitocorrección	47
<b>1.5. CONTAMINACIÓN POR HEXACLOROCICLOHEXANO EN GALICIA</b>	<b>48</b>
1.5.1. Producción de HCH técnico y lindano en Galicia	48
1.5.2. El problema de la contaminación en el Polígono Industrial de Torneiros, O Porriño, Pontevedra	50
<b>1.6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>65</b>

## **RESUMEN**

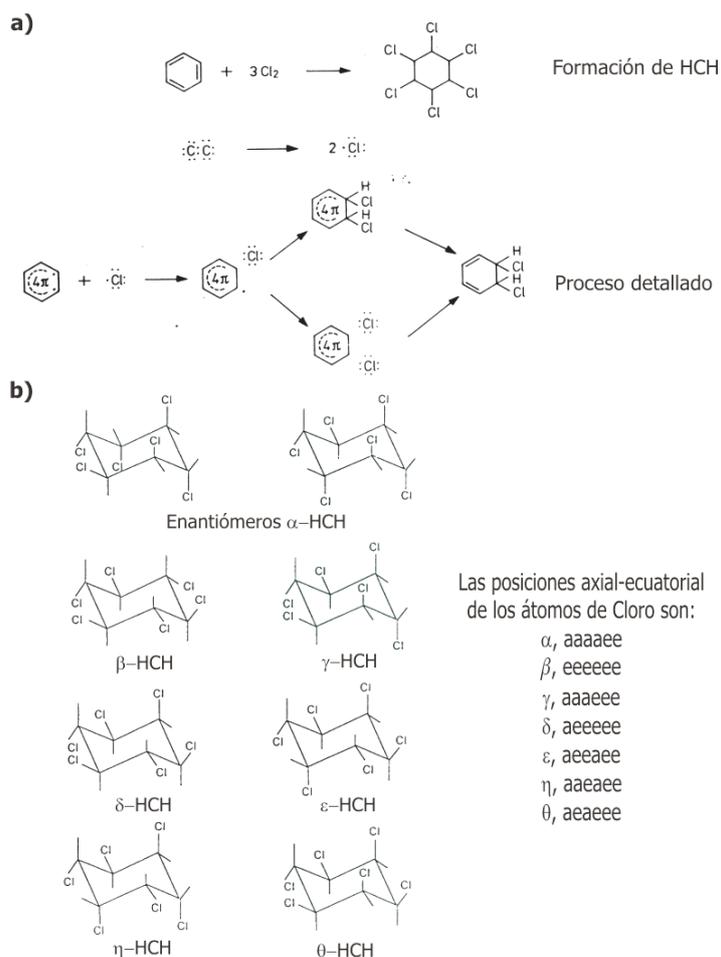
El hexaclorociclohexano (HCH) es un pesticida organoclorado de actividad insecticida muy utilizado en el pasado. Las inestimables cualidades biocidas del isómero  $\gamma$ -HCH, así como un proceso de elaboración relativamente sencillo, han resultado en elevados niveles de producción y utilización agrícola, forestal e incluso doméstica de multitud de formulaciones derivadas. Estas formulaciones se caracterizan por poseer un HCH constituido en esencia por  $\gamma$ -HCH (99%), conocido como lindano. Las propiedades físicoquímicas de los diferentes isómeros son las responsables de que estos compuestos sean persistentes en los diversos ambientes, además de susceptibles de bioacumulación y biomagnificación en las redes tróficas. La toxicidad

del HCH lo convierte en una sustancia peligrosa en última instancia para el ser humano, pudiendo causar la muerte al afectar al sistema nervioso central. El HCH está considerado actualmente como un Compuesto Orgánico Persistente (COP), lo que significa que se rige por una normativa particular, muy restrictiva en cuanto a la producción y utilización. Prácticamente ha desaparecido la aplicación agrícola de estos compuestos, si bien todavía permanecen numerosos lugares de almacenamiento de HCH y lindano. Por otro lado, el proceso de fabricación de lindano ha generado una gran cantidad de residuos (mezclas heterogéneas de los diferentes isómeros de HCH) que durante décadas han sido vertidos sin ningún tipo de control en el medio. Actualmente existen numerosos medios contaminados por HCH y lindano (suelos, sedimentos, aguas continentales y oceánicas, aire, biota). La vegetación acumula elevadas concentraciones de HCH tanto en los tejidos aéreos como en los tejidos subterráneos, por lo que actúa, por un lado, como un indicador para el seguimiento de la contaminación y, por otra parte, como un gran sumidero de HCH y lindano. Asimismo, las propiedades de la vegetación y sus relaciones con la microbiota de los suelos pueden ser utilizadas como una técnica de limpieza de suelos contaminados: fitocorrección. En Galicia, en los últimos años, se ha detectado un grave problema de contaminación por vertido de residuos de HCH en el Polígono Industrial de Torneiros, O Porriño, Pontevedra. Se han realizado estudios de caracterización de la zona y se han ensayado diversas medidas de limpieza, entre las que destaca la fitocorrección.

### **1.1. EL HEXACLOROCICLOHEXANO (HCH)**

#### **1.1.1. Qué es el hexaclorociclohexano**

El hexaclorociclohexano (HCH) es una sustancia artificial sintetizada por primera vez por Faraday, descubridor del benceno, en el siglo XIX, al hacer reaccionar cloro y benceno en presencia de luz (Vijgen, 2006). El resultado inicial de esta reacción es una mezcla heterogénea de diferentes isómeros que responden a una única fórmula molecular (1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-hexaclorociclohexano). Los ocho isómeros principales son el  $\alpha$ -, que presenta una pareja de estereoisómeros,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\eta$ -, y  $\theta$ -HCH (Figura 1.1). En 1936, Bender descubrió las propiedades insecticidas del HCH, obteniendo una patente que, en un principio no despertó gran interés (Matolcsy y col., 1988) (Tabla 1.1). En la década de 1940, el HCH cobró importancia como producto insecticida, tras el impacto que tuvieron los estudios sobre el DDT y su eficacia (Metcalf, 1955; Amadori, 1993). De todos los isómeros de HCH, el responsable de la actividad insecticida es el  $\gamma$ -HCH (Matolcsy y col., 1988). Desde su aislamiento en altas concentraciones, una gran parte del esfuerzo del estudio del HCH ha derivado en el aumento del contenido del isómero gamma en la producción del HCH (Metcalf, 1955).



**Figura 1.1.** a) Formación de HCH: fórmula general y desarrollo de la reacción; b) isómeros de HCH estables y posición de los átomos de cloro.

Tras la cloración del benceno se obtiene un sólido amorfo de color grisáceo-marrón, con un olor característico a humedad, que empieza a fundirse a 65°C. Este producto está constituido por una mezcla de isómeros de HCH y, además, heptaclorociclohexano y octoclorociclohexano, resultado de cloración aditiva de monocloro- y diclorobencenos formados durante la reacción (Metcalf, 1955) (Figura 1.1). El isómero  $\gamma$ -HCH puro, aislado a partir de ésta mezcla, es un sólido cristalino de gran densidad, muy estable a la acción de la luz, el calor o la oxidación. El hexaclorociclohexano es un hidrocarburo clorado monocíclico, siendo su estructura básica una cadena cerrada de seis átomos de carbono ( $C_6H_6Cl_6$ ). La estabilidad térmica de estos compuestos es alta, debido a que están constituidos por enlaces C-C, C-H y C-Cl. Las combinaciones de la orientación espacial de los átomos de cloro e hidrógeno de cada uno de los átomos de carbono son el origen de los isómeros y las diferencias fisicoquímicas entre ellos. Cada átomo de carbono está unido a un hidrógeno y a un átomo de cloro. Uno de estos sustituyentes forma un plano paralelo al "ecuador" de la molécula, por lo que se dice que este átomo está en posición ecuatorial. Si el enlace con el otro átomo es paralelo al "eje" de la molécula, se dice que está en posición axial. Debido al tamaño de los átomos de cloro, los átomos de carbono no son libres para rotar. De ahí que las posiciones de los átomos de cloro e

## CAPÍTULO 1

hidrógeno sean fijas, uno posición ecuatorial y el otro en posición axial (Metcalf, 1955; WHO, 1992). Por otro lado, el ciclohexano como molécula, puede presentar dos configuraciones espaciales, tipo "silla" o tipo "barco"/"bote", siendo la más estable la tipo silla (Metcalf, 1955; Matolcsy y col., 1988). En teoría, hasta 17 isómeros de HCH son posibles, pero debido a incompatibilidades espaciales y a cierta inestabilidad termodinámica, sólo se han detectado ocho isómeros relacionados con la configuración tipo silla (Figura 1.1).

**Tabla 1.1.** Resumen de los acontecimientos relevantes relacionados con la historia del hexaclorociclohexano.

Año	Incidencia
1825	Síntesis del hexaclorociclohexano por Faraday (benceno+cloro+luz)
1912	Van der Linden consigue aislar el isómero $\gamma$ -HCH de la mezcla inicial
1933-36	Investigaciones sobre el potencial insecticida del HCH en Estados Unidos (Bender)
1940-1941	Dupire investiga en detalle la capacidad insecticida del HCH
1942	Se confirma que es el $\gamma$ -HCH el único responsable de la actividad insecticida (Slade)
1943	El isómero gamma es identificado como el "principio activo"; se denomina lindano
1947	Comienzo de la comercialización del HCH; producción orientada a consumo agrícola En general, gran aumento de la producción a gran escala en todo el mundo
Década 1950	Empiezan a evidenciarse impactos negativos de los pesticidas en el ambiente
Década 1960	Alarma por los efectos negativos de algunos pesticidas en la salud humana
Década 1970	Restricciones sobre la producción y el consumo del HCH
1977	La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) comienza a restringir el registro de productos que contienen lindano
1979	Regulación del HCH técnico en Europa
1983	La EPA anuncia la intención de cancelar los productos que contengan lindano
1985	El CIEL (Centre International d'Etudes du Lindane) es el encargado de la coordinación de los estudios sobre lindano que la EPA solicita
1998	Acuerdo de Aarhus sobre Compuestos Orgánicos Persistentes
2000	Convención de Estocolmo sobre Compuestos Orgánicos Persistentes (no considera HCH ni lindano)
2003	Resolución final de la EPA sobre lindano
2004	Reglamento (CE) nº 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre contaminantes orgánicos persistentes (regula específicamente el uso del HCH y el lindano, entre otros compuestos)

### 1.1.2. Propiedades del hexaclorociclohexano

La masa molecular de los isómeros de HCH es de  $290.8 \text{ g mol}^{-1}$  (Tabla 1.2). El punto de ebullición es variable; a presión atmosférica, el punto de fusión es alto, destacando los elevados valores en el caso de  $\beta$ -HCH (309-310°C), mientras que el isómero  $\gamma$ -HCH presenta los valores más bajos (112-113°C). La presión de vapor de saturación (Pa, 20°C) es relativamente alta en el caso del  $\gamma$ -HCH (el isómero más volátil), de un orden similar en  $\alpha$ -, y  $\delta$ -HCH, y dos órdenes de magnitud más baja para el isómero  $\beta$ -HCH.

## Introducción General

El isómero  $\gamma$ -HCH es moderadamente soluble en el agua (en torno a  $6 \text{ mg L}^{-1}$ , dependiendo de los autores),  $\alpha$ -HCH es relativamente soluble (aprox.,  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), mientras que  $\beta$ -HCH es el menos soluble en agua (aprox.,  $0.32 \text{ mg L}^{-1}$ ; Tabla 1.2). En general, la solubilidad de todos los isómeros de HCH aumenta al utilizar un disolvente orgánico. Los isómeros de HCH muestran una gran afinidad tanto por la fase lipídica de los organismos (coeficiente de reparto octanol-agua,  $K_{ow}$ ; valores entre 3.7 y 4.1), como por la materia orgánica (coeficiente de reparto octanol-carbono orgánico,  $K_{oc}$ ; valores entre 3.0-3.8).

**Tabla 1.2.** Principales propiedades físico-químicas de los isómeros de HCH.

Propiedad	Isómero				Referencias
	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	$\delta$ -HCH	
Peso molecular	290.8	290.8	290.8	290.8	Prager, 1995.
Densidad ( $\text{Kg L}^{-1}$ )	1.87	1.89	1.85	- <sup>1</sup>	Prager, 1995.
Punto de ebullición ( $^{\circ}\text{C}$ )	288	60	323	60	Prager, 1995.
Punto de fusión ( $^{\circ}\text{C}$ )	157-160	309-310	112.5	138-139	Suntio y col., 1988.
Presión de vapor (Pa, $20^{\circ}\text{C}$ )	$5.3 \cdot 10^{-3}$	$4.3 \cdot 10^{-5}$	$2.9 \cdot 10^{-3}$	$2.3 \cdot 10^{-3}$	Manz y col., 2001.
Constante de la Ley de Henry ( $\text{Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$ )	0.870	0.120	0.130	0.073	Suntio y col., 1988.
Solubilidad					
En agua ( $\text{mg L}^{-1}$ )	10	5	7.3	10	Prager, 1995.
	1.6	0.32	6.2	9.0	Manz y col., 2001.
En disolventes orgánicos ( $\text{g L}^{-1}$ )					
Acetona	139	103	435	711	Fabre y col., 2005.
Éter	62	18	208	354	Fabre y col., 2005.
Metanol	23	16	74	273	Fabre y col., 2005.
Tolueno	90	21	276	416	Fabre y col., 2005.
Coeficientes de reparto					
Log $K_{ow}$ <sup>2</sup>	3.8	3.78	3.61-3.72	4.14	Prager, 1995.
	3.81	3.80	3.80	4.10	Suntio y col., 1988.
Log $K_{oc}$ <sup>3</sup>	3.0-3.57	3.57	3.57	3.8	U.S. D. H. H. S., 2005.
Log $K_{oa}$ <sup>4</sup>	7.25	8.09	7.88-7.99	8.66	Calculado <sup>4</sup>
Factores de bioconcentración (FBC)					
FBC (tejidos grasos humanos)	20 $\pm$ 8	527 $\pm$ 140	19 $\pm$ 9	8.5	Willet y col., 1998.
FBC (animales acuáticos)	2.6 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.4	- <sup>1</sup>	Willet y col., 1998.

<sup>1</sup> no hay dato; <sup>2</sup> coeficiente de reparto octanol-agua; <sup>3</sup> coeficiente de reparto octanol-carbono orgánico; <sup>4</sup> coeficiente de reparto octanol-aire, calculado a partir de Suntio y col., (1988), Bacci y col., (1990) y Paterson y col., (1991).

Las diferencias en las propiedades físico-químicas entre los isómeros de HCH se relacionan con la **estructura molecular**. El isómero  $\beta$ -HCH, por ejemplo, tiene todos los cloros de la molécula en posiciones ecuatoriales, lo que reduce su volumen molecular, en comparación con el resto (Figura 1.1). Al ser una molécula densa y pequeña se empaqueta muy bien entre los lípidos de origen animal (Willet y col., 1998). Estas características confieren a la molécula una estabilidad física y metabólica muy elevada, lo que influye en su persistencia en el ambiente y en su capacidad de bioconcentración. Por otro lado, el isómero  $\gamma$ -HCH presenta tres átomos de cloro en posición axial, creando con ello lugares en los que el HCl podría ser eliminado por una dehidrohalogenación, convirtiendo a esta molécula en menos estable en los organismos animales, por ejemplo (Willet y col., 1998).

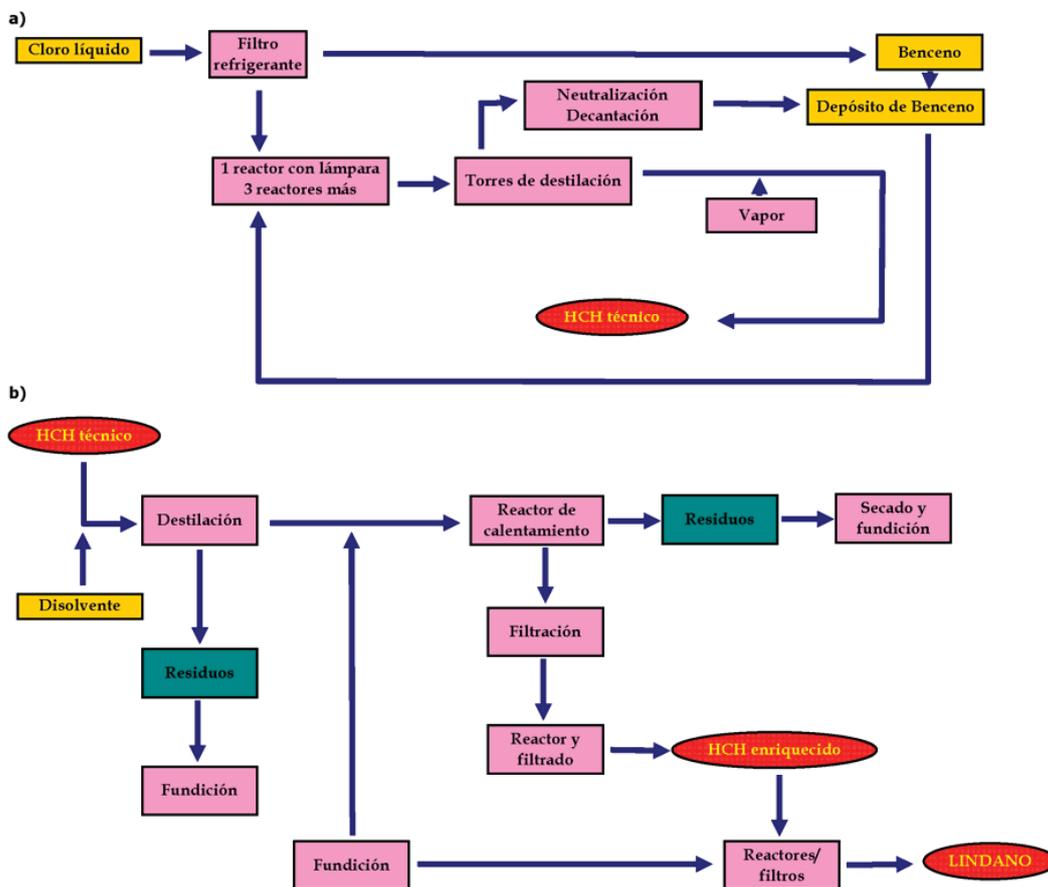
### 1.1.3. Producción, comercialización y uso del hexaclorociclohexano

La elaboración de HCH se inició pronto, en la década de 1940, a la luz de los nuevos descubrimientos en el campo de la industria química (cloración alcalina); a todo esto se sumó un mayor incentivo de la agricultura para obtener biocidas selectivos (Turnbull, 1996). El HCH se introdujo rápidamente y a gran escala en el mercado mundial de productos fitosanitarios/plaguicidas (Vijgen, 2006). A esto contribuyeron numerosos factores, como sus propiedades insecticidas universales, un efecto inicial muy rápido sobre los insectos, y la fácil obtención industrial del producto.

A **nivel industrial** se conocen diversos métodos para la manufactura del HCH. Desde el punto de vista operativo, la reacción directa del benceno con cloro en presencia de luz ultravioleta produce la mezcla de diferentes isómeros de  $C_6H_6Cl_6$  como **HCH** y productos relacionados como clorobenceno (Amadori, 1993). Los radicales libres formado en la ruptura de compuestos inestables (hipoclorito de sodio, tricloruro de boro, peróxidos orgánicos, por ejemplo) pueden servir como activadores químicos. La luz ultravioleta utilizada en el proceso fotocatalítico y dichos activadores desplazan la reacción de un proceso de sustitución a una adición, al aportar la energía necesaria para la homólisis de la molécula de cloro. El átomo de cloro que se forma afecta al sexteto de electrones de la molécula de benceno y se crea un orbital común (Figura 1.1). Esto produce un radical libre de clorofenilo, que o bien colisiona con otro átomo de cloro o bien inicia una cadena de reacciones de homólisis de otras moléculas de cloro (Matolcsy y col., 1988). Al formarse el diclorociclohexadieno, el proceso de cloración aditiva continúa siguiendo las reacciones descritas, pero a una velocidad mayor, ya que dicha molécula es activada de un modo más fácil que el benceno (a nivel del sexteto de electrones). En la práctica, el cloro se disuelve primero en benceno, para luego pasar ésta disolución por un tubo de iluminación (con alto contenido de radiación ultravioleta), en donde la verdadera reacción tiene lugar (Figura 1.2). Éste es un proceso exotérmico y debe mantenerse un control de la temperatura. Dado que el benceno se utiliza como disolvente y reactivo, el proceso finaliza cuando la cantidad suficiente de cloro ha reaccionado. Asimismo hay que evitar que la mezcla no entre en contacto con materiales susceptibles de impedir la sustitución, como es el caso del hierro (Vijgen, 2006). Posteriormente se retira el disolvente en exceso y se obtiene un producto más o menos solidificado, mezcla de los diferentes isómeros – **HCH técnico** – de composición variable (55-80% de  $\alpha$ -HCH, 5-14% de  $\beta$ -HCH, 8-15% de  $\gamma$ -HCH, 2-16%  $\delta$ -HCH y 1-5% del resto de isómeros; Breivik y col., 1999).

El HCH técnico se puede purificar para concentrar el isómero gamma. La mezcla de HCH técnico, caliente, se refrigera, lo que conlleva que parte de los isómeros inactivos (sobre todo  $\alpha$ -HCH) cristalicen. Estos cristales se retiran posteriormente, así como el exceso de benceno. El producto resultante es HCH fundido con un contenido medio de 40% del isómero gamma (**HCH enriquecido**, también denominado **BHC refinado** en Estados Unidos; Figura 1.2). El siguiente paso es seguir purificando la mezcla para obtener el principio activo en mayor concentración. Esto se consigue a través de una cristalización fraccionada, en función de la diferente solubilidad de los isómeros, usando metanol a 15-25° C y filtrando el residuo no disuelto. El metanol, enriquecido en  $\gamma$ -HCH, se destila a 80-100° C. Tras un proceso de enfriamiento, se obtienen cristales del isómero gamma. El proceso se repite varias veces, reciclando constantemente los líquidos, lo que conduce a la obtención de un sólido constituido casi exclusivamente por  $\gamma$ -HCH (**lindano**; pureza mínima, 99% de isómero gamma; WHO, 1991). La producción de lindano provoca la existencia de, al menos, un 80% del material residual (no efectivo) compuesto por una mezcla

heterogénea de isómeros de HCH, más o menos contaminados con disolventes (Amadori, 1993; Galván López, 1998; Vijgen, 2006).

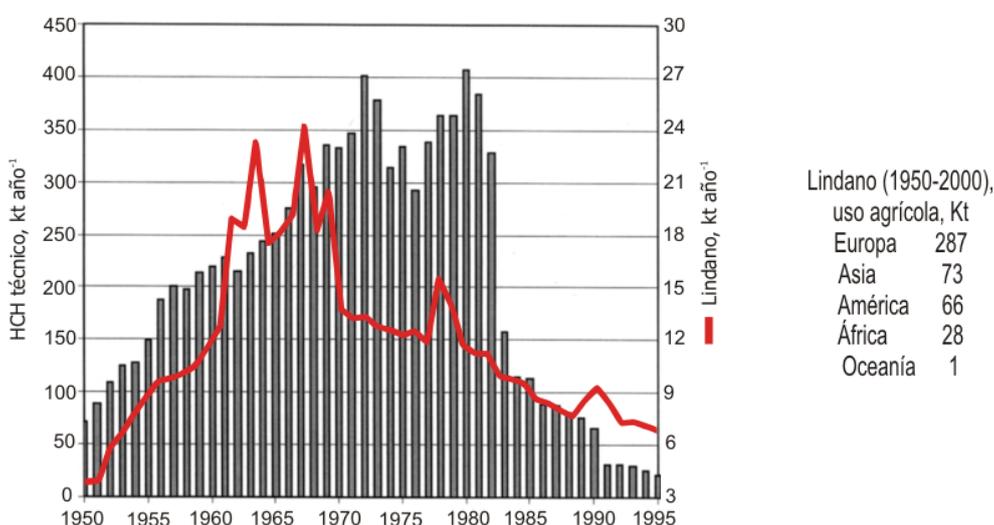


**Figura 1.2.** Esquema de la producción industrial de HCH técnico, HCH enriquecido y lindano.

El lindano puede presentarse en distintas **formulaciones** comerciales (líquidas, sólidas, gaseosas) cuyos ingredientes adicionales actúan como agentes humectantes, surfactantes, etc., que ayudan en la actividad insecticida (Galván López, 1998). El producto comercial puede presentarse de modos muy diferentes: polvo humedecido (hasta un 90% del ingrediente activo); concentrados en emulsión (hasta un 20% de ingrediente activo); suspensiones en agua; disoluciones en disolventes orgánicos (hasta un 50% del ingrediente activo); en polvo (0,5-2% del ingrediente activo); cebos ya preparados para utilizar; aerosoles; formulaciones especialmente preparadas para su uso en humanos o medicina veterinaria (WHO, 1991). El lindano disuelto en compuestos orgánicos se ha utilizado en invernaderos o atomizado en zonas abiertas; dichas disoluciones son adecuadas para aplicación aérea (5-10 litros ha<sup>-1</sup> de formulaciones conteniendo hasta 5-10% de ingrediente activo). Se han vendido formulaciones listas para la fumigación en el interior de las casas, incluyendo tiras, tabletas y generadores de humo. Estos productos se caracterizaban por contener lindano casi puro, además de una pequeña cantidad de material de unión. A

causa de su versatilidad solía utilizarse mezclado con otros insecticidas y fungicidas (WHO, 1991; WHO, 1992).

Li y Breivik y colaboradores ofrecen cifras respecto a la producción global del **HCH técnico** (Li, 1999; Breivik y col., 1999). En el período 1948 a 1997 se utilizaron a nivel mundial hasta 9.8 millones de toneladas, con varios picos de intensidad (Figura 1.3). La curva de producción fue creciente durante el período 1955-1972. No obstante, a partir de 1973 (año en el comenzaron las prohibiciones de su utilización en Japón; Li, 1999), hay un descenso notable tras el que la producción se recupera. Finalmente, a partir del año 1983 (prohibición en China; Li, 1999) el descenso es permanente hasta niveles muy bajos en 1995. La mayor producción histórica corresponde a China e India, países con gran peso de la agricultura (WHO, 1992). No obstante, regiones industriales como América del Norte, Europa y los territorios de la antigua Unión Soviética han sido zonas de gran producción de HCH técnico (Breivik y col., 1999). En el continente africano y parte de América del Sur (excluyendo Brasil), lugares tradicionalmente sin producción, el uso continuado de estos productos ha derivado en niveles de contaminación apreciables.



**Figura 1.3.** Comparación de las tendencias de uso de HCH técnico y lindano entre 1950 y 1995. Modificado de Li, 1999, y Li y Vijgen, 2006.

Respecto al **lindano**, las cifras indican un consumo global de 455 Kiloneladas (Kt) con destino agrícola, con picos anuales no mayores de 24 Kt, es decir, hasta 10 veces inferior a la producción de HCH técnico (Li y Vijgen, 2006). Los mayores niveles de producción de este tipo de compuestos se produjeron entre 1961-1964, y luego en el período 1966-1972, coincidiendo con la prohibición del HCH técnico en algunas regiones. Hay un segundo pico de producción de importancia, entre 1979-1982, debido a la prohibición en Estados Unidos del HCH técnico. A partir de este momento la curva de producción desciende paulatinamente, lo que se corresponde con la época de regulación generalizada de este tipo de compuestos. Hay que destacar que esta estimación concede una gran importancia a la producción en Europa (>60% del total; Figura 1.3). Asimismo, se incluye el lindano de consumo agrícola, por lo que, para una aproximación más veraz, se debería considerar el lindano de uso en ganadería, tratamientos forestales, salud humana, uso doméstico, etc., lo que podría aumentar la estimación hasta las 600 kt.

### 1.1.4. Toxicidad de los diferentes isómeros de hexaclorociclohexano

El  $\gamma$ -HCH es un insecticida de amplio espectro que actúa por contacto e ingestión. (Busvine, 1946; Metcalf, 1955;). En los **insectos**, sus efectos se manifiestan como temblores, ataxia (descoordinación de los movimientos musculares), espasmos y parálisis que, finalmente, detiene la respiración. El HCH tomado por el insecto se traslada inicialmente hacia la hemolinfa y posteriormente a los tejidos nerviosos (Matolcsy y col., 1988). Si se utiliza como spray o polvo, el efecto del lindano (99%  $\gamma$ -HCH), dada su gran volatilidad es casi inmediato, de corta duración, por lo que suele combinarse con otros pesticidas de larga duración (DDT, por ejemplo) para que se complementen. De hecho, al incorporarse al suelo, actúa no solo por contacto directo con los insectos, sino que además ocupa el aire entre las partículas del suelo.

Los diferentes isómeros de HCH han sido detectados sistemáticamente en tejidos humanos, indicando que existe un riesgo para la **salud** (Willet y col., 1998). La información de la toxicidad del HCH se relaciona con estudios de exposición en seres humanos o bien ensayos con animales; mucha información se deriva de individuos afectados durante el procesos de producción del HCH o su uso, así como de la utilización de productos domésticos o ingestión de HCH (U. S. D. H. H. S., 2005). Las principales rutas de exposición son tres: inhalación (vapores contaminados con HCH); oral (ingestión de alimentos contaminados; ingestión accidental o intencionada de productos conteniendo HCH); dérmica (incorporación a través de la piel por deposición de partículas contaminadas, sorción de vapores). La **toxicidad aguda** detectada en seres humanos tras un accidente se manifiesta por diarreas fuertes y convulsiones que en última instancia pueden conducir a la muerte. La **toxicidad crónica** detectada en obreros en las fábricas de producción, agricultores, etc., puede manifestarse a través de problemas relacionados con el sueño y empeoramiento del estrés, así como vómitos frecuentes y sensibilización general.

Se considera que tanto el lindano como el HCH técnico presentan **efectos neurológicos**, tanto en animales como en el ser humano. En los seres humanos, estos efectos se manifiestan como pérdida de sensibilidad facial y en las extremidades, dolor de cabeza, vértigo, patrón anormal del electrocardiograma, convulsiones y ataques. En animales, el  $\gamma$ -HCH y el  $\beta$ -HCH ocasionan desordenes del comportamiento, cambios neuroquímicos, convulsiones, ataques, coma. El modo de actuación es diferente en función del isómero; en el caso de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH, se presentan violentas convulsiones epilépticas, mientras que  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH manifiestan efectos depresivos sobre el sistema nervioso central. De modo muy resumido, se puede decir que se alteran propiedades electrofisiológicas y enzimáticas de las membranas plasmáticas de las células nerviosas, afectando a la cinética de intercambio de iones a través de membrana (U. S. D. H. H. S., 2005). Se han descrito **efectos hepáticos**, como un incremento en las enzimas o el citocromo P-450, aumento de la actividad de los microsomas, del peso del hígado, necrosis de los tejidos, degeneración de las grasas, cáncer de hígado. Los efectos más graves se han detectado en animales. Con respecto al **sistema inmunológico**, hay un aumento significativo de la inmunoglobulina M en los seres humanos. En animales, existe inmunodepresión y reducción de los folículos linfoides, con un descenso de la población de linfocitos y del tamaño de los cordones medulares, así como necrosis en zonas de la médula. Respecto al **sistema reproductor**, la información relativa a los seres humanos es limitada, pero se ha detectado un aumento en niveles hormonales (hormona luteinizante) en trabajadores; asimismo, se encontraron altos niveles de  $\gamma$ -HCH y HCH total en mujeres con abortos o partos prematuros. En animales, diferentes estudios

han detectado descenso en el recuento de espermatozoides, atrofia de ovarios, aumento del ciclo estrogénico y descenso de la tasa de ovulación (U. S. D. H. H. S., 2005).

Por otro lado, existen evidencias de **carcinogenicidad** en animales, aunque los datos son poco concluyentes. La agencia norteamericana EPA clasifica tanto al isómero  $\alpha$ -HCH como al HCH técnico como carcinógenos B2 (carcinógeno humano probable), el  $\beta$ -HCH como C (carcinógeno humano posible) y el isómero  $\delta$ -HCH como carcinógeno D (no clasificado); el isómero  $\gamma$ -HCH se considera B2/C, es decir, existen evidencias que sugieren su carcinogenicidad pero no es suficiente como para establecer el potencial cancerígeno (Willlet y col., 1998). Se sabe que el HCH es capaz de cruzar los tejidos de la placenta animal, con los consecuentes **efectos teratogénicos**, aunque no existe evidencia de toxicidad durante el desarrollo de embriones humanos. Por su parte, el HCH de grado técnico produce mutaciones letales en ratones. No obstante, las propiedades cancerígenas del HCH están en constante discusión. Estas no aparecen sistemáticamente, aunque diferentes estudios tienden a evidenciar que tanto  $\alpha$ -HCH como  $\beta$ -HCH, tienen influencia en la aparición de algunos cánceres, aunque es difícil establecer si es a causa del contacto directo con estos compuestos (Fabre y col., 2005).

Desde el principio de la investigación relacionada con el HCH y sus diferentes isómeros, se ha constatado que es un compuesto con al menos una moderada **toxicidad** para las **plantas**, describiéndose efectos negativos en la germinación, crecimiento y desarrollo inicial de diferentes especies (Kostoff, 1948; Salazar y Paulsen, 1971; Bidlan y col., 2004). Generalmente es el isómero  $\gamma$ -HCH (con diferencia, el más estudiado) el que manifiesta estos efectos, muy variables.

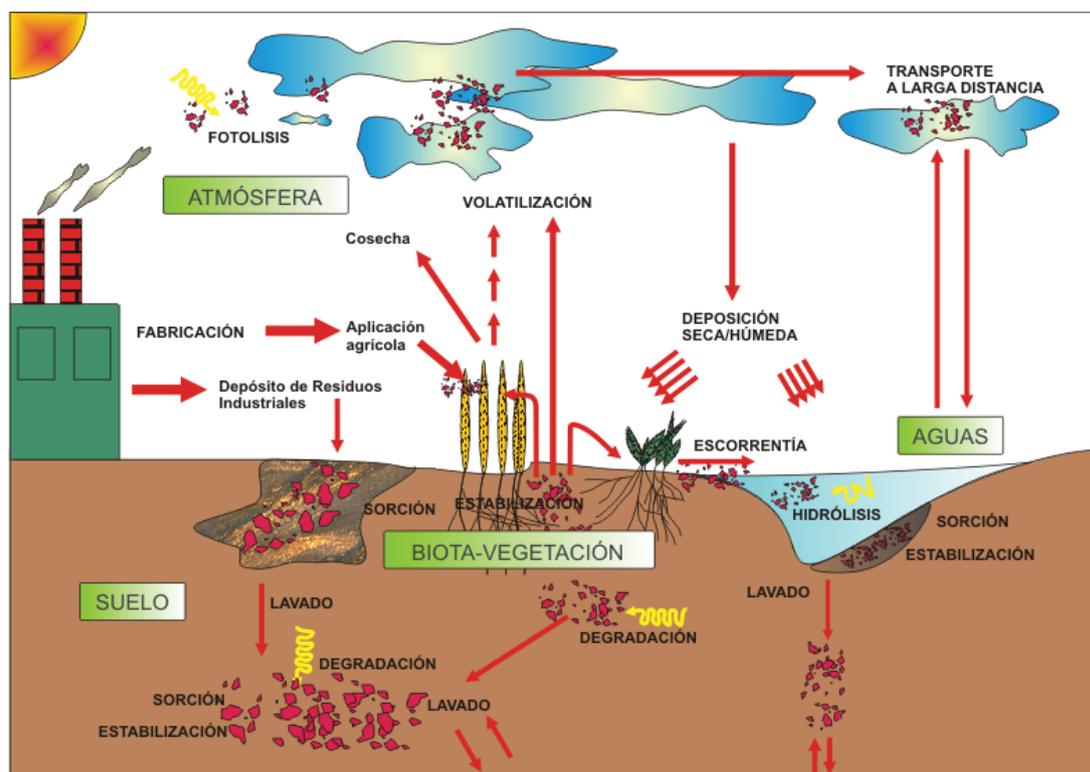
### 1.2. COMPORTAMIENTO DEL HEXACLOROCICLOHEXANO EN EL MEDIO

#### 1.2.1. Fuentes de contaminación

Tanto el HCH técnico como el lindano, a través de multitud de productos comerciales, se han utilizado en los **suelos agrícolas** durante prácticamente cinco décadas en todo el mundo. En el caso de que los niveles de concentración encontrados en los suelos agrícolas fuesen apreciables, la superficie potencialmente contaminada puede ser muy importante. Estas sustancias han sido aplicadas en la agricultura para combatir diferentes plagas, pero tan solo una pequeña parte de las sustancias aportadas al terreno ejerce su acción (dependiendo del modo de aplicación y de las condiciones ambientales; Cheng, 1990). Adicionalmente, los **residuos** de la producción industrial de HCH técnico y lindano se consideraban inofensivos e insolubles en el agua, por lo que su vertido no necesitaba autorización previa. Estos residuos, en función del método de almacenamiento, podrían sufrir dispersión en el medio a causa del viento, infiltración hacia la capa freática, lavado con las aguas de escorrentía y manipulaciones antrópicas. Por ejemplo, las propiedades adherentes de estos residuos favorecieron su uso frecuente como materiales de construcción (Amadori, 1993; Eptisa, 1999). Otros problemas pueden derivar de contaminación directa por emisiones de la planta de producción o bien por contaminación del agua utilizada en el procesamiento de las sustancias, por vertido directo en ríos o en sistemas de alcantarillado.

Tras su entrada en los suelos, estos compuestos pueden manifestar un comportamiento diverso. Una parte de la cantidad aplicada puede pasar a la atmósfera por volatilización y recorrer largas distancias

o bien descomponerse bajo la acción de la luz solar. Otra parte puede alcanzar las aguas superficiales (ríos, lagos) debido a escorrentía, drenaje, erosión... (Figura 1.4). Una fracción importante del pesticida, no obstante, permanece en el suelo, donde puede verse sometida a diversos procesos: acumulación (absorción y adsorción), transporte (difusión, lixiviación, volatilización) o degradación (físico-química o biológica). En todo caso, esto también contribuye a la dispersión de la contaminación (Fabre y col., 2005).



**Figura 1.4.** Resumen de los principales procesos que influyen en la transferencia, transporte, y transformación del HCH en el medio. Modificado de Weber y Miller (1989) y Fabre y col. (2005).

La persistencia de los isómeros de HCH explica su presencia en los diferentes compartimentos de un ecosistema (agua, sedimentos, aire, suelo, biota). Asimismo, los isómeros de HCH presentan mayor facilidad que otros pesticidas organoclorados para movilizarse entre los distintos compartimentos, lo que favorece su bioacumulación a lo largo de las redes tróficas. Se puede decir que, con respecto a otros compuestos organoclorados, los isómeros de HCH tienden a encontrarse más en disolución acuosa o bien en la fase gaseosa y presentan una gran capacidad de adsorberse a diferentes partículas de los suelos y sedimentos (Bidleman, 1988; Walker y col., 1999). Dado que el HCH es un producto susceptible de ser transportado a larga distancia la contaminación se ha convertido en un problema de dimensiones globales. En los años 1980-1990 se detectaron rastros de HCH en lugares tan alejados como el Ártico, en parajes naturales de alta montaña o en los océanos (Wania y Mackay, 1993; Li y Macdonald, 2005).

Una vez que el HCH se introduce en el ambiente, los diferentes isómeros se ven sometidos a procesos normales de transporte, de advección y dispersión hidrodinámica (Fabre y col., 2005). Asimismo,

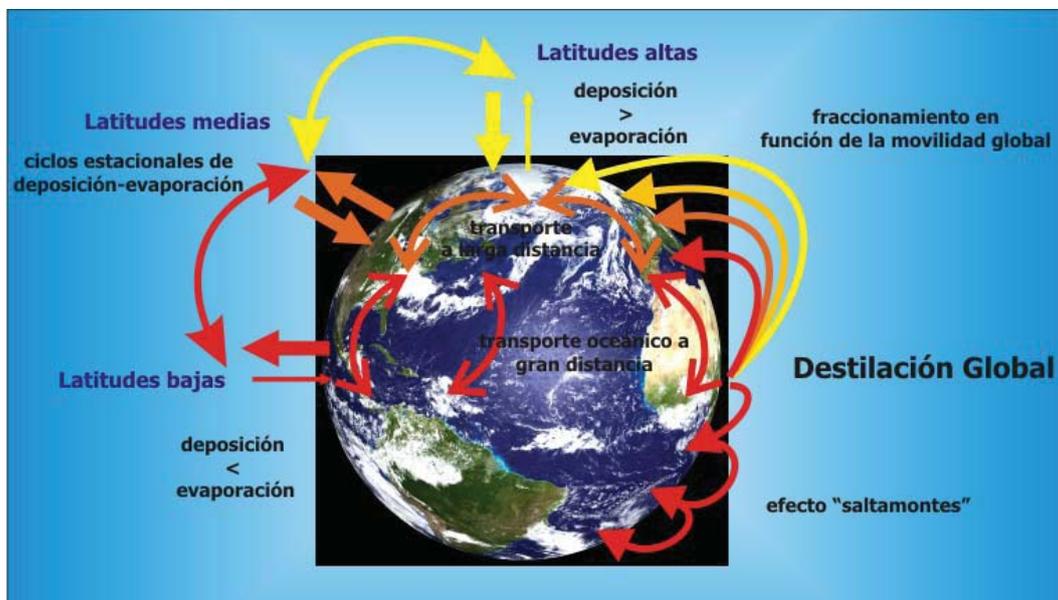
la adsorción, la desorción, la volatilización, biodegradación o la degradación abiótica pueden afectar al destino en los suelos del HCH (Figura 1.4) (Weber y Miller, 1989; Cheng, 1990). Varios factores determinan el comportamiento en el ambiente del HCH, fundamentalmente su solubilidad acuosa y el tipo de suelo en el que se aplica o bien deposita. La naturaleza química del HCH determina su susceptibilidad a ser degradado, su afinidad por los suelos, su volatilidad o su solubilidad en la disolución del suelo. En todo caso, no existe un único factor que permita la predicción del comportamiento ambiental de un isómero específico de HCH.

### 1.2.2. Comportamiento en la atmósfera

La dispersión de los residuos de pesticidas en la atmósfera se compone de dos procesos: por un lado, la **evaporación** de las moléculas de pesticida en el aire a partir de los residuos del suelo o la superficie vegetal y por otro, la subsiguiente **dispersión** del vapor resultante en la atmósfera circundante por difusión y mezcla turbulenta (Bedos y col., 2002). El coeficiente de reparto suelo-agua, la presión de vapor, la solubilidad y la constante de la ley de Henry son características clave y que tienen gran influencia en la volatilización del HCH (Taylor y Spencer, 1990; Bedos y col., 2002). La evaporación se ve influenciada además por las condiciones ambientales locales, especialmente por la temperatura y la humedad del aire y el suelo (Glotfelty y Schomburg, 1989; WHO, 1991). La volatilización aumenta con la humedad del suelo, al disminuir el número de lugares de adsorción disponibles para las moléculas de HCH, dado que las partículas del suelo se encuentran rodeadas de una película de agua (Bedos y col. 2002). Asimismo, un aumento de la temperatura conduce al aumento del flujo de volatilización debido a la influencia de la temperatura sobre la presión de vapor de los compuestos. Los diferentes isómeros de HCH tendrán mayor tendencia a evaporarse a partir de suelos en áreas tropicales que en áreas de climas templados, en las cuales el grado de sequedad del suelo ejercerá mayor influencia en el proceso, pudiendo limitar el movimiento del compuesto.

Una vez que el HCH se ha volatilizado hacia la atmósfera, tiene tendencia a permanecer en estado gaseoso a latitudes intermedias; no obstante, también puede adsorberse sobre materia particulada en suspensión, permanecer como cristales, o bien en disolución en las gotas de agua (Bidleman, 1988). En la atmósfera, el HCH puede ser dispersado y transportado por el viento. En estas condiciones, es posible un **transporte a larga distancia**, siguiendo las corrientes atmosféricas dominantes. Los diferentes isómeros de HCH, así como otros pesticidas y contaminantes orgánicos, se han encontrado en la atmósfera de regiones distantes a las de su empleo (Cohen y Pinkerton, 1966; Wania y Mackay, 1996; Pozo y col., 2006). En este punto interviene un proceso conocido como **Efecto de Destilación Global**, que implica un movimiento de los contaminantes organoclorados en general (y otros) desde regiones cálido-templadas hacia latitudes altas, donde el descenso de la temperatura provoca su depósito (Figura 1.5) (Simonich y Hites, 1995). Las principales fuentes de emisión se han localizado en Eurasia; los patrones meteorológicos específicos de estas zonas favorecerían el transporte del aire contaminado hacia el norte durante el invierno. En cuanto la temperatura desciende lo suficiente, los pesticidas presentes en la atmósfera tienden a "condensarse" sobre los suelos, las aguas, aerosoles, la nieve, el hielo o la vegetación. Los compuestos adsorbidos sobre las partículas muestran mayor tendencia a depositarse (deposición seca y/o húmeda) que los compuestos en la fase gaseosa (Wania y Mackay, 1993; Lohmann y col., 2007). La distancia a la que el

pesticida puede ser transportado en la atmósfera depende en gran medida de los posibles mecanismos de retirada (condensación, fotólisis, transformación química-isomerización) (van Pul y col., 1999).



**Figura 1.5.** Resumen del Modelo de Destilación Global y el Transporte a Larga distancia de compuestos orgánicos persistentes. Modificado de Wania y Mackay, 1996.

Todos estos procesos son de gran importancia en el caso de los isómeros de HCH. De hecho, el HCH está presente en el aire del Ártico, en concentraciones variables entre 100 y 1000  $\text{pg m}^{-3}$ , si bien la tendencia temporal ha sido a un descenso generalizado relacionado con el cese de la producción (Li y Macdonald, 2005). Si bien el patrón de emisión de  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH es prácticamente el mismo ( $\alpha$ -HCH siempre en mayores concentraciones al ser isómero mayoritario en los residuos del HCH técnico), sus caminos son divergentes: el isómero alfa tiende a mantenerse en la atmósfera, ser transportado y finalmente condensarse sobre la cubierta de hielo del Ártico; el isómero beta parece no ser trasladado a grandes distancias, sino que se posa (deposición húmeda) sobre las aguas superficiales de los océanos (Li y col., 2002a). Las concentraciones de  $\gamma$ -HCH en la atmósfera, por su parte, parecen seguir una tendencia más constante, sin un descenso claro, dado que su utilización como pesticida se ha prolongado en el tiempo (Buehler y col., 2002).

### 1.2.3. Comportamiento en las aguas

Se ha encontrado HCH tanto en aguas oceánicas como en aguas continentales (Iwata y col., 1993; Fu y col., 2003; Bidleman y col., 2007). La solubilidad acuosa del HCH es variable, pero generalmente baja (Tabla 1.2). Dado que la solubilidad de una sustancia suele medirse en agua pura, es un parámetro ambiguo, ya que los co-solutos pueden tener influencia sobre ella. El co-soluto debe ser una molécula de tamaño relativamente grande y facilitar la solubilidad en condiciones naturales, a través de presentar un medio intramolecular no polar para favorecer así la solubilización del HCH. Así, se ha demostrado que la

materia orgánica disuelta en las aguas superficiales puede facilitar la solubilidad del HCH, especialmente el isómero beta (Chiou y col., 1986; Kalbitz y col., 1997). Esto facilita el transporte de los contaminantes en la disolución del suelo, favoreciendo en última instancia la contaminación de acuíferos y agua freática, ligado a la materia en suspensión. Este proceso puede ocurrir en superficie (escorrentía) o bien en profundidad, en el perfil del suelo (lixiviación). La **escorrentía** consiste en el movimiento de agua en la superficie de los suelos; depende de la pendiente del terreno, el contenido en humedad del suelo, la cantidad y frecuencia de las precipitaciones así como la capacidad de retención del agua que presente el suelo. El pesticida se arrastra en disolución y también en las partículas del suelo erosionadas de la superficie (Weber y Miller, 1989). El **lixiviado** es el movimiento de agua y sustancias disueltas en el suelo por acción de la gravedad. En este movimiento a través del perfil del suelo influyen tanto las características del compuesto (polaridad, solubilidad acuosa) como factores edáficos que condicionan el contenido en agua y las características de la disolución del suelo (permeabilidad, tamaño de partícula, textura). La lixiviación contamina aguas subterráneas y pozos, al facilitar el movimiento del pesticida hacia otras zonas. El ciclo hidrológico puede favorecer la conexión entre aguas superficiales y aguas subterráneas en muchos lugares (Leonard, 1990).

Trabajos recientes han detectado niveles de pesticidas organoclorados, incluyendo HCH, en suelos, sedimentos y **aguas** de ecosistemas **fluviales** en diversas partes del planeta (Wolska y col., 2003; Minh y col., 2007). Se trata de zonas relacionadas con un uso agrícola intensivo durante décadas, tratadas con pesticidas. El aumento de la carga de sedimentos y de contaminantes arrastrados por el agua de escorrentía favorece la acumulación de los compuestos. Si bien en muchos casos los niveles de HCH detectados son bajos, la persistencia es grande y el peligro de acumulación en las redes tróficas se incrementa (Cavanagh y col., 1999; Fu y col., 2003). También se han detectado concentraciones de HCH cerca de puntos de vertido de residuos de la fabricación de los pesticidas comerciales, que han producido la acumulación de HCH en ríos y aguas subterráneas (Hernández y col., 1991).

Las concentraciones de HCH encontradas en las masas de aire se relacionan con las concentraciones en los **océanos**, actuando éstos como sumideros de HCH. Este proceso es reversible, ya que se podría invertir el flujo de HCH hacia la atmósfera (Willet y col., 1998). El reparto aire:agua para el isómero alfa se ve favorecido por las aguas frías de latitudes septentrionales. El  $\alpha$ -HCH no solo se transporta hacia el norte con las masas de aire, sino que también se acumula en las aguas frías superficiales del océano Ártico. En el caso del isómero beta, menos proclive a pasar a la fase gaseosa, se transporta del mismo modo en las masas de aire, pero existe una pérdida selectiva en su movimiento hacia las latitudes septentrionales, ya que este isómero tiende a ser "descargado" en las masas de agua en las etapas iniciales del transporte a larga distancia, bien por un reparto aire:agua o bien por retirada selectiva a través de la precipitación (Li y col., 2002a).

Por otra parte, aunque la contaminación en las aguas continentales se relaciona principalmente con la presencia y movimiento de los pesticidas en las aguas de escorrentía y por lixiviación, las elevadas concentraciones en las masas de aire tienen influencia al originar una deposición del HCH sobre las grandes masas de aguas continentales (**lagos**, por ejemplo) (Iwata y col., 1995; Buehler y col., 2002).

### 1.2.4. Comportamiento en los suelos

El HCH puede llegar a los suelos de diversas maneras: aplicación agrícola, depósito de residuos y mezcla con el suelo circundante, deposición atmosférica, infiltración y escorrentía de partículas contaminadas, contaminación de la disolución del suelo. Una vez que el contaminante llega al suelo, los principales procesos que ocurren en el medio edáfico son (Weber y Miller, 1989) (Figura 1.4):

- Movimiento de escorrentía en disolución o adsorbidos sobre partículas
- Volatilización (paso a la fase gaseosa)
- Transporte hidrodinámico, incluyendo advección y dispersión como elementos solubles de la fase acuosa
- Adsorción/desorción (retención) en la materia orgánica del suelo y en las superficies minerales
- Degradación (biológica, química o fotoquímica)
- Absorción/adsorción/retención por la vegetación y los residuos de la vegetación

Algunos de estos procesos han sido ya comentados, dada su importancia en otros compartimentos (volatilización, transporte hidrodinámico, movimiento en disolución), mientras que la absorción y acumulación por la vegetación se comentará en un apartado posterior. Esta sección presta una especial atención a la retención y la degradación.

#### ▪ Retención

La **retención** se refiere a la capacidad del suelo de inmovilizar un pesticida u otra molécula evitando que dicha molécula se mueva dentro o hacia fuera de la matriz del suelo (Koskinen y Harper, 1990). En este sentido, retención se refiere fundamentalmente al proceso de **adsorción**, aunque también incluye la **absorción** en la matriz del suelo y en los organismos (plantas y microorganismos). La retención controla, y a su vez es controlada, por los procesos de transformación (química y biológica) que puede sufrir el contaminante. La retención, asimismo, ejerce una gran influencia sobre el transporte de la sustancia hacia la atmósfera, las aguas freáticas y las aguas superficiales. La adsorción se define como la acumulación de un pesticida en la interfase suelo-agua y/o en la interfase suelo-aire; es un proceso reversible que implica la atracción de un compuesto químico hacia la superficie de las partículas del suelo durante un tiempo que depende de la afinidad de dicho compuesto por la superficie en la que está retenido. La distinción entre adsorción verdadera (formación de capas moleculares sobre la partícula del suelo por condensación de vapores o solutos), precipitación (formación de una fase sólida separada sobre una superficie; enlace covalente con la superficie de las partículas del suelo) y absorción (entrada) en la matriz del suelo y en la biota es compleja. Por otro lado, el término **reparto** se utiliza para describir un proceso de absorción en el que un compuesto químico orgánico se introduce en la red de un medio orgánico debido a fuerzas comunes en la disolución (por ej., Fuerzas de van der Waals) (Chiou, 1989). La adsorción se suele determinar analíticamente como pérdida del compuesto químico de la disolución inicial tras el contacto con la fase adsorbente; se utiliza el término "sorción", más general. **Sorción** se refiere a un proceso de retención general que engloba a los tres procesos específicos, adsorción, absorción y precipitación (Greenland y Hayes, 1981; Chiou, 1989; Koskinen y Harper, 1990).

Los pesticidas pueden quedar retenidos en los distintos tipos de suelos al adsorberse en mayor o menor grado sobre las arcillas y la materia orgánica. La materia orgánica es capaz de adsorber compuestos orgánicos debido a diversos mecanismos físicos y químicos, que, con frecuencia, actúan simultáneamente y pueden variar desde totalmente reversibles a totalmente irreversibles. Los mecanismos que intervienen dependen de la naturaleza química y propiedades de la materia orgánica, del pesticida y de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, potencial redox, contenido en agua) (Senesi y col., 2001). Los **mecanismos** relacionados con la retención de compuestos orgánicos son: intercambio iónico, enlace por puente de Hidrógeno, enlace catiónico, cambio de ligando, protonación, fuerzas de London-van der Waals, enlace covalente, retención física, interacciones hidrofóbicas (Hasset y Banwart, 1989; Koskinen y Harper, 1990; Chiou, 2002):

✓ **Intercambio iónico.** Mecanismo de intercambio de aniones o de cationes (en función de la naturaleza del pesticida); influye la carga predominante del suelo. Se debe a atracciones electrostáticas no específicas entre las superficies con carga del suelo (materia orgánica, arcillas, óxidos de hierro) y los pesticidas iónicos. La carga del suelo depende del pH y de la composición y cantidad de las arcillas, así como del contenido y características de la materia orgánica presente.

✓ **Enlace por puentes de Hidrógeno.** Interacción fuerte dipolo-dipolo, producida por la atracción electrostática entre un núcleo de H electropositivo y pares de electrones expuestos en átomos electronegativos (F, O, S, Cl). Estos enlaces pueden aparecer intra- e intermolecularmente; es más importante en la unión de pesticidas a las superficies orgánicas que a las superficies hidroxiladas de las arcillas porque prevalecen los grupos orgánicos adecuados.

✓ **Enlace catiónico.** Mecanismo de retención débil producido por la formación de un complejo de esfera interna (es decir, un complejo sin molécula solvatada) entre un catión intercambiable y un grupo funcional aniónico o polar. Dado que el catión intercambiable está rodeado de una capa de moléculas de agua, el pesticida debe ser capaz de desplazar toda el agua de hidratación. En caso de no ser así puede formarse un complejo de esfera externa entre un protón y una molécula de agua hidratando el catión intercambiable (ión solvatado). Este tipo de enlaces son muy importantes en la unión de moléculas polares y superficies de arcillas.

✓ **Cambio de ligando.** Mecanismo de retención muy fuerte. Se trata de un complejo de esfera interna formado entre un grupo funcional (carboxilo o hidroxilo) que desplaza a un grupo hidroxilo o a una molécula de agua de un metal (hierro o aluminio) de una superficie mineral del suelo (arcillas y/o oxihidróxidos de hierro y aluminio). Este tipo de enlaces se producen con pesticidas en situaciones sencillas de laboratorio; no está muy clara su influencia en un suelo.

✓ **Protonación.** Formación de complejos de transferencia de carga en el pesticida en una superficie mineral; se produce cuando un grupo funcional orgánico forma un complejo con un protón de superficie. El pH y la configuración de la molécula del pesticida ejercen gran influencia en este mecanismo de retención.

✓ **Fuerzas de London-van der Waals.** Son, en su conjunto, fuerzas que actúan a corta distancia, enlaces resultantes de fuerzas de dispersión debido a interacciones dipolo inducido-dipolo inducido (provocados por el movimiento de los electrones entre moléculas adyacentes). Este movimiento se correlaciona y produce una atracción electrostática neta. Si bien la fuerza de estas interacciones es débil, son aditivas, aumentando con el área de contacto y pueden ser especialmente importantes en la sorción de materiales de gran peso molecular, ya que esto implica que muchos grupos moleculares puedan presentar este tipo de fuerzas.

✓ **Enlace covalente.** Algunos pesticidas pueden establecer un equilibrio rápido y reversible entre el compuesto en disolución y el compuesto adsorbido sobre la superficie del suelo. Al reaccionar con la superficie, el compuesto queda retenido mediante enlace covalente, convirtiéndose en un "residuo enlazado" o "residuo no extraíble" (Mordaunt y col., 2005). Esto ocurre, por ejemplo, cuando el pesticida reacciona con la materia orgánica del suelo y se incorpora a la misma por reacciones de oxidación (Weber y Huang, 2003). En el caso de algunos compuestos xenobióticos, la formación de residuos enlazados también puede ocurrir en las raíces de muchas plantas, debido a la actividad de enzimas extracelulares. (Sandermann, 2004).

✓ **Retención física.** Los pesticidas pueden quedar inmovilizados ("atrapados") mediante una acumulación del compuesto en la matriz del suelo, debido a una penetración profunda en nanoporos. En este proceso es muy importante el tiempo que el pesticida permanece en el suelo, lo que afecta a su biodisponibilidad (envejecimiento – "aging" – del compuesto) (Alexander, 2000).

✓ **Interacciones hidrofóbicas.** Se trata de un reparto de pesticidas no polares fuera de la fase acuosa polar sobre superficies hidrofóbicas en el suelo (fundamentalmente materia orgánica, pero también superficies minerales con enlaces –Si-O-Si-). La interacción es relativamente débil. La fuerza predominante en esta sorción hidrofóbica es el gran cambio de entropía que resulta al retirarse soluto (pesticida) de la disolución. Esto parece derivar de la destrucción de la cavidad ocupada por el soluto en el disolvente y la destrucción de la cubierta de agua estructurada el pesticida solvatado.

La capacidad de un suelo para retener un contaminante orgánico se relaciona fundamentalmente con su contenido en materia orgánica y arcilla, el pH y la humedad. El pH y la capacidad de intercambio de cationes del suelo tienen poca influencia en la adsorción de los distintos isómeros de HCH dadas las características físico-químicas de estos compuestos (Tabla 1.2). El comportamiento del HCH en un suelo se relaciona directamente con el contenido de materia orgánica y las interacciones resultantes; en suelos pobres en materia orgánica, son los contenidos en arcilla y óxidos de hierro los que influyen en la retención y/o transporte de HCH (Wahid y Sethunathan, 1979). El isómero  $\gamma$ -HCH se ha encontrado fuertemente ligado a horizontes profundos con elevados contenidos de arcillas (Miglioranza y col., 1999). Para evaluar la capacidad de un compuesto para ser retenido se utiliza el coeficiente de reparto entre la fase líquida y la fase sólida,  $K_d$  (coeficiente de distribución; mg pesticida kg suelo<sup>-1</sup> / mg pesticida L agua<sup>-1</sup>; Wauchope y col., 2002), parámetro variable en función de las propiedades del suelo utilizado (pH, fuerza iónica, temperatura,...). Este coeficiente puede ser normalizado en función del contenido de carbono orgánico del suelo:  $K_{oc} = K_d / f_{oc}$ , siendo  $f_{oc}$  la fracción orgánica del suelo (Green y Karickhoff, 1990). Los valores de  $K_{oc}$  son altos para los isómeros de HCH, indicando su afinidad por la materia orgánica del suelo.

### ▪ **Degradación (transformación)**

Los compuestos orgánicos están expuestos a procesos de degradación en el medio edáfico, gracias a la actuación de enzimas de origen microbiano, fúngico e incluso vegetal, ya sea en el suelo o bien unidas a membranas celulares. Las transformaciones biológicas mediadas por enzimas vegetales son del tipo oxidación, reducción, hidrólisis, con un proceso posterior de conjugación y, en ocasiones, un paso final de unión o conjugación con las paredes celulares (unión a lignina, a hemicelulosas,...) (Dietz y Schnoor, 2001). Los microorganismos actúan sobre los contaminantes a través de procesos de biodegradación, co-metabolismo, polimerización o conjugación y acumulación. Las principales reacciones bioquímicas que tienen lugar son oxidación, reducción, hidrólisis y síntesis. (Bollag y Liu, 1990; Kumar y col., 2006; Bhatt y col., 2007). Para ciertos contaminantes es posible una degradación fotoquímica en la superficie de los suelos.

✓ **Degradación biótica.** Los isómeros de HCH pueden ser biodegradados por deshalogenación reductiva, dehidrohalogenación u oxidación, siendo la deshalogenación del HCH y sus compuestos derivados (en condiciones aerobias y anaerobias) energéticamente favorables (Quintero Díaz, 2004). Si la degradación ocurre en **condiciones aerobias**, al utilizarse los contaminantes como fuente de carbono, se puede degradar completamente el compuesto hasta una total mineralización, formando O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y HCl. Diversos microorganismos, consorcios bacterianos y hongos de la podredumbre de la madera son capaces de degradar el HCH presente en un suelo contaminado (Johri y col., 2000). El isómero β-HCH es generalmente el más persistente, tanto en condiciones aerobias como anaeróbicas. No obstante, todos los isómeros de HCH son susceptibles de ser degradados, si bien a velocidades diferentes (Johri y col., 1998; Miyauchi y col., 1998; Quintero Díaz, 2004). La ruta de degradación oxidativa comienza por la formación de pentaclorociclohexeno (PeCCH), por deshidrohalogenación, formándose posteriormente tetraclorociclohexeno (TeCCH); pueden formarse o fenoles clorados, ciclohexenoles clorados o bencenos clorados por oxidación. Finalmente el HCH (especialmente el isómero gamma) se mineraliza de modo completo a CO<sub>2</sub> (WHO, 1991). Por otro lado, la **degradación anaeróbica** es más eficiente, al ser un proceso termodinámicamente más favorable (Quintero Díaz, 2004). El isómero beta es el más recalcitrante, aunque es posible degradar hasta un 60% del β-HCH en condiciones metanogénicas, si bien no se tiene claro que tipo de bacterias podrían realizar la dechloración (Middeldorp y col., 1996). En los insectos, por otra parte, el HCH es metabolizado y puede ser degradado excretado; en estas reacciones actúan enzimas como la glutatión-S-transferasa (Roberts y Huston, 1999). Muchos de los metabolitos intermedios son comunes en las diferentes rutas de degradación (Figura 1.6). En medio acuoso (disolución del suelo, por ejemplo), el HCH también es susceptible de ser transformado gracias a la actividad microbiana (Law y col., 2001; Law y col., 2004).

✓ **Degradación abiótica.** En condiciones totalmente abióticas es posible que se produzca una descloración reductiva del HCH, en ambientes fuertemente reductores y con la presencia de catalizadores adecuados (Marks y col., 1989; Rodríguez Garrido y col., 2004). Se trata de una ruta que comienza con la formación de TeCCH por dihaloeliminación (retirada de dos moléculas de cloro vecinas), que se transforma en diclorociclohexadieno (DCCH), llegando finalmente a productos tales como PeCCH, bencenos clorados y fenoles en medios fuertemente reductores. Finalmente, en los medios acuosos puede



**1.2.5. Acumulación de HCH en la vegetación**

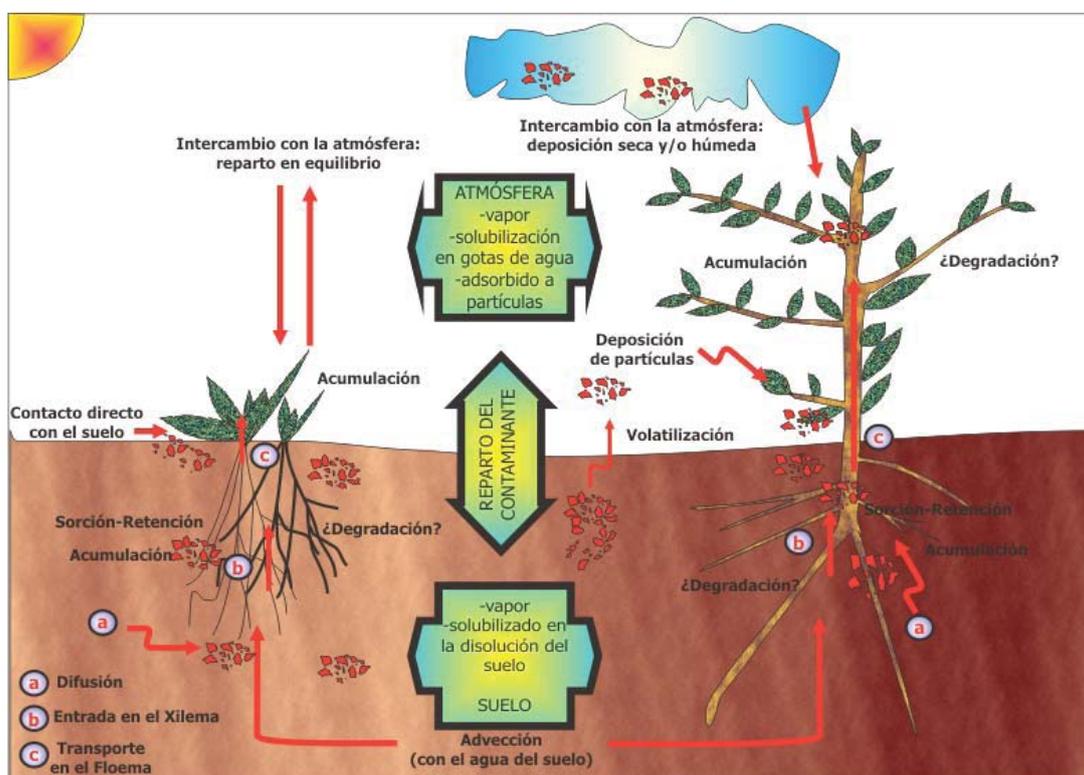
La vegetación juega un papel importante en la distribución de los compuestos organoclorados en el ambiente. De hecho, la vegetación puede ser utilizada para efectuar un seguimiento de la contaminación aérea de los compuestos orgánicos persistentes (Powell, 1997). Ello es debido fundamentalmente a su capacidad para **acumular** contaminantes orgánicos, modificar los procesos de intercambio suelo-aire e introducir dichos contaminantes en la red trófica (Wang y col., 1997) (Tabla 1.3; Figura 1.7). Es necesario conocer las **rutas** principales de contaminación vegetal (vía suelo o vía atmósfera) y los diferentes **mecanismos** o procesos de acumulación que controlan la transferencia del pesticida. La vegetación constituye un importante sumidero de pesticidas, ya que es capaz de retenerlos eficazmente en diferentes órganos (Muir y col., 1993; Simonich y Hites, 1995). Asimismo, la vegetación facilita la acumulación de los compuestos organoclorados en los suelos una vez que los residuos vegetales se incorporan a éstos (Horstmann y McLachlan, 1996). En el caso del HCH, se han detectado residuos de este pesticida tanto en raíces como en los tejidos aéreos de diversas especies vegetales (Buckley, 1982; Simonich y Hites, 1995; USC, 2003).

**Tabla 1.3.** Características relevantes en la acumulación de compuestos orgánicos xenobióticos en las plantas.

<b>Pesticida</b>	<b>Suelo</b>	<b>Planta</b>	<b>Condiciones ambientales</b>
Solubilidad	Capacidad de retención:	Absorción	Precipitaciones
$K_{ow}$	-materia orgánica (cantidad y calidad)	Adsorción/Retención	Temperatura
Recalcitrancia	-% arcilla y tipo	Exudados raíz (C, cantidad)	Vientos
	Textura	pH	Oscilación diurna
	Contenido en agua	$O_2$ , $CO_2$ , $N_2$	Estacionalidad
	Aireación		
	Temperatura	Índice de Área Foliar	
	pH	Área Foliar Específica	
	Contenido en nutrientes	Cutícula: composición, características	
	Capacidad de degradación:	Espesor capa límite	
	- comunidad de la rizosfera, cantidad y calidad	Espesor hoja	
		Densidad de estomas	

Un importante aspecto a considerar es la **biodisponibilidad** de los contaminantes. Sea cual sea el origen de la contaminación, un compuesto orgánico es un candidato para acumularse en la planta (bioacumulación en su sentido más amplio) sólo si es biodisponible para el vegetal (Boesten, 1993; Schwarz y Jones, 1997). Los mecanismos de acumulación de compuestos orgánicos presentes en el suelo o en la atmósfera parecen ser de naturaleza pasiva, conducidos por procesos físicos como la difusión y la convección (Riederer, 2005). Una vez que el suelo, el agua y/ o la atmósfera se encuentran contaminados por pesticidas, hay dos **rutas** principales por las que pueden acceder a la vegetación, bien sea la vegetación objetivo (caso de herbicidas) o la "no-objetivo", caso de insecticidas como el HCH: **ruta suelo→planta** y **ruta aire→planta** (Figura 1.7). Los principales procesos que se relacionan con estas rutas son : **retención** (reparto disolución del suelo:raíz) en los tejidos radiculares; **absorción** por las

**raíces** y **translocación** a través del xilema vegetal; **volatilización** a partir del suelo y posterior absorción foliar directamente de la fase gaseosa; **absorción foliar** directa vía deposición húmeda o deposición seca a partir de la atmósfera circundante; **resuspensión** de las partículas del suelo por el viento o la lluvia y subsiguiente **captura** por la vegetación.



**Figura 1.7.** Principales mecanismos de acumulación de HCH en la vegetación.

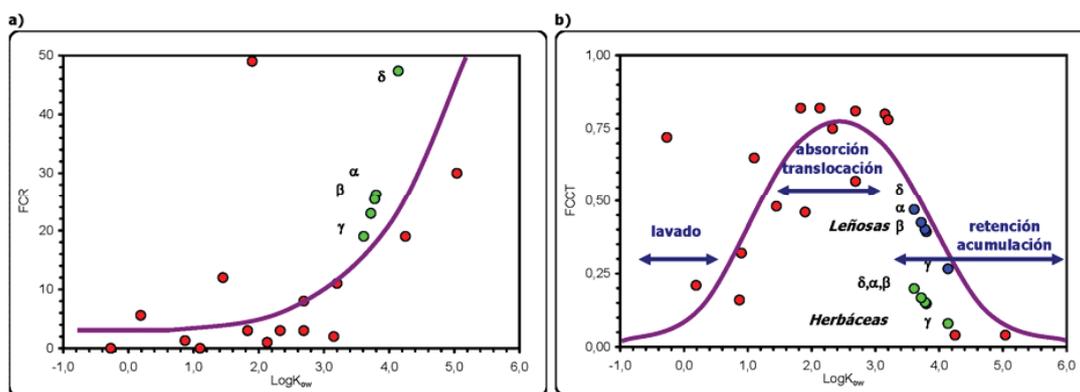
▪ **Ruta suelo:planta (reparto disolución del suelo:raíces)**

Las raíces extraen el agua y los solutos disueltos en la disolución del suelo, que pueden ser llevados hacia el sistema de transporte a larga distancia de la planta, el xilema. La superficie de contacto y absorción puede llegar a ser muy grande por la presencia de pelos radicales y de hifas de hongos. La fracción volumétrica de las raíces finas jóvenes que es de acceso libre al agua y solutos (Espacio Libre Aparente, ELA - AFS, apparent free space) se localiza en las paredes celulares de los pelos radicales y las células del cortex (Bernstein y Nieman, 1960; Schwarz y Jones, 1997). La entrada de las sustancias disueltas en la planta a partir de la disolución del suelo es prácticamente no selectiva y reversible (difusión pasiva), gobernada por la diferencia de gradiente del potencial químico o hídrico entre el interior de la raíz y el suelo. Una vez en el apoplasto de la raíz, el transporte en el interior de la planta dependerá de su facilidad de alcanzar los tejidos del floema en el cilindro central de la raíz. Para el agua y las sustancias disueltas existen dos posibles vías: ruta apoplástica (movimiento a través de las paredes celulares) y ruta simplástica (entrada a través del plasmalema y transporte vía plasmodesmos de células adyacentes). La ruta apoplástica se interrumpe generalmente en la endodermis, debido a la presencia de la banda de

Casparly. Únicamente los solutos que accedan a la ruta simplástica podrían alcanzar el floema (Schreiber y col., 1999).

Los propios tejidos vegetales pueden ser considerados como bioadsorbentes, es decir, presentan la capacidad de acumular contaminantes, ya sea en las partes vivas del vegetal como en sus restos (Arthur y col., 2005). El coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) es el parámetro que indica, de modo orientativo, cual es el destino probable de los compuestos xenobióticos: absorción a nivel radicular por las plantas (y transporte activo a través de las membranas), adsorción y reparto agua:planta, con una retención en la superficie de las raíces o bien permanencia en la disolución del suelo, lo que los excluye de la adsorción. Muchos contaminantes orgánicos no son fácilmente absorbidos por las plantas, quedando retenidos en los tejidos de la raíz ( $\text{Log } K_{ow} > 3.0$ ; Figura 1.8; Schnoor y col., 1995; Schnoor, 2002). Esta **retención no específica**, en muchos casos, puede ser el paso inicial necesario para una absorción posterior al interior de la planta. Dado que estos compuestos se encuentran presentes en la disolución del suelo, cuando ésta entra en contacto con las raíces, puede existir un reparto agua:raíz mediante **sorción** o unión a la estructura radical o bien a las paredes celulares (Burken, 2003). Tanto la hemicelulosa de la pared celular como la doble capa lipídica de las membranas celulares son los lugares preferentes de acumulación de los compuestos orgánicos hidrofóbicos. Esta sorción es muy efectiva y en ocasiones irreversible. En el estudio de estos fenómenos se han desarrollado conceptos empíricos de gran interés como el de Factor de Concentración Radicular (FCR; RCF, "root concentration factor", siglas en ingles) (Briggs y col., 1982; Burken y Schnoor, 1998), definido como:

$$\text{FCR} = \left\{ \frac{\left( \frac{\text{mg HCH}}{\text{kg raíz (peso fresco)}} \right)}{\left( \frac{\text{mg HCH}}{\text{L disolución}} \right)} \right\}, (\text{L kg}^{-1}), \quad (\text{a})$$



**Figura 1.8.** Relación entre el coeficiente de reparto octanol-agua ( $\text{Log } K_{ow}$ ) y a) el Factor de Concentración en Raíz (FCR) y b) el Factor de Concentración de la Corriente de Transpiración (FCCT) para distintos contaminantes orgánicos.

Dado que la hidrofobicidad se relaciona con el Log  $K_{ow}$  de cada contaminante orgánico, diversos autores han buscado relaciones entre ambos conceptos, llegando a expresiones muy similares (Tabla 1.4). Estos estudios se basan en datos obtenidos en cultivos hidropónicos, generalmente analizando una especie vegetal (herbácea o leñosa) y una serie de compuestos con características físicoquímicas variables. La afinidad entre los tejidos vegetales y los diferentes contaminantes está muy influenciada no solo por el tipo de contaminante (hidrofobicidad) sino también por el tipo de vegetal considerado (herbáceas frente a leñosas, por ejemplo) (Trapp, 2007). En función de las características físicoquímicas de los distintos isómeros de HCH, se pueden calcular cada FCR teórico (Figura 1.8a). Los valores de FCR son crecientes en función de la hidrofobicidad, indicando una gran afinidad de todos los isómeros de HCH por los tejidos vegetales. Respecto a la cinética de este proceso, algunos autores consideran que se trata de una retención en dos fases: una fase inicial de gran rapidez en la acumulación, seguido de una segunda fase mucho más lenta y de duración muy grande; al parecer, la presencia y naturaleza de los tejidos radicales afectan a la acumulación (Bacci y col., 1990).

Por otro lado, pueden ocurrir también procesos de **adsorción específica** en lugares concretos de los tejidos radicales, asociados a la presencia de enzimas extracelulares o bien a proteínas de membrana, con capacidad enzimática de transformación de los compuestos retenidos. Una vez que el contaminante es retenido por la planta, puede ser almacenado (o sus metabolitos, en caso de ser transformado) en nuevas estructuras de la planta vía su introducción en el proceso de lignificación. Grupos funcionales tales como aminas (-NH<sub>2</sub>) o hidroxilos (-OH) pueden ser fácilmente transformados. Ello implica que tanto los compuestos como los metabolitos resultantes permanezcan retenidos irreversiblemente en las raíces y sean modificados químicamente, integrándose en la estructura al convertirse en **residuos enlazados** (Bhadra y col., 1999; Li y col., 2002b). Se produce una detoxificación en la planta si el compuesto químico inicial se metaboliza en sustancias no fitotóxicas (Sandermann, 2004). Si el contaminante puede ser transportado hacia las partes aéreas, podría ser volatilizado y eliminado de este modo. En algunos casos es posible mineralizar el compuesto químico completamente, obteniendo energía para el crecimiento, agua y dióxido de carbono.

Si el contaminante orgánico ha sido absorbido, a continuación es posible que sea distribuido entre los diferentes compartimentos del vegetal en función del proceso fisicoquímico de reparto, pasivamente, a través de las paredes celulares (Burken, 2003). En este traslado interviene de modo principal la eficiencia de absorción que muestre la planta, la tasa de transpiración y la concentración del compuesto químico en la disolución del suelo. El Factor de Concentración de la Corriente de Transpiración (FCCT; TSCF, "transpiration stream cocentration factor, en inglés; Burken y Schnoor, 1998), definido como:

$$FCCT = \frac{\left( \frac{\text{mg HCH}}{\text{L corriente de transpiración}} \right)}{\left( \frac{\text{mg HCH}}{\text{L disolución}} \right)}, \text{ adimensional, rango } 0.0\text{-}1.0, \quad (b)$$

es usado para caracterizar la eficiencia en la absorción de compuestos químicos no transformados retenidos en las raíces de plantas vasculares (herbáceas y leñosas): el compuesto puede perderse con la disolución del suelo, absorberse y translocarse o bien quedar retenido (Figura 1.8b). Esto depende tanto de

## CAPÍTULO 1

las propiedades fisicoquímicas del compuesto orgánico (hidrofobicidad, solubilidad, polaridad, peso molecular) como de las características propias de la planta (herbáceas vs. leñosas). Si el compuesto químico se ve afectado por reacciones bioquímicas a nivel de las raíces, no sigue la relación propuesta, ya que la absorción se rige por el lugar de unión del compuesto con la raíz y de su reactividad ahí y no tanto de la tasa de transporte a través de las membranas celulares. Diversos estudios centrados en las medidas del FCCT de diferentes contaminantes orgánicos (herbicidas, pesticidas) han llegado a relaciones empíricas, similares a las vistas para el FCR, entre FCCT y las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes ( $\text{Log } K_{ow}$ ) (Tabla 1.4). Tanto el FCR como el FCCT pueden ser considerados como una aproximación al concepto más general de **cociente de reparto** suelo-planta (factor de concentración; cociente de bioconcentración; Schwarz y Jones, 1997; McKone y Maddalena, 2007, Tabla 1.4). En general, todos los coeficientes muestran la afinidad del HCH por la acumulación en los tejidos vegetales, si bien la ruta de absorción y posterior translocación no sería preferencial, al menos en grandes concentraciones.

**Tabla 1.4.** Cociente de Reparto Suelo-Planta: definiciones más comunes encontradas en la bibliografía.

	<b>Descripción</b>	<b>Formula</b>	<b>Notas</b>	<b>Referencia</b>
<b>FCR</b>	Factor de Concentración de la Raíz	$\text{Log}(\text{FCR}-0.82) = 0.77\text{Log } K_{ow}-1.52$	<i>Hordeum vulgare</i> ; raíces	Briggs y col., 1982.
	concentración en raíz (peso fresco) / concentración del en disolución acuosa	$\text{Log } \text{FCR} = 0.630\text{Log } K_{ow} -0.959$	<i>Hordeum vulgare</i> ; raíces	Topp y col., 1986.
		$\text{Log } (\text{FCR}-3.0) = 0.65\text{Log}K_{ow} -1.57$	<i>Populus sp.</i> (leñosa); raíces	Burken y Schnoor, 1998.
<b>FCCT</b>	Factor de Concentración de la Corriente de Transpiración	$\text{FCCT}=0.784\exp\{-(\text{Log}K_{ow}-1.78)^2/2.44\}$	<i>Hordeum vulgare</i> ; raíces	Briggs y col., 1982.
	concentración en la corriente de transpiración respecto a la concentración del compuesto orgánico en disolución acuosa	$\text{FCCT}=0.7\exp\{-(\text{Log}K_{ow}-1.78)^2/2.78\}$	<i>Glycine max</i> ; raíces	Hsu y col., 1990.
		$\text{FCCT}=0.756\exp\{-(\text{Log}K_{ow}-2.50)^2/2.58\}$	<i>Populus sp.</i> (leñosa); raíces	Burken y Schnoor, 1998.
<b>CBC</b>	Cociente de BioConcentración	$\text{LogCBC} = 1.588-0.578\text{Log}K_{ow}$	factor de bioconcentración en la vegetación;	Travis y Arms, 1988.
	concentración en planta (peso seco) / concentración en suelo (peso seco)	$\text{LogCBC} = -0.204 (X_{pc}) + 0.589$	$X_{pc}$ : factor de corrección para cada compuesto	Dowdy y McKone, 1997.
<b>CCP</b>	Cociente de Concentración en la Planta	$\text{CCP} = (0.082+0.0089*K_{ow}^{0.95}) \times \text{FCCT}$	<i>Hordeum vulgare</i> ; tallos	Briggs y col., 1983.
	concentración en planta (peso fresco) / concentración en disolución del suelo	$K_{pw} = W + LaK_{ow}^b$ W: contenido en agua de la planta; L: contenido en lípidos de la planta; a y b, factores empíricos $\text{LogCCP} = 0.718(X_{pc})-2.372$	reparto de equilibrio planta - disolución acuosa; $\text{CCP}=K_{pw}$ $X_{pc}$ : factor de corrección para cada compuesto	Trapp y Matthies, 1995; Trapp, 2002. Dowdy y McKone, 1997.

La posible absorción de un determinado contaminante está fuertemente influenciada por el estado de la planta o plantas implicadas. Es necesario que la eficiencia en la absorción del agua sea óptima, y que la transpiración sea lo suficientemente importante como para arrastrar los contaminantes con el agua. La transpiración es el proceso vegetal clave ya que determina la tasa de absorción del contaminante. Esto dependerá, pues, de la especie vegetal que se considere y de parámetros específicos como área foliar, contenido de nutrientes, humedad del suelo, viento, humedad relativa, etc. (Tabla 1.3) (Riederer, 2005).

### ▪ Ruta (suelo)-aire-biomasa aérea

La superficie de las hojas constituye la segunda gran vía de entrada para los contaminantes orgánicos debido a la gran área de exposición (hasta 20 veces mayor que el área de suelo), sumado a su carácter hidrofóbico que facilita la permeabilidad de los compuestos apolares (Riederer, 2005). Los principales **mecanismos** de contaminación de los tejidos vegetales aéreos son: (i) absorción directa del contaminante por reparto en equilibrio desde la fase gaseosa que rodea al vegetal; (ii) absorción foliar vía deposición húmeda o deposición seca a partir de la atmósfera circundante contaminada (HCH como vapor o particulado); (iii) resuspensión de las partículas del suelo por el viento o la lluvia y subsiguiente acumulación en la vegetación. Todos estos mecanismos conducen a la acumulación de HCH en los tejidos vegetales comparable a la que se produce por la ruta suelo-raíces (Bacci y col., 1990; Paterson y col., 1991; Kömp y McLachlan, 1997; MacLachlan, 1999; Mackay y col., 2006).

Existe una barrera entre la biomasa vegetal aérea y el contaminante: la **cutícula** vegetal, una membrana hidrofóbica constituida por sustancias de naturaleza polimérica asociadas a ceras (Welke y col., 1998; Müller y Riederer, 2005). En función de las características físicoquímicas del contaminante orgánico y del estado fisiológico de la hoja, las sustancias orgánicas pueden ser absorbidas o liberadas bien a través de la cutícula o bien a través de los estomas (Barber y col., 2002). En todo caso, la cutícula misma puede actuar como compartimento de acumulación de HCH. La estructura y composición química de la cutícula puede variar con la especie vegetal y el estado de desarrollo (Bakker, 2000).

La biodisponibilidad de la fracción aérea del HCH se relaciona en parte con la concentración en el vapor atmosférico. La absorción de los contaminantes orgánicos por las hojas se ha relacionado con un reparto sencillo desde la fase gaseosa (o bien la fase acuosa) de la atmósfera y la superficie foliar hidrofóbica (reparto aire:hoja, reparto agua:hoja). Un valor alto del coeficiente de reparto octanol agua ( $K_{ow}$ ) y una constante de la Ley de Henry suficientemente alta para permitir la volatilización convierten al HCH en un compuesto químico candidato para la absorción foliar. La **volatilización** del HCH de la superficie de un suelo contaminado es función de la presión de vapor del contaminante (relacionado con la temperatura), la solubilidad acuosa y las propiedades físicoquímicas del suelo.

El movimiento a través de la cutícula es por difusión simple (Schönherr y Riederer, 1989). La distribución del compuesto químico desde la cutícula al interior de la hoja se controla de un modo pasivo, relacionado en última instancia con un cociente de reparto cutícula-agua entre la membrana interna y la pared celular vegetal (apoplasto vegetal). Existe una desorción asimétrica como consecuencia de la presencia de lípidos solubles en la superficie externa de la cutícula, lo que puede ocasionar una gran resistencia al transporte y con ello un bajo cociente de reparto. Todo esto sugiere que la porción externa de

la membrana cuticular es la barrera limitante de la tasa de acumulación del contaminante y no tanto una posterior transferencia entre las células. Ello no implica que no se acumule HCH en la hoja. De hecho, existe la posibilidad de metabolizar el compuesto acumulado en superficie (fotólisis: Wild y col., 2007) o bien perderlo a causa de una emisión al medio ambiente (volatilización a partir de tejidos vegetales cargados de HCH: Barber y col., 2004).

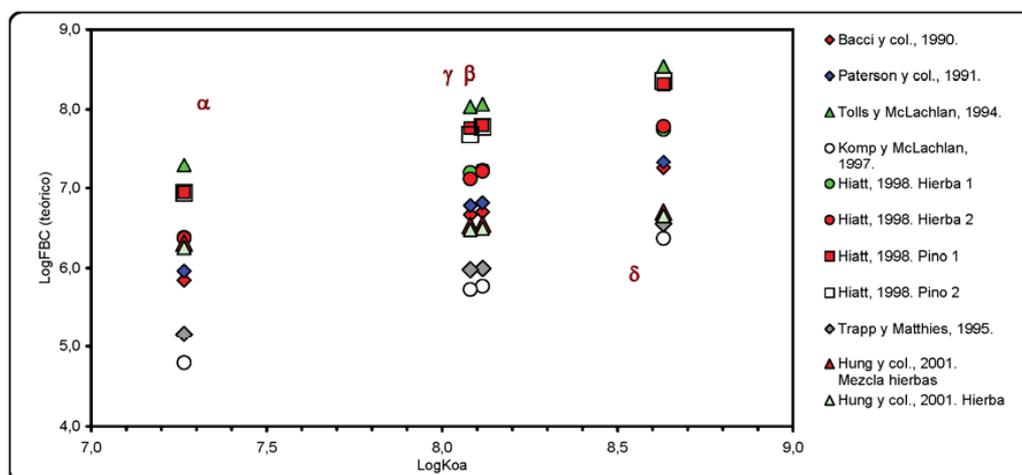
Desde un punto de vista práctico, la acumulación en la biomasa aérea del HCH puede cuantificarse, de modo similar a lo visto en la absorción radicular, mediante un equilibrio hoja-aire, expresando dicha relación mediante un Factor de Bioconcentración (FBC), definido como (Schwarz y Jones, 1997):

$$\mathbf{FBC} = \left\{ \frac{(\text{mg HCH} / \text{L hoja})}{(\text{mg HCH} / \text{L aire})} \right\}, \text{ adimensional,} \quad (\text{c})$$

Existen diversos estudios sobre las relaciones de equilibrio hoja-aire con contaminantes orgánicos que abarcan un rango amplio de propiedades físicoquímicas; se ha encontrado una relación entre los distintos coeficientes de reparto y el FBC que se puede expresar, de un modo muy general, como: **Log FBC x K<sub>aw</sub> vs Log K<sub>ow</sub>**, que en su forma más sencilla, puede ser ajustada a una recta del estilo: **FBC = 0.022 K<sub>ow</sub> / K<sub>aw</sub>**. (K<sub>aw</sub> es el coeficiente de reparto aire-agua, calculado a partir de K<sub>ow</sub>; Bakker, 2000). El coeficiente de proporcionalidad 0.022 ha sido obtenido de modo empírico y representa un valor promedio (estándar), tomado como el contenido volumétrico en lípidos (L, v/v) del tejido vegetal que se este considerando (parte aérea). Por supuesto, existen diferencias en los valores de este coeficiente en función de las características particulares de las especies vegetales que se investiguen (Polder y col., 1998; Barber y col., 2004). El cociente de los coeficientes de reparto (K<sub>ow</sub>:K<sub>aw</sub>; ambos expresados en mol m<sup>-3</sup>) puede ser considerado como el coeficiente de reparto octanol-aire, K<sub>oa</sub> (Tabla 1.2; Paterson y col., 1991), resultando:

$$\mathbf{FBC} = \mathbf{L} * \mathbf{K}_{\text{oa}}, \text{ (L, contenido en lípidos, v/v)} \quad (\text{d})$$

Teniendo en cuenta las expresiones (c) y (d), y los valores de los diferentes Factores de BioConcentración (FBC) que se pueden calcular para los isómeros de HCH, se ha elaborado la Figura 1.9. Se considera que, en general, el contenido en lípidos de cada especie vegetal es la mayor fuente de variabilidad a la hora de evaluar la acumulación de contaminantes orgánicos en la parte aérea de las plantas (Böhme y col., 1999). Dicha variabilidad teórica se constata para los diferentes isómeros de HCH teniendo en cuenta los modelos recogidos en diversos trabajos de laboratorio y campo (Figura 1.9). La tendencia de todos los isómeros de HCH es la misma independientemente del FBC concreto utilizado. No obstante, los valores pueden oscilar en más de dos órdenes de magnitud, si bien en todos los casos se indica que el HCH es un compuesto que tiende a acumularse en los tejidos aéreos de las plantas. Esta oscilación se relaciona con las características variables de la vegetación usada en cada experimento. Con el paso del tiempo se han desarrollado **modelos** cada vez más complejos para estudiar la acumulación de compuestos orgánicos en la vegetación; estos modelos permiten la evaluación de la acumulación en las plantas incluyendo sus características fundamentales, tales como el potencial de absorción y translocación, la posibilidad de volatilización y pérdida, etc. (Travis y Arms, 1988; Paterson y col., 1994; Trapp y Matthies, 1995; Chiou y col., 2001; Trapp, 2007).



**Figura 1.9.** Reparto aire-planta de los diferentes isómeros de HCH: cálculo del Factor de Bioconcentración (FBC), basado en modelos utilizados en la bibliografía.

Como se ha dicho, la solubilidad del HCH, su presión de vapor y el contenido en lípidos de la cutícula son los parámetros más importantes que determinarán el equilibrio hoja-aire en este tipo de compuestos. Estas relaciones suponen que el principal **proceso** responsable de la acumulación de HCH en la vegetación es un **reparto en equilibrio** condicionado por los relativamente bajos valores de  $K_{oa}$  de los diferentes isómeros de HCH. No obstante, en condiciones naturales, alejadas de las condiciones de laboratorio controladas que facilitan la construcción de modelos utilizando el concepto de FBC, otros procesos (**deposición gaseosa de cinética limitada** y, sobre todo, **deposición asociada a partículas**; Welsch-Pausch y col., 1995; McLachlan, 1999; Smith y Jones, 2000) pueden hacer que las concentraciones detectadas en la vegetación (el FBC, expresado de modo genérico) sean muy superiores a las que teóricamente se podrían encontrar. En este caso hay que incluir otras variables que cobran importancia, como el crecimiento de la planta, la concentración que se encuentre en la fase gaseosa, la persistencia del contaminante, la velocidad de deposición de las partículas contaminadas, la resistencia del aire, etc. (McLachlan, 1999; Mackay y col., 2006).

### 1.2.6. Comportamiento en la biota

La acumulación de HCH y otros pesticidas en diversos tejidos animales es un hecho que se conoce desde poco tiempo después del inicio de la comercialización a gran escala de estos productos (Bierman, 1990; Ramesh y col., 1992; Turnbull, 1996; Willet y col., 1998; Wania, 2003). El reparto de los compuestos xenobióticos en los tejidos biológicos y la subsiguiente bioacumulación a través de las redes tróficas son aspectos relevantes desde el punto de vista ambiental (Newman y Unger, 2003). La tendencia, en el caso de los pesticidas (incluido el HCH) es a la acumulación prioritaria en los tejidos grasos de animales antes que permanecer en fase acuosa, en fase gaseosa o bien sobre la fracción inorgánica del suelo (Turnbull, 1996). Las grandes rutas de entrada en las redes tróficas son: (i) la microfauna acuática (o edáfica) que puede consumir partículas contaminadas con pesticidas y, (ii) el reparto preferente sobre los tejidos de

plancton/algas o bien vegetales terrestres (en tejidos aéreos o subterráneos) que favorece la acumulación, afectando así a los animales y en última instancia al ser humano. El HCH puede seguir de este modo las complejas relaciones tróficas de la naturaleza, asociándose fundamentalmente a los tejidos grasos, con lo que una contaminación de bajo nivel en las especies inferiores puede acabar por provocar un efecto de **magnificación** en los animales superiores. Esto convierte a los ecosistemas en altamente vulnerables (Macdonald y col., 2002).

Un ejemplo característico de acumulación de HCH es el transporte a escala global de la contaminación originada en diversos lugares hacia la zona del Ártico. Entre los compuestos encontrados se pueden mencionar el DDT, el Toxafeno, el Endosulfan y el HCH (Macdonald y col., 2000; Li y Macdonald, 2005). Los mamíferos marinos son animales que acumulan HCH debido a su posición en lo alto de las redes tróficas oceánicas, principal fuente de contaminación por pesticidas en regiones muy al Norte. Los hábitos alimenticios, la localización, y la actividad metabólica (el HCH puede ser degradado) tienen influencia en los niveles de residuos detectados. También se ha detectado acumulación de HCH en aves marinas, peces, tortugas, lagartos, osos polares, cetáceos, etc. (Willett y col., 1998). La presencia de HCH puede ser un indicio de la fuente de contaminación y de la formulación de HCH y/o lindano utilizado. De hecho, las variaciones espaciales y temporales de los isómeros de HCH detectados generalmente en mayor concentración ( $\alpha$ -, y  $\beta$ -HCH), en la atmósfera y agua del océano Ártico se reflejan en la biota (Li y Macdonald, 2005).

### 1.3. REGULACIÓN LEGAL DE LOS CONTAMINANTES ORGÁNICOS

A nivel mundial, la fabricación y el uso del lindano y el HCH técnico han sido legislados desde los años 70. En un principio la tendencia fue a restringir severamente o prohibir el uso del HCH técnico (Directiva 79/117/CEE<sup>1</sup>; Li, 1999). El lindano fue reemplazando al HCH técnico en Canadá, Estados Unidos y Europa Occidental a finales de la década de 1970 y comienzos de la década de 1980, mientras que en países como China e India empezó a utilizarse en 1991 (Li y Vijgen, 2006). El lindano se utiliza todavía, pero de modo restringido en muchos lugares (Figura 1.10).

La legislación y las políticas sobre plaguicidas introducidas por primera vez en la Unión Europea en 1979, han evolucionando considerablemente con el paso de los años, culminando en dos directivas que obligan a que todos los plaguicidas se sometan a una evaluación y autorización para poder ser comercializados (Figura 1.11) (91/414/CEE<sup>2</sup>; 98/8/CE<sup>3</sup>). Estas directivas son el marco de partida de la Estrategia Temática sobre el Uso Sostenible de los Plaguicidas (COM(2006)372 final<sup>4</sup>), elaborada en el marco del VI Programa de Medio Ambiente del Consejo y el Parlamento Europeos para el período 2002-2012.

---

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.

<sup>3</sup> Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de febrero de 1998, relativa a la comercialización de biocidas.

<sup>4</sup> COM(2006) 372 final, de 12 de julio de 2006, Comunicado de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo, al Comité Europeo Económico y Social y al Comité de las Regiones, una Estrategia Temática del Uso Sostenible de los Plaguicidas.



**Figura 1.10.** Situación actual de la legislación internacional del HCH y el lindano. Fuentes: NARAP-PARNA-PARAN, [http://www.cec.org/programs\\_projects/pollutants\\_health/smoc/lindane.cfm](http://www.cec.org/programs_projects/pollutants_health/smoc/lindane.cfm); Lindane Education and Research Network, <http://www.headlice.org/lindane/index.htm>.

En el marco de la Directiva 91/414/CEE, sobre los productos de protección de las plantas, actualizada en enero de 2008, se considera al **lindano** como una sustancia insecticida y rodenticida que no se debe incluir en el anexo I de dicha directiva, con lo cual su uso no está autorizado en la Unión Europea (Decisión 2000/801/CE<sup>5</sup>). Por su parte, se considera que el **HCH** (sin especificar nada más) no es una sustancia que esté en el ámbito de la citada directiva, dado que ya se encontraba prohibida (Directiva 79/117/CEE). Asimismo, existe un Reglamento a nivel europeo que establece los Límites Máximos de Residuos (LMR) de diversas sustancias activas (entre ellas los isómeros de HCH y el HCH) en alimentos y piensos con el objetivo de limitar la exposición de los consumidores al final de la cadena alimenticia que inician los cultivos (Reglamento CE nº 396/2005<sup>6</sup>) (Tabla 1.5). El cumplimiento de los LMR permite evaluar en qué grado se aplican correctamente las buenas prácticas agrarias establecidas en las autorizaciones de productos fitosanitarios concedidas por los Estados miembros de la UE. Estos límites generales incluyen los isómeros por separado ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HCH) así como el del HCH, definido como la suma de todos los isómeros excepto el isómero gamma.

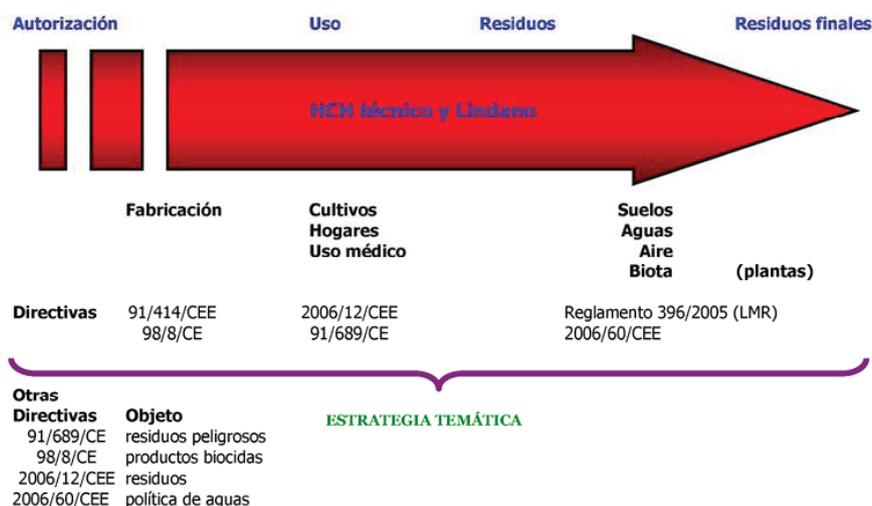
Se dispone también de una Estrategia Temática sobre la Calidad del Suelo a nivel europeo (COM(2006)232 final<sup>7</sup>), que trata diversos temas relacionados con el medio edáfico en Europa, incluyendo la **contaminación**. Describe la situación actual y las posibles medidas de recuperación; respecto a la

<sup>5</sup> Decisión (2000/801/CE) de la Comisión de 20 de diciembre de 2000 relativa a la no inclusión del lindano en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo y a la retirada de las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan esta sustancia activa.

<sup>6</sup> Reglamento (CE) nº 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 del Consejo.

<sup>7</sup> COM(2006) 232 final, de 22 de septiembre de 2006, Propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establece un marco para la protección del suelo y se modifica la Directiva 2004/35/CE.

contaminación por plaguicidas, presta una especial atención a la contaminación por entrada difusa en suelos agrícolas (abuso de plaguicidas) que afecta al suelo, cultivos y aguas (van Camp y col., 2004).



**Figura 1.11.** Desarrollo de la Estrategia Temática de Uso de Plaguicidas.

En **España**, en 1998 se adopta la Ley 10/98<sup>8</sup>, que impone una serie de obligaciones en lo que se refiere a la definición de criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. Para el cumplimiento de dicha Ley, se promulgó el Real Decreto 9/2005<sup>9</sup>, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares que la Ley tiene en cuenta. El criterio general que se aplica es la valoración de los riesgos ligados a la existencia de contaminantes en suelos, regulando los **Niveles Genéricos de Referencia** (NGR). Este parámetro pretende evaluar la contaminación del suelo (por sustancias orgánicas e inorgánicas) en razón de la peligrosidad que representan para el ser humano y los ecosistemas. El Real Decreto recoge los **Niveles Genéricos de Referencia** para tres isómeros de HCH ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -HCH), tanto como riesgo para la salud humana (en función del tipo de **uso del suelo**) como riesgo para la salud de los ecosistemas (considerando, entre otros parámetros, la acumulación en **plantas** como parte de los organismos del suelo) (Tabla 1.5) (anexos V y VI; RD 9/2005). En ningún momento se considera el HCH técnico (la mezcla de isómeros de HCH) ni el isómero  $\delta$ -HCH, si bien es una lista provisional.

Finalmente, en **Galicia** existe una legislación particular para suelos afectados por vertidos de residuos de HCH (Decreto 263/1999<sup>10</sup>) que permite, con carácter general, la intervención en el caso de suelos que sobrepasen los 2 mg kg<sup>-1</sup> de concentración de HCH total (definido como suma de  $\alpha$ + $\beta$ + $\gamma$ -HCH), sea cual sea el uso (**concentración límite**) (Tabla 1.5).

<sup>8</sup> Ley 10/98, de 21 de abril, de Residuos.

<sup>9</sup> Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

<sup>10</sup> Decreto 263/1999, do 30 de setembro, polo que se fixa a concentración límite en solos afectados por vertidos de residuos de HCH. Corrección de erros (29 outubro) Decreto 263/1999, do 30 de setembro, polo que se fixa a concentración límite en solos afectados por vertidos de residuos de HCH.

## Introducción General

**Tabla 1.5.** Niveles de referencia que regulan las concentraciones de los diferentes isómeros de HCH en suelos, plantas y otros organismos.

<b>NORMATIVA</b>						
<b>Límites Máximos de Residuos en alimentos</b> (Reglamento CE 396/2005)	<b>Detalles</b>	<b>α-HCH</b>	<b>β-HCH</b>	<b>γ-HCH</b>	<b>δ-HCH</b>	<b>HCH<sup>1</sup></b>
				(mg kg <sup>-1</sup> )		
Fruta fresca	Anexo II	-	-	0.010	-	0.010
Verduras frescas o congeladas		-	-	0.010	-	0.010
Legumbres secas		-	-	0.010	-	0.010
Cereales		-	-	0.020	-	0.010
Productos de origen animal		0.200	0.100	0.020	-	-
Especcias	Anexo IIIb	-	-	0.500	-	0.020
Animales de granja		0.200	0.100	0.020	-	-
Miel		-	-	0.010	-	-
<b>Niveles Genéricos de Referencia en suelos</b> (RD 9/2005)		<b>α-HCH</b>	<b>β-HCH</b>	<b>γ-HCH</b>	<b>δ-HCH</b>	<b>-</b>
				(mg kg <sup>-1</sup> )		
Protección de la salud humana						
	Uso industrial	1	1	1	-	-
	uso urbano	0.1	0.1	0.1	-	-
	Otros usos	0.01	0.01	0.01	-	-
Protección de los ecosistemas						
	Organismos del suelo	-	-	0.01	-	-
	Organismos acuáticos	0.25	0.38	0.01	-	-
	Vertebrados terrestres	0.05	0.05	0.23	-	-
<b>Concentración límite en suelos</b> (Decreto 263/1999)		<b>α-HCH</b>	<b>β-HCH</b>	<b>γ-HCH</b>	<b>δ-HCH</b>	<b>HCH<sup>2</sup></b>
				(mg kg <sup>-1</sup> )		
		-	-	-	-	2

<sup>1</sup> HCH: hexaclorociclohexano, suma de todos los isómeros excepto γ-HCH; <sup>2</sup> HCH: suma de los isómeros α-, β- y γ-HCH.

Algunos pesticidas, entre ellos el HCH y el lindano, son considerados **Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs)**, por lo que hay que tener en cuenta también la legislación aplicable a este grupo de contaminantes. Los COP son compuestos de características particulares, pues: (i) son persistentes y pueden permanecer inalterados durante años o décadas en el medio y en los tejidos de los organismos, (ii) son liposolubles y al disolverse mejor en grasas que en agua se acumulan en los organismos desde el medio y a lo largo de las redes tróficas, (iii) son volátiles, lo que combinado con su persistencia hace posible el transporte atmosférico y marino a grandes distancias en ciclos sucesivos de depósito-reemisión y se localizan en regiones muy alejadas de las fuentes (contaminación transfronteriza), y (iv) son altamente tóxicas y pueden provocar graves efectos sobre la salud humana y el medio ambiente.

La combinación de estas características hace que de entre todas las sustancias químicas los COP presenten un riesgo especialmente preocupante y suponen una amenaza para la salud humana y el medio ambiente a escala global. La Comunidad Internacional ha alcanzado acuerdos importantes en la regulación y control de los COPs. El más ambicioso es el **Convenio de Estocolmo**, cuyo objetivo es proteger la salud humana y el medio ambiente frente a los COPs, eliminando, y cuando esto no sea posible reduciendo, estos

contaminantes (PNUMA, 2005<sup>11</sup>). El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, en el marco del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), se firmó en mayo de 2001 y entró en vigor el 17 de mayo de 2004. El Convenio es un instrumento internacional jurídicamente vinculante que establece la prohibición de algunos COPs, las restricciones al uso de otros y las medidas a tomar para minimizar las emisiones. En un principio se reconocieron doce sustancias como COPs, la "docena sucia": aldrina, bifenilos policlorados (PCBs), clordano, DDT, dieldrina, dioxinas, endrina, furanos, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex y toxafeno. No obstante, con el tiempo pueden añadirse más compuestos. La Unión Europea (UE), por su parte, ha ratificado también este convenio. El 20 de mayo de 2004 entró en vigor en todos los países de la UE el Reglamento 850/2004<sup>12</sup> sobre COP, que tiene por objeto establecer un marco jurídico común para llevar a efecto las principales disposiciones del Convenio de Estocolmo y del Protocolo de Aarhus sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (UNECE, 1998<sup>13</sup>). Así pues, el conjunto de sustancias denominadas COPs es amplio, incluyendo al lindano, e intenta integrar los dos documentos en un marco común. El Reglamento intenta, asimismo, asegurar la coordinación y la coherencia al aplicar, a nivel de la UE, las disposiciones de otros convenios internacionales en el marco de las Naciones Unidas.

La reglamentación europea implica la adopción, en España, de un **Plan específico sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes**<sup>14</sup>. Este documento establece una reglamentación exhaustiva, tocando aspectos como las **exenciones de uso** del HCH (incluido el isómero gamma), que puede ser autorizado en aplicaciones específicas: tratamiento correctivo profesional e industrial de árboles talados, madera y troncos; aplicaciones industriales y domésticas en interiores (hasta el 1 de septiembre de 2006). En el caso de uso como insecticida tópico veterinario y para la salud pública (sustancias que posean >99%  $\gamma$ -HCH, es decir, lindano), hasta el 31 de diciembre de 2007. Por otro lado, se indica que en España, actualmente, no hay **producción** de lindano. En el campo de biocidas y utilización veterinaria, España importa una cantidad anual que se estima en 4 toneladas. Según la información facilitada por el Ministerio del Medio Ambiente, los usos históricos del lindano como producto fitosanitario en España han sido sustituidos de forma satisfactoria por otros productos insecticidas y acaricidas autorizados o bien sustancias activas, incluso en el tratamiento de ectoparásitos (p. ej., piojos). El Plan incluye un **inventario de emplazamientos contaminados**. Las acumulaciones históricas en vertederos incontrolados o los suelos contaminados pueden ser interpretados como "existencias" de COPs y por consiguiente están sujetas a registro. Estos datos, a fecha de hoy, aún no se han completado. Respecto a los residuos de fabricación de lindano, se tiene conocimiento de la problemática histórica en el País Vasco, donde se localizaron numerosos focos de contaminación de suelos, algunos ya saneados (Quintana, 1997). En Aragón, entre los años 1975 y 1989 hubo producción de lindano en la zona de Sabiñánigo (Huesca). Esta actividad generó unas 100.000 toneladas de residuos que, en su mayoría, se depositaron en vertederos próximos al centro de producción (Hernández y col., 1991). En este apartado, al parecer, no se considera el episodio de contaminación por vertido de residuos de la fabricación de lindano detectado en Galicia (Eptisa, 1999).

---

<sup>11</sup> PNUMA. 2005. Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Ginebra.

<sup>12</sup> Reglamento 850/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CE.

<sup>13</sup> UNECE, 1998. Protocolo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs). United Nations Economic Commission for Europe. Aarhus.

<sup>14</sup> Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y el Reglamento 850/2004, sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Ministerio de Medio Ambiente, 2007.

[http://www.mma.es/secciones/calidad\\_contaminacion/quimicos/pops/pdf/pnestocolmofinal\\_31enero2007.pdf](http://www.mma.es/secciones/calidad_contaminacion/quimicos/pops/pdf/pnestocolmofinal_31enero2007.pdf)

### 1.4. TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS POR COMPUESTOS ORGÁNICOS

Los procesos utilizados en la eliminación de la contaminación en los suelos pueden ser de carácter físico, químico o biológico, o una combinación de los tres. La aplicación de estos tratamientos puede ser de maneras diferentes (Monterroso Martínez, 2006): *in situ*, si el contaminante es eliminado en el mismo lugar en el que se encuentra; *on site*, si el suelo es excavado y tratado en el mismo terreno; *off site* o *ex situ*, cuando el suelo es excavado, transportado y tratado en otro lugar. Estas distinciones han generado una cantidad de técnicas aplicables a situaciones similares. La elección de la técnica más adecuada debe estar basada en un estudio del caso particular de la contaminación, constituyendo un compromiso entre la velocidad y certidumbre de alcanzar los niveles objetivos de limpieza, por un lado, y el coste y alteración de las propiedades del suelo, por otro. Se puede hablar de técnicas de aislamiento y técnicas de descontaminación. Las **técnicas de aislamiento** pretenden reducir la movilidad de los contaminantes, al crear una barrera física que impida el contacto del agua con el contaminante. Entre estas técnicas se incluye la construcción de celdas de aislamiento, la estabilización del suelo (solidificación, vitrificación del contaminante) o el bombeo de aguas contaminadas. Por otro lado, las **técnicas de descontaminación** pretenden eliminar o reducir la concentración de los contaminantes del suelo, de modo que sea posible una reutilización del mismo. Entre la amplia variedad de tratamientos de este tipo se encuentran los tratamientos térmicos, el lavado de suelos, la aireación/volatilización pasiva, la descontaminación electrocinética, o el arrastre por aire o vapor. Para muchos suelos contaminados hay una alternativa biológica a las técnicas de limpieza físicoquímicas. Se trata de utilizar la acción de microorganismos y plantas para eliminar, degradar o inmovilizar los contaminantes: biocorrección o biolimpieza. A menudo, estas técnicas se utilizan en combinación con técnicas físicoquímicas. La biocorrección es especialmente adecuada para limpiar grandes superficies con un nivel de contaminación lo suficientemente bajo como para no limitar el desarrollo biológico.

Para reducir la contaminación de suelos afectados por presencia de HCH, bien sea suelos agrícolas, bien sean vertederos incontrolados, hay dos tipos de acciones: (i) retirada o destrucción/conversión del HCH del suelo; (ii) aislamiento o inmovilización del HCH en el lugar afectado (Swannell, 1993; Rulkens y col., 1997). No obstante, no existe una técnica universal de aplicación efectiva para cualquier caso. En cada situación concreta es necesaria la realización de rigurosos estudios de viabilidad, tanto ensayos en laboratorio (en condiciones óptimas de control) como experiencias en campo (sujetas a gran variabilidad). Los resultados van a depender en gran medida de la naturaleza del tratamiento, del tipo de compuesto presente y de las características físicoquímicas, mineralógicas y biológicas de los suelos afectados. Se debe tener en cuenta multitud de factores adicionales de gran relevancia, como el volumen de suelo a tratar, la profundidad de la contaminación, las condiciones ambientales, el tipo de suelo que se trate, los objetivos marcados para la recuperación, el coste, la viabilidad, etc. (Tabla 1.6) (Rulkens, 1993).

**Tabla 1.6.** Alternativas de recuperación de suelos contaminados por vertidos de HCH o residuos asociados a la producción y comercialización de HCH técnico y Lindano (modificado de Rulkens, 1993; Rulkens y col., 1997).

Factores de relevancia	Opciones de Tratamiento		
	"Hot spots" (contaminación extrema)	Fuerte contaminación	Contaminación difusa
i) Cómo se ha contaminado el suelo  depósito de un residuo sólido de HCH y basuras aplicación directa transformación de HCH lavado del HCH desde la parte superior	Lugares de peligro; No hay tratamiento <i>in situ</i>	Grandes extensiones; contaminación alta	contaminación leve; distribución difusa
ii) Tipo de suelo implicado  suelos arenosos  suelos arcillosos  cantidad y tipo de materia orgánica en el suelo	<b>Tratamiento térmico</b> <b>Extracción con agentes acuosos</b> <b>Extracción con agentes orgánicos</b> <b>Extracción supercrítica (CO<sub>2</sub>)</b> <b>Limpieza química del suelo excavado</b> Deshalogenación	<b>i) suelo excavado (<i>ex situ</i>)</b> <b>Tratamiento biológico</b>  Biorreactores  Compostaje  Landfarming  Tratamiento microbiológico	<b>Uso de plantas</b>  Fitocorrección  <b>Uso de microorganismos</b>  Biorremediación
iii) Propiedades de los isómeros de HCH solubilidad (agua, disolventes orgánicos) características de adsorción y absorción (suelos, plantas): estabilidad química/térmica Volatilidad/biodegradación	Oxidación con aire húmedo	<b>Tratamiento Físico-Químico</b> <b>ii) tratamiento <i>in situ</i></b>  <b>Extracción <i>in situ</i></b>  <b>Biorrecuperación</b>	<b>Mejora de la actividad biótica</b>  de plantas  de microorganismos

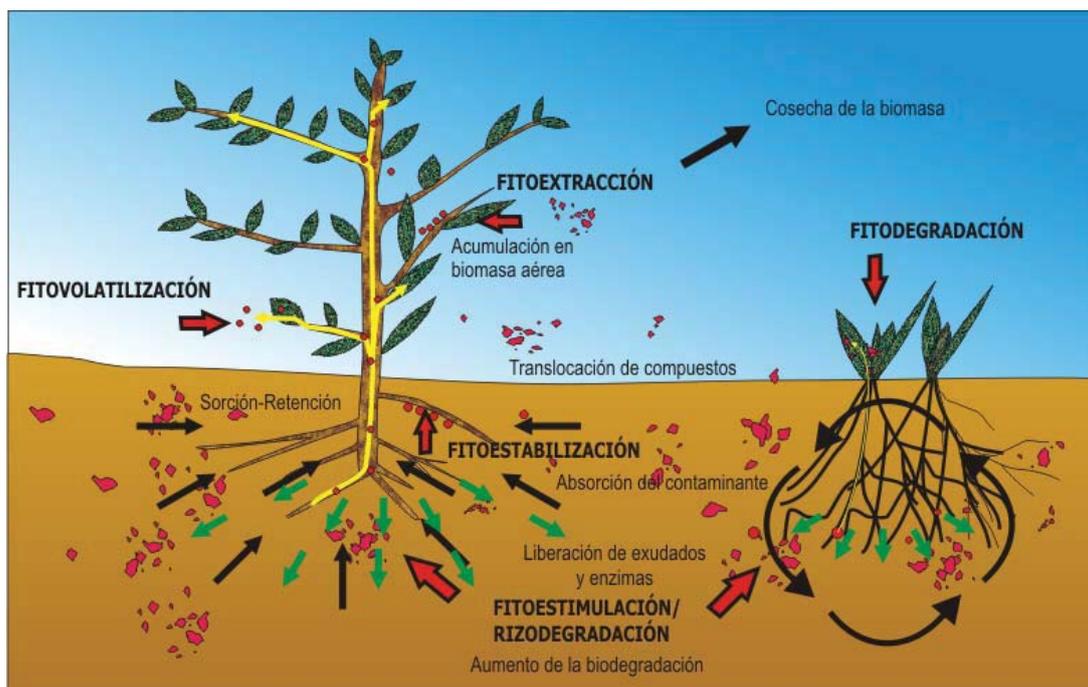
#### 1.4.1. Fitocorrección

La fitocorrección es una técnica de biocorrección atractiva para la limpieza de suelos contaminados. Se basa en la utilización de la vegetación para el tratamiento *in situ* de suelos y sedimentos contaminados (Schnoor y col., 1995; Salt y col., 1998; Pilon-Smits, 2005). Esta tecnología se ha consolidado en los últimos años. La fitocorrección aprovecha los procesos biológicos vegetales, así como las características físicas de las plantas para mejorar la limpieza de suelos (Pivetz, 2001). A lo largo de los años, esta técnica ha sido conocida con diversas denominaciones: corrección verde, corrección botánica, agrocorrección, corrección vegetal. El término fitocorrección como denominación de una tecnología independiente se menciona desde 1994 en la literatura técnica (Schnoor, 2002). Normalmente, los suelos con vegetación presentaban una mayor desaparición de los contaminantes implicados en comparación con las áreas no vegetadas (Salt y col., 1998). Actualmente, se define fitocorrección como el "uso de las plantas y sus microorganismos asociados para la limpieza del medio en la que se aprovechan los procesos vegetales y microbianos para degradar y retener contaminantes orgánicos e inorgánicos" (Pilon-Smits, 2005). La fitocorrección se utiliza para la limpieza de suelos afectados tanto por **contaminantes inorgánicos** (metales y metaloides), como por **contaminantes orgánicos** (gasolinas, disolventes, pesticidas, explosivos, etc.) (McGrath y col., 2002; McCutcheon y Schnoor, 2003; Díez Lázaro y col., 2006;).

La fitocorrección aporta la integración de la biología de la conservación y de la necesidad de una rápida recuperación de los ecosistemas naturales afectados por los cambios antropogénicos (Karthikeyan y col., 2004). Las plantas deben sobrevivir a la presencia de residuos peligrosos. Las sustancias como el HCH pueden tener un impacto relevante en todos los organismos del medio afectado. La vegetación puede mostrar una **toxicidad** que modifique los diferentes procesos vitales, afectando al desarrollo normal y a la fisiología (procesos celulares, fotosíntesis, distribución de biomasa, etc; Newman y Unger, 2003; Medina y col., 2003). Las plantas son organismos que han desarrollado un conjunto de respuestas defensivas, en función de la duración e intensidad del factor negativo que provoca el daño (el contaminante), aunque también de la especie vegetal y del estado de desarrollo. Durante las fases iniciales de rápido crecimiento, la respuesta al **estrés** implica una gran actividad de procesos de reparación. (Larcher, 2003; Potters y col., 2007). En este sentido, la **tolerancia** puede relacionarse con un conjunto de respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que disminuyen la exposición al estrés, limitan el daño o facilitan la reparación de los sistemas afectados (Litchenthaler, 1998). Se supone que tales respuestas morfogenéticas son parte de una estrategia general de aclimatación. El desarrollo de las distintas técnicas de fitocorrección requiere un conocimiento completo de los procesos subyacentes en niveles tan diversos como el genético, molecular, bioquímico, fisiológico y agronómico (Krämer, 2005).

La fitocorrección comprende una serie de técnicas, cuya definición se ha ido configurando con el paso del tiempo (Salt y col., 1998; Pivetz, 2001; McCutcheon y Schnoor, 2003; Pilon-Smits, 2005) (Figura 1.12). Actualmente se reconocen, principalmente, las siguientes: fitoextracción, fitoestabilización, fitoestimulación (rizodegradación), fitodegradación y fitovolatilización; otras tecnologías a considerar son: rizofiltración, construcción de marismas artificiales, control hidráulico y formación de tapetes vegetales. Las técnicas de fitocorrección más importantes aplicables a contaminantes orgánicos se definen como (Pilon-Smits, 2005):

- ✓ **Fitoextracción:** eliminación del contaminante del suelo y acumulación en el tejido vegetal, seguido de la retirada de la planta (tejidos aéreos; cosecha); este material puede, con posterioridad, ser quemado o depositado en condiciones seguras.
- ✓ **Fitoestabilización:** fijación de los contaminantes en los suelos a través de la actividad de las plantas, bien sea a través del control de la erosión y el lavado o bien actuando sobre el contaminante de modo que este no sea biodisponible (a través de una precipitación en la rizosfera, por ejemplo).
- ✓ **Fitoestimulación (o rizodegradación):** las plantas facilitan la destrucción del contaminante orgánico a través de la actividad microbiana en la rizosfera.
- ✓ **Fitodegradación:** esta técnica conlleva la destrucción directa del contaminante por parte de la planta, gracias a la actividad enzimática propia.
- ✓ **Fitovolatilización:** implica la absorción del contaminante, su transporte a la parte aérea de la planta y la liberación como una forma volátil del compuesto original.



**Figura 1.12.** Técnicas de fitocorrección; actuación sobre el contaminante (estabilización, degradación, volatilización) y compartimentos en los que tiene lugar la limpieza (suelo, rizosfera, tejido vegetal).

El uso de estas técnicas no es excluyente en ningún caso, es decir, deben combinarse para que el proceso de limpieza sea lo más eficaz posible. Además, las zonas de contaminación tienden a la autolimpieza cuando la vegetación está presente, sin ningún tipo de intervención humana. Esto podría verse como la expresión más sencilla de la fitocorrección, que implicaría solo el seguimiento de las condiciones de la zona afectada, y se denomina "atenuación natural" (Pilon-Smits, 2005).

#### 1.4.2. Mecanismos y procesos vegetales en los que se basa la fitocorrección

La mejora de la **actividad fisiológica** de las plantas (absorción de agua y compuestos químicos, metabolismo en las células vegetales, liberación natural de exudados, impacto físico y bioquímico en el entorno circundante) es un paso clave en la fitocorrección. El crecimiento de las plantas depende de la fotosíntesis y su regulación, transformando agua ( $H_2O$ ) y dióxido de carbono ( $CO_2$ ) en hidratos de carbono y oxígeno ( $O_2$ ) utilizando de modo fundamental la energía solar. Las raíces, por su parte, presentan una gran efectividad en el proceso de extracción de agua del suelo, y el posterior transporte a las partes aéreas del vegetal vía xilema. La transpiración que ocurre a través de los estomas es el motor de la absorción de agua. En los estomas, además, la planta intercambia los gases (introduce  $CO_2$  y libera  $O_2$ ). El catabolismo de los carbohidratos y otros compuestos durante el metabolismo de las células vegetales necesita  $O_2$  produce energía como ATP, necesario, por ejemplo, a nivel de las raíces para el transporte activo de nutrientes. La difusión y advección del oxígeno en el suelo es necesaria para una prolongada supervivencia de las plantas. Por otro lado, es importante cubrir los requerimientos de nutrición básicos de los vegetales que se utilicen. Las plantas requieren macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) y micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe,

Mn, Mo, Zn). La ausencia de clorofila, pigmento fotosintético por excelencia, debida a una situación de estrés de la planta o bien a una deficiencia en nutrientes es un grave problema que puede conducir a la clorosis de las hojas.

Las plantas modifican de modo decisivo el entorno **físico** en el que viven, mejorando la estabilidad del suelo y contrarrestando la erosión hídrica (Davis y col., 2002). Los agregados del suelo se rompen a medida que las raíces crecen y empujan el material circundante, mezclándolo y facilitando la aireación. Las raíces en descomposición pueden crear macroporos en los suelos que facilitan el transporte de agua, gases y los propios contaminantes a través de suelo, modificando la humedad. A través de la incorporación de materia orgánica, facilitada por la presencia de vegetación, las condiciones generales del suelo mejoran. Asimismo, los exudados de las plantas (restos del metabolismo secundario: Pinton y col., 2001) actúan sobre las condiciones físicoquímicas de los suelos del entorno radicular, modificando el pH, la especiación, biodisponibilidad y absorción de metales y compuestos orgánicos, etc (Marschner, 2003).

Schnoor y colaboradores reconocieron inicialmente varios mecanismos por los cuales las plantas pueden llevar a cabo la descontaminación-limpieza de los suelos y sedimentos contaminados (Schnoor y col., 1995): **sorción - absorción** de los contaminantes, seguido de una acumulación de metabolitos no tóxicos en los tejidos vegetales; **liberación de exudados radicales y enzimas**, encargados de la estimulación de la actividad microbiana y las transformaciones bioquímicas de los compuestos orgánicos; e **incremento en la mineralización en la rizosfera** (suelo cercano a la raíz), atribuida tanto a los hongos micorrízicos como a los consorcios microbianos:

✓ **Sorción** en los tejidos vegetales. Los tejidos de las plantas son considerados como bioadsorbentes, al acumular contaminantes, ya sea en las partes vivas del vegetal como en sus restos (Arthur y col., 2005). En función del valor de  $\text{Log } K_{ow}$ , puede ocurrir adsorción y reparto agua:planta, con una retención en la superficie de las raíces ( $\text{Log } K_{ow} > 3$ ; es el caso del HCH) (Schnoor y col., 1995). Los compuestos muy hidrofóbicos son candidatos para una fitoestabilización y/o biorremediación en la rizosfera debido a sus largos tiempos de residencia en la zona radical (Dietz y Schnoor, 2001).

✓ **Absorción** directa. Si el valor de  $\text{Log } K_{ow}$  es intermedio ( $\text{Log } K_{ow} 0.5-3$ ), el contaminante puede ser absorbido a nivel radicular y a continuación ser transportado activamente a través de las membranas (Schnoor y col., 1995). Una vez que el contaminante es tomado por la planta, puede ser almacenado (o bien sus metabolitos) en nuevas estructuras de la planta vía su introducción en el proceso de lignificación. En caso de ser transportado hacia las partes aéreas, podría eliminarse mediante volatilización a partir de los tejidos aéreos. En algunos casos es posible mineralizar el compuesto químico completamente, obteniendo energía para el crecimiento, agua y dióxido de carbono. Se produce una detoxificación si el compuesto químico inicial se metaboliza en sustancias no fitotóxicas, siendo posible que se almacenen en diferentes tejidos vegetales. Una vez en el interior de la planta, el contaminante, al transformarse, lo hace a través de un proceso que se conoce como **"Modelo de Hígado Verde"** (Green Liver Model), por su parecido con las transformaciones que ocurren en el metabolismo animal (Dietz y Schnoor, 2001; Schnoor 2002; Burken, 2003). Existe una cierta similitud entre los complejos enzimáticos animales y vegetales encargados de la destrucción de

moléculas tóxicas (citocromo P450 y glutation-S-Transferasas, por ejemplo), así como las dehalogenasas (Wolfe y Hoehamer, 2003). Muy brevemente, durante la **Fase I** se metabolizan los compuestos xenobióticos, introduciéndose grupos funcionales (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH), mediante diversas reacciones (oxidación, reducción, hidrólisis). En el caso de compuestos muy hidrofóbicos, la reacción característica es la oxigenación, lo que aumenta la solubilidad del contaminante. Las enzimas vegetales típicas que caracterizan esta fase son las monooxigenasas citocromo P450 y las carboxilesterasas. La **Fase II** requiere la conjugación con alguna molécula (D-glucosa, glutatión, amino ácidos) para obtener un compuesto más polar, soluble. También se han descritos conjugados insolubles relacionados con las paredes celulares, formados por la actuación de reacciones no selectivas típicas de la síntesis de lignina o bien una reacción más selectiva que acaba introduciendo el contaminante en la hemicelulosa. Esto es lo que normalmente se conoce como un residuo enlazado (Sandermann, 2004). Las enzimas conocidas que actúan en el caso de contaminantes orgánicos son las glutation-S-transferasas, O-, y N-glucosiltransferasas y las maloniltransferasas. Finalmente, la **Fase III** es la compartimentación del residuo modificado y su almacenamiento. Los metabolitos son almacenados en las vacuolas o bien como parte del material constituyente de la pared celular.

✓ **Liberación de exudados y enzimas:** (fitocorrección *ex planta*) (Bollag, 1992). Por lo general, las plantas terrestres producen una gran cantidad de moléculas durante el crecimiento de las raíces, desde polisacáridos que facilitan la penetración en el suelo hasta enzimas importantes en la adquisición de nutrientes (en total, hasta un 10-20% del conjunto de fotosintatos: azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos; Pinton y col., 2001; Davis y col., 2002). Es factible que estos compuestos puedan contribuir a la degradación de los contaminantes orgánicos. Las reacciones de las enzimas liberadas por las plantas se han investigado en suelos, sedimentos, sistemas de exudación, etc (Wolfe y Hoehamer, 2003; Bhatt y col., 2007). Al trabajar con las enzimas aisladas, se ha encontrado una rápida transformación de sustratos contaminados con TNT, por ejemplo; no obstante, no se descarta que este proceso requiera una actividad vegetal completa.

✓ Aumento de la **mineralización** en la rizosfera. Los contaminantes orgánicos pueden ser metabolizados por bacterias, si bien en numerosas ocasiones de un modo muy lento y poco eficiente debido, generalmente, a la escasa presencia de los microorganismos implicados (Glick, 2003). La actividad de las plantas puede aportar nutrientes y energía en el entorno radicular, proporcionando un ambiente idóneo para el crecimiento de las poblaciones de microorganismos y aumentando el proceso de degradación (**efecto rizosfera**; Anderson y col., 1993; Mackova y col., 2006; Kidd y col., 2008). La raíz favorece y estimula las reacciones bacterianas y el aumento del carbono en las comunidades de la rizosfera con respecto a las del suelo próximo. A esto también contribuye el reciclado de los restos vegetales en descomposición en el entorno de las raíces, aumentando el contenido de carbono y la actividad metabólica en esta región del suelo. Con todo esto, las tasas de mineralización mejoran. Asimismo, las plantas bombean oxígeno hacia las raíces, que asegura que las transformaciones aeróbicas puedan tener lugar. Por otro lado, las plantas son capaces de asociarse con hongos micorrízicos, que pueden intervenir en el metabolismo de compuestos orgánicos, incluido el HCH (Quintero Díaz, 2004). Estos hongos crecen en asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas y poseen rutas enzimáticas propias que ayudan en la degradación de compuestos xenobióticos.

### 1.4.3. Aspectos prácticos de la fitocorrección

La fitocorrección presenta una serie de **ventajas** en su uso para la limpieza de un suelo contaminado. El principal atractivo de esta técnica de descontaminación de suelos radica en su bajo coste (en comparación con técnicas de tipo fisicoquímico) y sus ventajas estéticas, al trabajar con vegetación en muchos casos natural de las zonas afectadas; además el manejo asequible de suelo y planta permiten su actuación durante largos períodos de tiempo (Dietz y Schnoor, 2001). Además, la facilidad de muestreo y seguimiento de muchas características (crecimiento, fotosíntesis, biomasa), facilita la evaluación sencilla de la evolución de la zona afectada. Asimismo, es una técnica de aplicación *in situ* que no provoca la degradación de las propiedades edáficas, siendo posible la recuperación de los usos previos al episodio de contaminación. A corto plazo, el éxito y la eficiencia de la fitocorrección se debe a una adecuada selección de las variedades vegetales más eficientes, las enmiendas del suelo adecuadas y la optimización de prácticas agrícolas para mejorar el rendimiento de las plantas seleccionadas. A largo plazo, no obstante, las mejoras en el campo de la fitocorrección se relacionaran con el aislamiento de genes vegetales y bacterianos (incluyendo la rizofera y su rica comunidad microbiana) que puedan aumentar la degradación de los compuestos orgánicos (Salt y col., 1998). Un aspecto de gran interés en el estudio de la fitocorrección de orgánicos es la posibilidad de desarrollar plantas modificadas genéticamente que absorban y degraden un único tipo de contaminante (Arthur y col., 2005).

A pesar de las ventajas descritas, también se debe tener en cuenta que hay **riesgos** asociados al uso de plantas en la limpieza de suelos. Existe la posibilidad de introducir el contaminante o sus metabolitos en la cadena trófica, con el consiguiente riesgo hacia la salud humana (Sinclair y Boxall, 2003). Adicionalmente, la escala temporal para la recuperación de niveles de contaminación tolerables para la legislación vigente puede ser muy larga, así como los problemas de toxicidad que las plantas y otros organismos pueden presentar con el transcurso del tiempo, impidiendo de este modo el asentamiento de muchas especies vegetales *a priori* muy útiles. Otro inconveniente deriva del hecho de que el límite práctico de la fitocorrección se establece en el volumen de suelo que las raíces son capaces de explorar, con lo que una contaminación muy profunda sería difícil de limpiar.

Otros aspectos a tener en cuenta son las características asociadas a las raíces de las plantas investigadas, cobrando gran importancia parámetros como la **morfología** y **biomasa** de las raíces. Los sistemas radicales fibrosos (herbáceas, por ejemplo) con numerosas raíces finas se expanden en una amplia zona del suelo, proporcionando una enorme área de contacto de la raíz con la zona afectada. En este sentido, las especies arbóreas son muy utilizadas debido a sus grandes, extensos y profundos sistemas radicales, así como a su gran capacidad de bombeo de agua freática (*Salix* sp.; *Populus* sp.; Larsen y col., 2005). Las plantas herbáceas, por ejemplo, deben limitarse a situaciones de contaminación superficial. En todo caso, la longitud de las raíces está muy influenciada por el tipo de planta y las condiciones locales (profundidad de la capa freática, contenido en humedad, estructura del suelo, fertilidad, presión agrícola, concentración del contaminante). Se permite así una mayor acumulación del contaminante, una tasa de transpiración elevada, una mayor asimilación y metabolismo (si ello es posible), y liberación de mayor cantidad de exudados y enzimas en el suelo. Dependiendo de las situaciones particulares de contaminación o bien de las plantas escogidas en un principio, otros factores pueden cobrar importancia. Así, un

crecimiento rápido y óptimo en lugares de alta contaminación puede ser esencial para acortar el tiempo de recuperación del suelo (Karthikeyan y col., 2004).

En los estudios de fitocorrección se ha utilizado un amplio número de especies vegetales. Con el tiempo se ha desarrollado una base de datos de experiencias de fitocorrección y plantas utilizadas (Fletcher y col., 1988; EPA, 2008). No obstante, esto sólo abarca un limitado número de grupos y especies, en función de características como distribución geográfica, disponibilidad, crecimiento óptimo, amplio conocimiento básico sobre la planta, así como la facilidad de ésta para el desarrollo en la región afectada (Pivetz, 2001). Una cuidadosa **selección** de las plantas es fundamental para asegurar tanto que la planta es adecuada en las condiciones de clima y el suelo locales, como que la eficiencia del proceso de fitocorrección sea óptima. Las plantas terrestres son más utilizadas que las plantas acuáticas a causa del tamaño de sus raíces. Dependiendo de las situaciones, se ha de escoger entre plantas leñosas (lento crecimiento, gran biomasa, gran exploración y explotación del suelo) o bien herbáceas (rápido crecimiento, gran adaptación a situaciones de estrés, posibilidad de cosechas sucesivas). Otras consideraciones inciden en el uso de anuales o perennes o bien monocultivos o varias especies al tiempo. Las semillas de las plantas a utilizar deberían estar adaptadas a las condiciones locales y además mostrar una alta germinación y viabilidad en lugares contaminados para asegurar el establecimiento de las poblaciones.

Cabe decir que la utilización de técnicas de fitocorrección no excluye el empleo de otras tecnologías de recuperación de suelos no biológicas. Dado que la distribución de la contaminación es generalmente heterogénea en lugares diferentes, la solución más eficaz y de menor coste puede ser aquella que combine diferentes tecnologías con vistas a un aumento de la limpieza del suelo contaminado (Pilon-Smits, 2005). Por ejemplo, en zonas de grave contaminación pero muy dispersa, una actuación viable sería la retirada de las partes del suelo más afectadas mediante excavación y posterior depósito y tratamiento, seguido de una limpieza del lugar utilizando vegetación. Dado que se trata de una recuperación integral, es necesario un equipo multidisciplinario para afrontar todas las posibilidades (Rubinos y col., 2007).

Numerosos estudios han descrito la aplicación de la fitocorrección en el caso de diversos pesticidas organoclorados de comportamiento similar al del HCH, como el DDT, o para otros compuestos orgánicos como los PCBs (White, 2000; Lunney y col., 2004; Whitfield Aslund y col., 2007). Asimismo, se conocen estudios de laboratorio que demuestran la importancia de las plantas y su correcto desarrollo en condiciones de contaminación por HCH para poder ser utilizadas en bioremediación a través de los microorganismos (Bidlan y col., 2004).

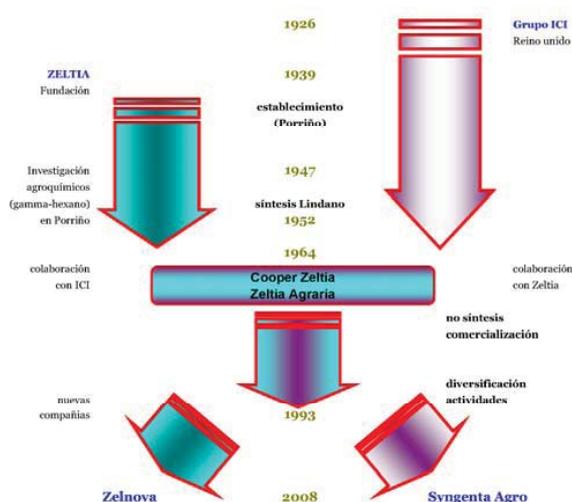
### **1.5. CONTAMINACIÓN POR HEXACLOROCICLOHEXANO EN GALICIA**

#### **1.5.1. Producción de HCH técnico y lindano en Galicia**

Desde el inicio de la investigación y desarrollo de pesticidas, Galicia ha representado un papel de relativo interés. Desde la década de 1940, diferentes industrias químicas centralizaron su actividad en el Polígono Industrial de Torneiros, O Porriño (Pontevedra). La **historia** de la investigación, desarrollo, fabricación y comercialización de los plaguicidas es compleja y ligada a la actividad industrial y empresarial de compañías internacionales. El inicio del siglo XX marcó el despegue de la experimentación, desde la

## Introducción General

orientación farmacéutica (agentes bactericidas, 1916), hasta la mejora de la agricultura (estaciones agrícolas, 1928). La compañía de origen inglés **Imperial Chemical Industries (ICI)** es de especial interés, no sólo por la gran cantidad de investigación que desarrolló, sino también por el hecho de que desde un principio promocionó la expansión a España de sus diferentes divisiones (a través de ICI España S.A.). Por otro lado, ha existido desde el una iniciativa local, representada por la compañía **Zeltia S.A.**, fundada el 3 de Agosto de 1939, en Vigo (Zeltia, 2008). Desde los años 50, la historia de estas dos grandes empresas se entremezcló (colaboración/fusión/creación de nuevas empresas) (Figura 1.13).



**Figura 1.13.** Historia de la producción y comercialización del HCH en Galicia.

En los terrenos de O Porriño, la compañía Zeltia inició sus actividades en el año 1939, dedicándose en un principio al aprovechamiento farmacéutico y veterinario de la flora y fauna de Galicia. Aproximadamente en **1947**, Zeltia inicia las etapas de síntesis y formulación de productos agroquímicos. Uno de los productos principales es el **lindano**, denominado entonces "Gamma-hexano" (del Cañizo y Urquijo, 1946). En 1952, Zeltia emprende una renovación del equipo técnico, ampliando la gama de productos, e iniciando la colaboración internacional con ICI, entre otras empresas (División de Agroquímicos). En **1964** Zeltia e ICI crean nuevas compañías y reorientan sus actividades. Así nacen, constituidas al 50%, ICI Farma, S.A. (con ICI-Pharmaceuticals; dedicada al sector farmacéutico), Cooper Zeltia, S.A. (con Cooper McDougall-Robertson Ltd.; dedicada a productos químicos de uso doméstico), y Zeltia Agraria (con Plant Protection-ICI), esta última dedicada a los productos de uso agrícola. Se asume que es en este momento en el que se paraliza la síntesis de los compuestos agroquímicos, quedando como única actividad la formulación y envasado. Desde 1975 Zeltia constituye una nueva compañía, Xylazel, S.A., dedicada a los productos protectores y decorativos de la madera (una de las posibles aplicaciones del HCH).

En 1991, Cooper Zeltia se escinde y nace **Zelnova S.A.**, empresa dedicada a los insecticidas de uso doméstico e industrial. Esta empresa mantiene actualmente su actividad en O Porriño, y es la

responsable de la comercialización de productos de carácter insecticida. Por otro lado, en 1993 la División de Farmacéuticos y Agroquímicos de ICI se escinde, formándose diversas compañías. Una de estas es Zeneca, que ese mismo año adquiere el 50% del capital de Zeltia en Zelta Agraria. De este modo es Zeneca la propietaria de Zeltia Agraria. Hasta el año 2001, no obstante, no se establece claramente la entidad de esta nueva compañía, cuando se fusionan las divisiones agroquímicas de Zeneca (denominada AstraZeneca) y Novartis (compañía líder mundial formada por la fusión anterior de dos gigantes de la investigación agroquímica y farmacéutica como Sandoz y Ciba, en 1996). De esta fusión nace Syngenta, grupo global que se centra exclusivamente en los productos relacionados con la agricultura. A nivel local, es en este momento cuando nace **Syngenta Agro S.A.**, compañía que actualmente mantiene los mismos terrenos heredados de Zeltia Agraria en el Polígono Industrial de Torneiros. Syngenta Agro se dedica a las actividades del sector de la Protección de Cultivos en España, con la producción, entre otros, de insecticidas agrícolas. La factoría de Syngenta Agro se localiza en terrenos del Ayuntamiento de O Porriño que con anterioridad fueron utilizados en la síntesis de principios activos relacionados con el lindano, llevada a cabo durante los años 1940 - 1950. Los terrenos, actualmente, presentan índices de contaminación por encima de los valores de referencia. Esta contaminación de origen "histórico" esta sometida a control, limpieza y seguimiento, regulado por la Autoridad Ambiental competente, en este caso la Consellería de Medio Ambiente de la Xunta de Galicia.

### **1.5.2. El problema de la contaminación en el Polígono Industrial de Torneiros, O Porriño, Pontevedra**

#### **▪ Resultados iniciales**

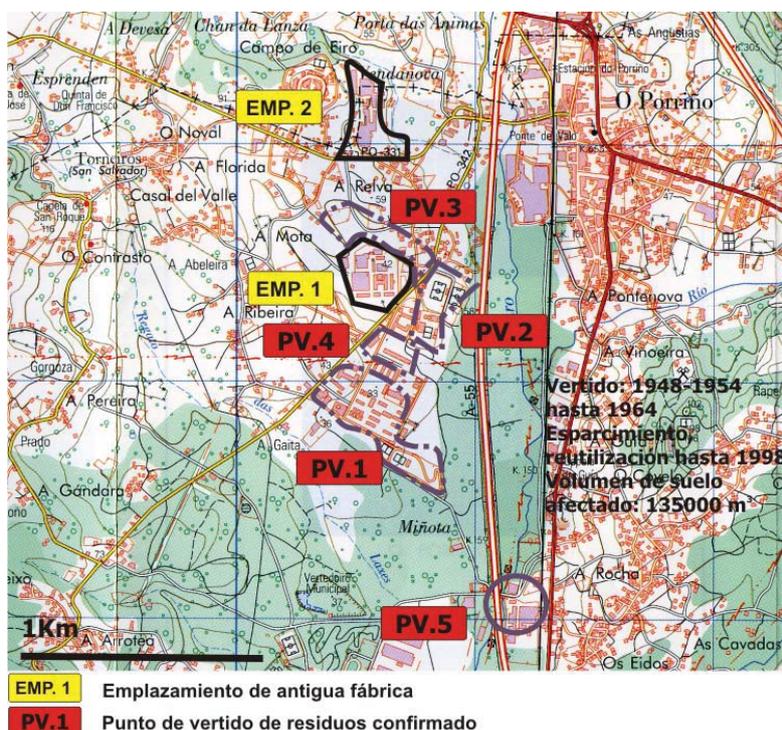
Los residuos de la fabricación de **lindano** (isómero  $\gamma$ -HCH) fueron vertidos sin control durante décadas en terrenos localizados en el Polígono de Torneiros, en O Porriño (Pontevedra). El inicio de estos vertidos tuvo lugar entorno a los años 1948-1954 y es probable que se prolongaran hasta 1964. Con posterioridad tuvo lugar un esparcimiento por todo el terreno de los residuos depositados como consecuencia de traslado de tierras y allanamiento (Eptisa, 1999), por lo que es imposible conocer con precisión su composición, cantidad, distribución espacial o el grado de transformación que han experimentado por acción de la intemperie y la actividad biológica de los suelos.

Una descripción pormenorizada de la zona afectada se puede encontrar en el informe inicial que el Gobierno de la Xunta de Galicia encomendó a la empresa Eptisa (Eptisa, 1999). Se trata de una zona de extensión considerable (4.3 ha aproximadamente) (Figura 1.14), cuyos terrenos presentaban unos contenidos de HCH totales en suelo muy superiores a los  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  que la normativa de la Xunta de Galicia admite como valor de intervención (Decreto 263/1999<sup>15</sup>). La contaminación alcanzaba en muchos puntos profundidades de más de 6 metros, lo que implica un volumen de tierras contaminadas superior a los  $130\,000 \text{ m}^3$ . Se distinguieron varias zonas de características diferentes, en función de la vegetación y el aspecto, ya que se presentaban por un lado superficies casi planas y muy poca vegetación, en terrenos pobres en materia orgánica, mientras que otras zonas presentaban una topografía más irregular, con

---

<sup>15</sup> Decreto 263/1999, do 30 de setembro, polo que se fixa a concentración límite en solos afectados por vertidos de residuos de HCH. Corrección de erros (29 outubro) Decreto 263/1999, do 30 de setembro, polo que se fixa a concentración límite en solos afectados por vertidos de residuos de HCH.

presencia de una vegetación densa de árboles (pinos, robles, eucaliptos) y helechos, así como pequeñas zonas dedicadas al pasto. Se detectaron indicios de trabajos de allanamiento y eliminación de montículos de rellenos de origen antrópico, así como lugares dispersos de vertidos de residuos sólidos urbanos. El acuífero presentaba contaminación, existiendo un flujo claro hacia el cauce del cercano río Louro (Eptisa, 1999).



**Figura 1.14.** Zonas contaminadas en el entorno de Porriño.

La alternativa que se escogió para el control del foco principal de la contaminación consistió en el **confinamiento en una celda de seguridad** *in situ* de los suelos. La zona de gran contaminación se clausuró y encapsuló mediante obra de ingeniería en el año 2001, según un proyecto específico promovido por la Xunta de Galicia, consistente en la construcción de una pantalla perimetral (900 m de perímetro), impermeabilizando la parte superficial del área contaminada (Crespo González, 2001).

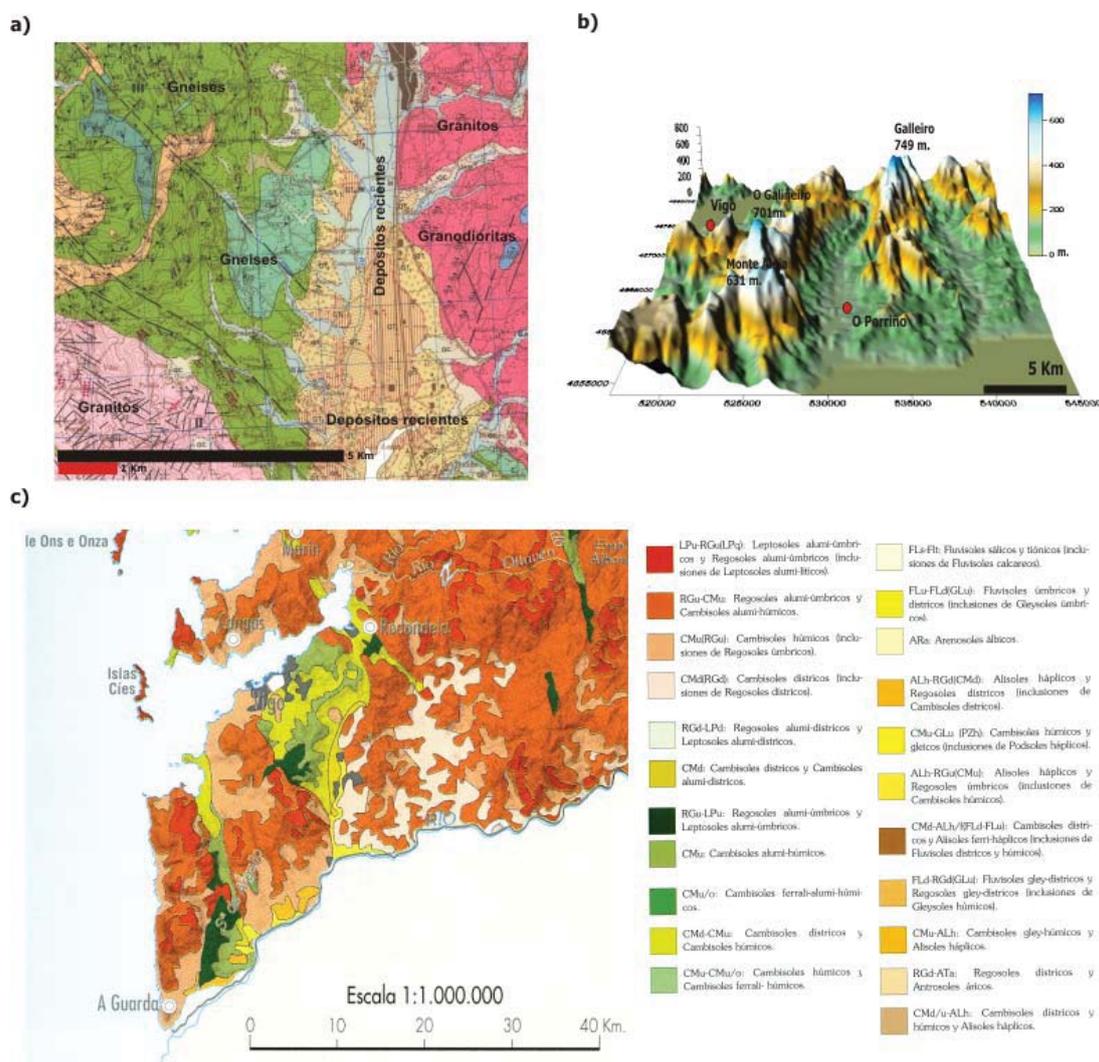
Además del foco principal, Eptisa localizó una serie de focos secundarios de contaminación; se trataba de zonas en el entorno del polígono que presentaban indicios de elevadas concentraciones de HCH. Para afrontar la investigación y desarrollo de técnicas alternativas de descontaminación de suelos, se escogió uno de estos focos secundarios. Diversos estudios se desarrollaron, en colaboración, por el CSIC, la Universidad de La Coruña y la Universidad de Santiago de Compostela (entre otros, el Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Biología). En el seno de esta colaboración se encuadra el presente trabajo, relacionado con la recuperación de suelos contaminados por el vertido de una mezcla heterogénea de isómeros de HCH (principalmente  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -HCH; USC, 2003), mediante técnicas de **fitocorrección**.

### ▪ La zona contaminada: estudio del medio

La zona de estudio es el entorno cercano del Polígono Industrial de Torneiros, que se incluye en la zona central de la cuenca del río Louro (Figura 1.15). Las rocas **graníticas** (granitos y granodioritas), ricas en silicio y aluminio, minerales resistentes a la alteración, ocupan la zona este y sur de la cuenca (Serra do Galleiro, Faro Budiño, Monte Aloia). Las rocas **metamórficas** que caracterizan la zona de Torneiros se encuentran en la zona oeste de la cuenca del río Louro; se trata de gneises formados por el metamorfismo regional de alta temperatura y baja presión de restos de rocas ígneas y sedimentarias. Los **depósitos** recientes, generalmente terciarios y cuaternarios, son el resultado de la fuerte meteorización de rocas graníticas y gneises, posterior transporte y depósito en las zonas deprimidas del valle del río. En general, su composición es similar a la de las rocas graníticas (Figura 1.15) (Otero Pérez, 1993).

La **morfología** del área está muy relacionada con la morfología de la cuenca del río. O Porriño se asienta en la zona central, un valle atavesado de norte a sur por una fractura central (Depresión Meridiana, O Porriño-Tui). Sus bordes son escarpados y rocosos, muy pronunciados, con un fondo plano que permite encontrar abanicos y terrazas fluviales. Las alturas que circundan O Porriño son marcadamente diferentes, dado que las sierras que limitan el valle del Louro presentan laderas con un desnivel de aproximadamente 300 m. (Figura 1.15). Dentro del valle mismo, existen sistemas de fallas más pequeños que cortan los bloques graníticos y gneísicos facilitando el curso de ríos y arroyos. O Porriño se encuentra en una cavidad tectónica que antiguamente estaba ocupada por gneises, micaesquistos y granitos, sometidos largo tiempo a procesos tectónicos e hidrotermales, alterándose y provocando el descenso de la parte central del valle, dejando superficies antiguas a 200 y 100 m. Esto se vio acompañado de la producción de una gran cantidad de sedimentos en los niveles más bajos del valle, sometido a un nuevo hundimiento que finalmente configuró una cubeta de recepción que se llenó durante épocas pasadas (Mioceno). Durante el Cuaternario se han producido únicamente cambios de detalle al entrar en funcionamiento el sistema fluvial y la aparición de las terrazas fluviales (Otero Pérez, 1993; Pérez Alberti y Valcárcel Díaz, 2000).

La peculiar morfología de la zona ejerce una influencia decisiva en el **clima** local (Martínez Cortizas y Pérez Alberti, 1999; Pérez Iglesias y Romaní Barrientos, 2000). La componente orográfica impone una clara influencia del relieve. Los sistemas predominantes de la región son de componente Oeste, SurOeste y NorOeste. Así, las masas de aire que atraviesan la zona son forzadas, al llegar a la costa de Pontevedra a elevarse a causa de los obstáculos montañosos cercanos al litoral. Al elevarse las masas de aire, las precipitaciones aumentan a barlovento, descargándose la nubosidad hacia la costa, mientras que se crean zonas de sombra pluviométrica a sotavento, asociado a un marcado efecto Föhn de aumento de la temperatura (Martínez Cortizas y Pérez Alberti, 1999). Esto crea condiciones muy contrastadas a lo largo del año, en función de la estación considerada: veranos calurosos y secos (temperatura media, 20.2°C; precipitación media, 139 mm.), frente a inviernos fríos y húmedos (temperatura media, 9.5°C; precipitación media, 580 mm.) (Figura 1.15). Las clasificaciones bioclimáticas clásicas consideran que O Porriño debe incluirse en una zona de tipo climático Mediterráneo clásico (clasificación de Papadakis); según la clasificación de Zonas Agroecológicas, se obtiene la clasificación de Subtrópico fresco con lluvias de verano (Otero Pérez, 1993). Estas consideraciones implican que la zona es, en general, apta para los cultivos.



**Figura 1.15.** Zona de estudio: a) geología; b) relieve y c) suelos (Macías y Calvo de Anta, 2001).

En general, los **suelos** presentan una variedad originada no sólo por la litología y el grado de alteración, sino que también se ven afectados por la posición topográfica, las diferencias en el tiempo de evolución, la influencia de la erosión, la tendencia acidificante general que puede enmascarar dicha variabilidad, así como la influencia humana en su formación (Macías, 2000). En función de todos estos factores, pero teniendo en cuenta la importancia intrínseca de la litología dominante, es posible encontrar en la zona de O Porriño una amplia variedad de suelos: Leptosoles, Regosoles, Fluvisoles y Umbrisoles como los más abundantes. (Figura 1.15) (Macías y Calvo de Anta, 2001).

▪ **La zona contaminada: estudio de detalle**

En el momento del inicio de los trabajos de campo por parte del personal del Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Santiago de Compostela (2001) la parcela experimental

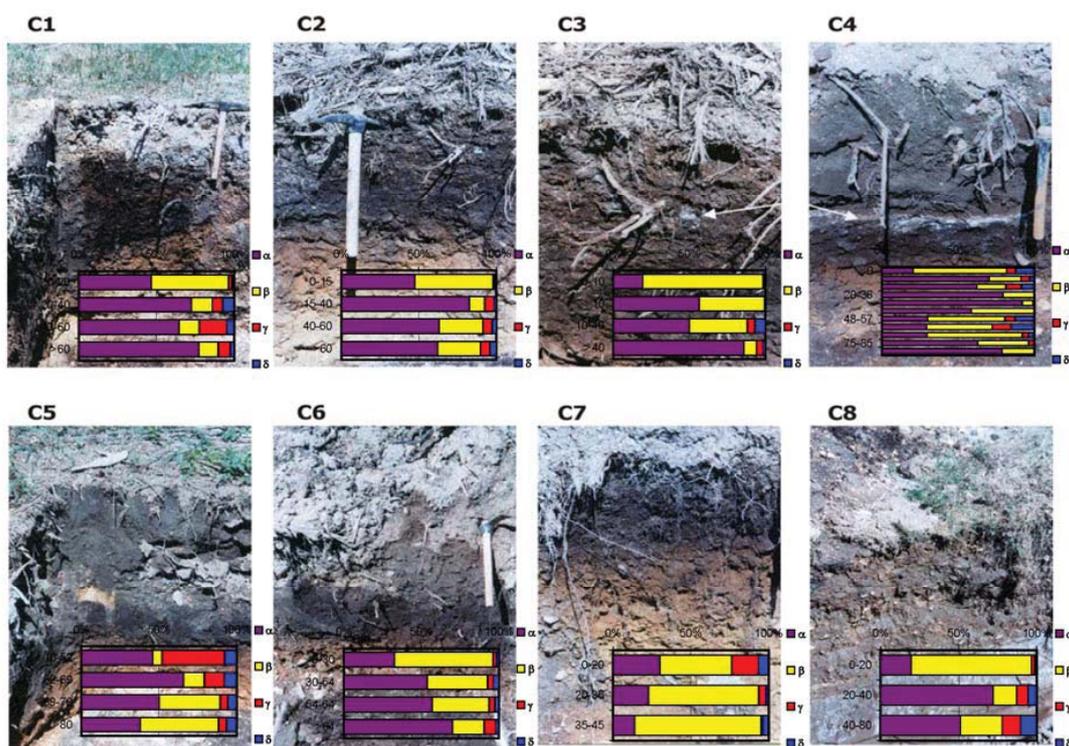
escogida (aprox. 3560 m<sup>2</sup>) presentaba un aspecto muy heterogéneo respecto a la vegetación, los materiales superficiales (suelos y desechos de diverso origen), la topografía y las condiciones hídricas (Foto 1.1). Antes de su preparación para el desarrollo de los trabajos experimentales se realizaron una serie de tareas: identificación de las especies vegetales existentes y cuantificación del grado de cobertura, toma de muestras de raíz para la identificación de micorrizas, trampas para la caracterización de otros organismos del suelo (artrópodos; USC, 2003), y muestreo de suelos para la caracterización físicoquímica y microbiológica, en cinco puntos localizados a lo largo de tres transectos. Tras estas actuaciones preliminares, se desbrozó la vegetación y se allanó la superficie de la parcela experimental. A continuación, en abril de 2001 se hizo una apertura de 8 calicatas de 1,5 m de profundidad para la descripción del suelo, tomando muestras de los diferentes horizontes para su posterior caracterización (Figura 1.16). Durante la observación de los perfiles se confirmó que la contaminación de los diferentes isómeros de HCH se distribuía heterogéneamente tanto vertical como horizontalmente como un sólido blanco de consistencia dura, con un olor a humedad muy característico. Los posteriores ensayos y trabajos de investigación en el campo se han realizado sobre esta superficie acondicionada.



**Foto 1.1.** Aspecto general de la parcela de muestreo al inicio del estudio.

Los suelos originales de la parcela derivan de sedimentos aluvio-coluviales de textura heterogénea con abundancia de fragmentos gruesos. Se trata de Tecnosoles Úrbicos y/o Regosoles Técnicos (IUSS Working Group, 2007). Son suelos con pH variable (3.6 – 7.45) pero generalmente bajo, baja capacidad de cambio (CICe < 12, llegando a <1 en los horizontes profundos), una alta saturación de aluminio (hasta un 90%). Los contenidos en carbono son altos en los horizontes superficiales (hasta un máximo del 16.7%). El perfil tipo es ABC, con horizontes bien diferenciados y de profundidad variable (Figura 1.16). La permeabilidad, aunque muy variable, está limitada en profundidad, ocasionando encharcamientos, especialmente en la parte más baja de la parcela. El drenaje lateral se favorece a través de las zonas con mayor abundancia de fragmentos gruesos. Estos suelos aparecían ocasionalmente en superficie pero, habitualmente, se encuentran enterrados por un horizonte A alóctono y otros materiales. En la zona de contacto entre los dos horizontes A (antigua superficie de la parcela) aparecieron indicios de incendio,

residuos de distinta naturaleza (plásticos, cristales, etc.) y una capa variable (en potencia y profundidad) de residuos visibles de HCH (USC, 2003). Esto sugiere que sobre la superficie original de la parcela fue vertido heterogéneamente un residuo de fabricación de lindano en el que dominaba generalmente el isómero  $\alpha$ -HCH; la distribución porcentual de los isómeros principales era:  $\alpha$ , 77%,  $\beta$ , 16%,  $\gamma$ , 5% y  $\delta$ , 2% (USC, 2003). Este residuo fue recubierto posteriormente con restos de horizonte A alóctono que también presentaba concentraciones variables de residuos de los diferentes isómeros de HCH, pero en este caso con abundancia de  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH, en ocasiones en porcentajes similares (Figura 1.16).



**Figura 1.16.** Calicatas en la zona de estudio. Datos de distribución porcentual con la profundidad de los isómeros de HCH analizados.

A pesar de la baja solubilidad acuosa del residuo, ésta es suficiente como para que se detecte una contaminación de los horizontes profundos del suelo, sobre todo en las partes bajas de la parcela. De hecho, las concentraciones de los isómeros mayoritarios ( $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH) variaban con la profundidad. Además, el isómero beta se concentraba en profundidad, aumentando el % con respecto al HCH total (suma de  $\alpha+\beta+\gamma+\delta$ ) (Figura 1.16). Esta contaminación profunda podría derivar de un proceso repetido de drenaje lateral y encharcamiento de la zona, siendo diferente para cada isómero considerado. Desde el primer momento, los análisis preliminares de los tejidos vegetales recogidos en la parcela experimental denotaron una importante acumulación de los diferentes isómeros de HCH en las plantas analizadas (helechos, ruderales) (USC, 2003).

**1.6. BIBLIOGRAFÍA**

- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, 34: 4259-4265.
- Amadori, E. 1993. The production and use of HCH. En: HCH and halogenated pesticides. State of art for risk assessment and technology development. IWU, Magdeburgo. Págs. 11-13.
- Anderson, T. A., E. A. Guthrie y B. T. Walton. 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science and Technology*, 27: 2630-2636.
- Arthur, E. L., P. J. Rice, P. J. Rice, T. A. Anderson, S. M. Baladi, K. L. D. Henderson y J. R. Coats. 2005. Phytoremediation; an overview. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 109 - 122.
- Bacci, E., D. Calamari, C. Gaggi y M. Vighi. 1990. Bioconcentration of organic chemical vapors in plant leaves: experimental measurements and correlation. *Environmental Science and Technology*, 24: 885-889.
- Bakker, M. I. 2000. Atmospheric deposition of semivolatile organic compounds to plants. Tesis Doctoral. Universidad de Utrecht
- Barber, J. L., P. B. Kurt, G. O. Thomas, G. Kerstiens y K. C. Jones. 2002. Investigation into the importance of the stomatal pathway in the exchange of PCBs between air and plants. *Environmental Science and Technology*, 36: 4282-4287.
- Barber, J. L., G. O. Thomas, G. Kerstiens and K. C. Jones. 2004. Current issues and uncertainties in the measurement and modelling of air-vegetation exchange and within-plant processing of POPs. *Environmental Pollution*, 128: 99-138.
- Bedos, C., P. Cellier, R. Calvet, E. Barriuso y B. Gabrielle. 2002. Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: Overview. *Agronomie*, 22: 21-33.
- Bernstein, L. y R. H. Nieman. 1960. Apparent free space of plant roots. *Plant Physiology*, 35: 589-598.
- Bhadra, R., D. G. Wayment, J. B. Hughes y J. V. Shanks. 1999. Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots. *Environmental Science and Technology*, 33: 446-452.
- Bhatt, P., M. S. Kumar, S. Mudliar y T. Chakrabarti. 2007. Biodegradation of chlorinated compounds - A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37: 165-198.
- Bidlan, R., M. Afsar y H. K. Manonmani. 2004. Bioremediation of HCH-contaminated soil: Elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere*, 56: 803-811.
- Bidleman, T. F. 1988. Atmospheric processes. *Environmental Science and Technology*, 22: 361-367.
- Bidleman, T. F., H. Kylin, L. M. Jantunen, P. A. Helm y R. W. Macdonald. 2007. Hexachlorocyclohexanes in the Canadian Archipelago. 1. Spatial distribution and pathways of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -HCHs in surface water. *Environmental Science and Technology*, 41: 2688-2695.
- Bierman, V. J. 1990. Equilibrium partitioning and biomagnification of organic chemicals in benthic animals. *Environmental Science and Technology*, 24: 1407-1412.
- Boesten, J. J. T. I. 1993. Bioavailability of organic chemicals in soil related to their concentration in the liquid phase: A review. *Science of The Total Environment*, 134: 397-407.
- Böhme, F., K. Welsch-Pausch y M. S. Mclachlan. 1999. Uptake of airborne semivolatile organic compounds in agricultural plants: field measurements of interspecies variability. *Environmental Science and Technology*, 33: 1805-1813.
- Bollag, J. M. 1992. Decontaminating soil with enzymes. *Environmental Science and Technology*, 26: 1876-1881.
- Bollag, J. M. and D. Liu. 1990. Biological transformation processes of pesticides. En: Cheng, H. H. (Ed.), *Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin. Págs. 169-212.
- Breivik, K., J. M. Pacyna y J. Munch. 1999. Use of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996. *The Science of the Total Environment*, 239: 151-163.
- Briggs, G. G., R. H. Bromilow y A. A. Evans. 1982. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. *Pesticide Science*, 13: 495-504.
- Briggs, G. G., R. H. Bromilow, A. A. Evans y M. Williams. 1983. Relationships between lipophilicity and the distribution of nonionized chemicals in barley shoots following uptake by the roots. *Pesticide Science*, 14: 492-500.
- Buckley, E. H. 1982. Accumulation of airborne polychlorinated biphenyls in foliage. *Science*, 216: 520-522.
- Buehler, S. S., I. Basu y R. A. Hites. 2002. Gas-phase polychlorinated biphenyl and hexachlorocyclohexane concentrations near the Great Lakes: a historical perspective. *Environmental Science and Technology*, 36: 5051-5056.
- Burken, J. G. 2003. Uptake and metabolism of organic compounds. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L. (Eds.), *Phytoremediation: Transformation and control of contaminants*. Wiley Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 59-84.
- Burken, J. G. y J. L. Schnoor. 1998. Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology*, 32: 3379-3385.
- Busvine, J. R. 1946. New synthetic contact insecticides. *Nature*, 158: 22.
- Cavanagh, J. E., K. A. Burns, G. J. Brunskill y R. J. Coventry. 1999. Organochlorine pesticide residues in soils and sediments of the Herbert and Burdekin river regions, North Queensland - implications for contamination

## Introducción General

---

- of the Great Barrier Reef. *Marine Pollution Bulletin*, 39: 367-375.
- Cheng, H. H. 1990. Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts, and Modeling. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin.
- Chiou, C. T. 1989. Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. En: Sawhney, B. L. y Brown, K. W. (Eds.), *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin. Págs. 1-30.
- Chiou, C. T. 2002. Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems. John Wiley and Sons. Hoboken, New Jersey.
- Chiou, C. T., R. L. Malcolm, T. I. Brinton y D. E. Kile. 1986. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environmental Science and Technology*, 20: 502-508.
- Chiou, C. T., G. Sheng y M. Manes. 2001. A partition-limited model for the plant uptake of organic contaminants from soil and water. 35: 1437-1444.
- Cohen, J. M., y C. Pinkerton. 1966. Widespread translocation of pesticides by air transport and rain-out. En: Rosen, A. A., Kraybill, H. F., (Eds.), *Organic pesticides in the environment*. American Chemical Society. Washington D. C. Págs. 163-176.
- Crespo González, N., F. Pan-Montojo González, J. Rega Piñeiro y J. L. Casas. 2001. HCH-polluted soils in highly contaminated areas in "O Porriño" (Galicia, Northwest Spain). En: Vijgen, J., Pruszyński, S., Sobiecki, S., Sliwinski, W., (Eds.), 6<sup>th</sup> International HCH and Pesticides Forum Book. Plant Protection Institute. Poznan, Polonia. Págs. 175-180.
- Davis, L. C., S. Castro-Diaz, Q. Zhang y L. E. Erickson. 2002. Benefits of vegetation for soils with organic contaminants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 457-491.
- del Cañizo, J. y P. Urquijo. 1946. Experiencias sobre la eficacia insecticida del gamma-hexano ( $\gamma$ -666) contra los pulgones (Afidios). *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola*, XIV: 181-188.
- Dietz, A. C. y J. L. Schnoor. 2001. Advances in phytoremediation. *Environmental Health Perspectives*, 109: 163-168.
- Díez Lázaro, J., P. S. Kidd y C. Monterroso Martínez. 2006. A phytochemical study of the Trás-os-Montes region (NE Portugal): possible species for plant-based soil remediation technologies. *Science of The Total Environment*, 354: 265-277.
- Dowdy, D. L. y T. E. McKone. 1997. Predicting plant uptake of organic chemicals from soil or air using octanol/water and octanol/air partition ratios and a molecular connectivity index. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 2448-2456.
- EEA. 2007. Europe's environment. The fourth assessment. European Environment Agency. Copenhagen.
- EPA. 2008. Ecotox database. <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>
- Eptisa, 1999. Informe-resumen de los trabajos realizados con relación a la investigación de detalle de la contaminación por HCH en el entorno del polígono de Torneiros-O Porriño-(Pontevedra). Informe Técnico.
- Fabre, B., E. Roth y V. Heintz. 2005. Les isomeres de l'hexachlorocyclohexane. UHA-ADEME. Mulhouse, Francia.
- Fletcher, J. S., F. L. Johnson y J. C. McFarlane. 1988. Database assessment of phytotoxicity data published on terrestrial vascular plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7: 615-622.
- Fu, J., B. Mai, G. Sheng, G. Zhang, X. Wang, P. A. Peng, X. Xiao, R. Ran, F. Cheng, X. Peng, Z. Wang y U. Wa Tang. 2003. Persistent organic pollutants in environment of the Pearl river delta, China: An overview. *Chemosphere*, 52: 1411-1422.
- Galván Lopez, V. 1998. HCH and lindane: differences and similarities. En: IHOBE, (Ed.), 5<sup>th</sup> International HCH and Pesticides Forum Book. Bilbao. Págs. 55-62.
- Glick, B. R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21: 383-393.
- Glotfelty, D. E. y C. J. Schomburg. 1989. Volatilization of pesticides from soil. En: Sawhney, B. L. y Brown, K. W. (Eds.), *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin. Págs. 181-207.
- Green, R. E. y S. W. Karickhoff. 1990. Sorption estimates for modeling. En: Cheng, H. H. (Ed.), *Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts, and Modelling*. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA. Págs. 79-102.
- Greenland, D. J. y M. H. B. Hayes. 1981. The chemistry of soil processes. John Wiley and Sons. Chichester.
- Hasset, J. J. y W. L. Banwart. 1989. The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. En: Sawhney, B. L. y Brown, K. (Eds.), *Reaction and movement of organic chemicals in soils*. Págs. 31-44.
- Hernández, L. M., M. A. Fernández y M. J. González. 1991. Lindane pollution near an industrial source in northeast Spain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46: 9-13.
- Hiatt, M. H. 1998. Bioconcentration factors for volatile organic compounds in vegetation. *Analytical Chemistry*, 70: 851-856.
- Horstmann, M. y M. S. McLachlan. 1996. Evidence of a novel mechanism of semivolatile organic compound deposition in coniferous forests. *Environmental Science and Technology*, 30: 1794-1796.
- Hsu, F. C., R. L. Marxmiller y A. Y. S. Yang. 1990. Study of root uptake and xylem translocation of cinmethylin and related compounds in detopped soybean roots using a pressure chamber technique. *Plant*

- Physiology, 93: 1573-1578.
- Hung, H., G. O. Thomas, K. C. Jones y D. Mackay. 2001. Grass-air exchange of polychlorinated biphenyls. *Environmental Science and Technology*, 35: 4066-4073.
- IUSS Working Group WRB. 2007. World Reference Base for Soil Resources 2006, actualización 2007. World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Roma.
- Iwata, H., S. Tanabe, N. Sakai y R. Tatsukawa. 1993. Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and surface seawater and the role of ocean on their global transport and fate. *Environmental Science and Technology*, 27: 1080-1098.
- Iwata, H., S. Tanabe, K. Ueda y R. Tatsukawa. 1995. Persistent organochlorine residues in air, water, sediments, and soils from the lake Baikal region, Russia. *Environmental Science and Technology*, 29: 792-801.
- Johri, A. K., M. Dua, D. Tuteja, R. Saxena, D. M. Saxena y R. Lal. 1998. Degradation of alpha, beta, gamma and delta-hexachlorocyclohexanes by *Sphingomonas paucimobillis*. *Biotechnology Letters*, 20: 885-887.
- Johri, A. K., M. Dua, D. M. Saxena y N. Sethunathan. 2000. Enhanced degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonas paucimobillis*. *Current Microbiology*, 41: 309-311.
- Jones, K. C. y P. De Voegt. 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution*, 100: 209-221.
- Kalbitz, K., P. Popp, W. Geyer y G. Hanschmann. 1997.  $\beta$ -HCH mobilization in polluted wetland soils as influenced by dissolved organic matter. *The Science of the Total Environment*, 204: 37-48.
- Karthikeyan, R., L. C. Davis, L. E. Erickson, K. Al-Khatib, P. A. Kulakow, P. L. Barnes, S. L. Hutchinson y A. A. Nurzhanova. 2004. Potential for plant-based remediation of pesticide-contaminated soil and water using nontarget plants such as trees, shrubs, and grasses. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23: 91 - 101.
- Kidd, P., A. Prieto-Fernández, C. Monterroso y M. Acea. 2008. Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil*, 302: 233-247.
- Kömp, P. y M. S. Mclachlan. 1997. Interspecies variability of the plant/air partitioning of polychlorinated biphenyls. *Environmental Science and Technology*, 31: 2944-2948.
- Koskinen, W. C. y S. S. Harper. 1990. The retention process: mechanisms. En: Cheng, H. H. (Ed.), *Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin. Págs. 51-78.
- Kostoff, D. 1948. Atypical growth, abnormal mitosis, polyploidy and chromosome fragmentation induced by hexachlorocyclohexane. *Nature*, 162: 845-846.
- Krämer, U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 133-141.
- Kumar, M. S. K. Gupta, S. K. Garg y A. Kumar. 2006. Biodegradation of hexachlorocyclohexane-isomers in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2318-2327.
- Larcher, W. 2003. *Physiological Plant Ecology*. Springer. Berlín.
- Larsen, M., A. S. Ucisik y S. Trapp. 2005. Uptake, metabolism, accumulation and toxicity of cyanide in willow trees. *Environmental Science and Technology*, 39: 2135-2142.
- Law, S. A., M. L. Diamond, P. A. Helm, L. M. Jantunen y M. Alae. 2001. Factors affecting the occurrence and enantiomeric degradation of hexachlorocyclohexane isomers in northern and temperate aquatic systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 2690-2698.
- Law, S. A., T. F. Bidleman, M. J. Martin y M. V. Ruby. 2004. Evidence of enantioselective degradation of  $\alpha$ -hexachlorocyclohexane in groundwater. *Environmental Science and Technology*, 38: 1633-1638.
- Leonard, R. A. 1990. Movement of pesticides into surface waters. En: Cheng, H. H. (Ed.), *Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin. Págs. 303-350.
- Li, Y. F. 1999. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *The Science of the Total Environment*, 232: 121-158.
- Li, Y. F. y R. W. Macdonald. 2005. Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: a review. *Science of The Total Environment*, 342: 87-106.
- Li, Y. y J. Vijgen. 2006. Global lindane usage. En: Vijgen, J. (Ed.), *The legacy of lindane HCH isomer production*. IHPA. Págs. 35-60.
- Li, Y. F., R. W. Macdonald, L. M. M. Jantunen, T. Harner, T. F. Bidleman y W. M. J. Strachan. 2002a. The transport of  $\beta$ -hexachlorocyclohexane to the western Arctic ocean: a contrast to  $\alpha$ -HCH. *The Science of the Total Environment*, 291: 229-246.
- Li, H., G. Sheng, W. Sheng y O. Xu. 2002b. Uptake of trifluralin and lindane from water by ryegrass. *Chemosphere*, 48: 335-341.
- Lichtenstein, E. P. 1959. Plant absorption of insecticides: absorption of some chlorinated hydrocarbon insecticides from soils into various crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7: 430-433.
- Lichtenthaler, H. K. 1998. The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851: 187-198.
- Lohmann, R., K. Breivik, J. Dachs y D. Muir. 2007. Global fate of POPs: current and future research directions. *Environmental Pollution*, 150: 150-165.
- Lunney, A. I., B. A. Zeeb y K. J. Reimer. 2004. Uptake of weathered DDT in vascular plants: potential for

- phytoremediation. *Environmental Science and Technology*, 38: 6147-6154.
- Macdonald, R. W., L. A. Barrie, T. F. Bidleman, M. L. Diamond, D. J. Gregor, R. G. Semkin, W. M. J. Strachan, Y. F. Li, F. Wania, M. Alae, L. B. Alexeeva, S. M. Backus, R. Bailey, J. M. Bewers, C. Gobeil, C. J. Halsall, T. Harner, J. T. Hoff, L. M. M. Jantunen, W. L. Lockhart, D. Mackay, D. C. G. Muir, J. Pudykiewicz, K. J. Reimer, J. N. Smith, G. A. Stern, W. H. Schroeder, R. Wagemann y M. B. Yunker. 2000. Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *The Science of the Total Environment*, 254: 93-234.
- Macdonald, R., D. Mackay y B. Hickie. 2002. Contaminant amplification in the environment. *Environmental Science and Technology*, 36: 456A-462A.
- Macías, F. 2000. Los suelos. En: Torres de Luna, M<sup>a</sup> Pilar, (Ed.), *Geografía de Galicia*. Faro de Vigo, S.A. Vigo. Págs. 265-298.
- Macías, F. y R. Calvo de Anta. 2001. Los suelos. En: *Atlas de Galicia*. Xunta de Galicia, Consellería de Presidencia: Sociedade para o Desenvolvemento Comarcal de Galicia. Santiago de Compostela. Págs. 173-217.
- Mackay, D. 2001. Multimedia environmental models: the fugacity approach. CRC Press. Boca Raton.
- Mackay, D., K. L. Foster, Z. Patwa y E. Webster. 2006. Chemical partitioning to foliage: the contribution and legacy of Davide Calamari. *Environmental Science and Pollution Research*, 13: 2-8.
- Mackenzie, K., J. Battke y F. D. Kopinke. 2005. Catalytic effects of activated carbon on hydrolysis reactions of chlorinated organic compounds: Part 1.  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *Catalysis Today*, 102-103: 148-153.
- Mackova, M., D. N. Dowling y T. Macek. 2006. *Phytoremediation and Rhizoremediation: Theoretical background*. Springer. Dordrecht.
- Manz, M., K. D. Wenzel, U. Dietze y G. Schuurmann. 2001. Persistent organic pollutants in agricultural soils of central Germany. *The Science of the Total Environment*, 277: 187-198.
- Marks, T. S., J. D. Allpress y A. Maule. 1989. Dehalogenation of lindane by a variety of porphyrins and corrins. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1258-1261.
- Marschner, H. 2003. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press. London.
- Martínez Cortizas, A. y A. Pérez Alberti. 1999. *Atlas climático de Galicia*. Xunta de Galicia. Santiago de Compostela.
- Matolcsy, G., M. Nádasy y V. Andriška. 1988. *Pesticide Chemistry*. Elsevier. Amsterdam.
- McCutcheon, S. C. y J. L. Schnoor. 2003. Overview of phytotransformation and control of wastes. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L. (Eds.), *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants*. Wiley Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 3-58.
- McGrath, S. P., J. Zhao y E. Lombi. 2002. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy*, 75: 1-56.
- Mckone, T. E. y R. L. Maddalena. 2007. Plant uptake of organic pollutants from soil: bioconcentration estimates based on models and experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 2494-2504.
- Mclachlan, M. S. 1999. Framework for the interpretation of measurements of SOCs in plants. *Environmental Science y Technology*, 33: 1799-1804.
- Medina, V. F., M. Marmiroli, E. Maestri, A. C. Dietz y S. C. McCutcheon. 2003. Plant tolerances to contaminants. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L., (Eds.), *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants*. Wiley Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 189-232.
- Metcalfe, R. L. 1955. Benzene Hexachloride. En: Metcalfe, R. L., (Ed.), *Organic insecticides: Their chemistry and mode of action*. Interscience Publishers. New York. Págs. 213-231.
- Middeldorp, P. J. M., M. Jaspers, A. J. B. Zehnder y G. Schraa. 1996. Biotransformation of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane under methanogenic conditions. *Environmental Science and Technology*, 30: 2345-2349.
- Miglioranza, K. S. B., J. E. Aizpún De Moreno, V. J. Moreno, M. L. Osterrieth y A. H. Escalante. 1999. Fate of organochlorine pesticides in soils and terrestrial biota of "Los padres" Pond watershed, Argentina. *Environmental Pollution*, 105: 91-99.
- Minh, N. H., T. Minh, H. Iwata, N. Kajiwara, T. Kunisue, S. Takahashi, P. Viet, B. Tuyen y S. Tanabe. 2007. Persistent organic pollutants in sediments from Sai Gon-Dong Nai river basin, Vietnam: Levels and temporal trends. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 458-465.
- Miyauchi, K., S.-K. Suh, Y. Nagata y M. Takagi. 1998. Cloning and sequencing of a 2,5-dichlorohydroquinone reductive dehalogenase gene whose product is involved in degradation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane by *Sphingomonas paucimobilis*. *Journal of Bacteriology*, 180: 1354-1359.
- Monterroso Martínez, M. C. 2006. Degradación, Contaminación y Descontaminación de Suelos. En: Rodríguez Iglesias, F. (Ed.), *Galicia. Ecología*. Tomo XLVIII. Ciencia y Tecnología Ambientales II. Hércules de Ediciones. Págs. 103-173.
- Mordaunt, C. J., B. Gevao, K. C. Jones y K. T. Semple. 2005. Formation of non-extractable pesticide residues: observations on compound differences, measurement and regulatory issues. *Environmental Pollution*, 133: 25-34.
- Muir, D. C. G., M. D. Segstro, P. M. Welbourn, D. Toom, S. J. Eisenreich, C. R. Macdonald and D. M. Whelpdale. 1993. Patterns of accumulation of airborne organochlorine contaminants in lichens from the upper Great Lakes region of Ontario. *Environmental Science and Technology*, 27: 1201-1210.
- Müller, C. y M. Riederer. 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 31:

- 2621-2651.
- Newmann, M. C. y M. A. Unger. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers. Boca Raton.
- Ngabe, B., T. F. Bidleman y R. L. Falconer. 1993. Base hydrolysis of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexanes. *Environmental Science and Technology*, 27: 1930-1933.
- Otero Perez, X. L. 1993. Contribución a la ordenación de los suelos y aguas en la cuenca del río Louro (Pontevedra). Tesina. Universidad de Santiago de Compostela.
- Paterson, S., D. Mackay, E. Bacci y D. Calamari. 1991. Correlation of the equilibrium and kinetics of leaf-air exchange of hydrophobic organic chemicals. *Environmental Science and Technology*, 25: 866-871.
- Paterson, S., D. Mackay y C. Mcfarlane. 1994. A model of organic chemical uptake by plants from soil and the atmosphere. *Environmental Science and Technology*, 28: 2259-2266.
- Pérez Alberti, A. y M. Valcárcel Díaz. 2000. El relieve. En: Torres de Luna, M<sup>a</sup> Pilar, (Ed.), *Geografía de Galicia*. Faro de Vigo, S.A. Vigo. Págs. 7-108.
- Pérez Iglesias, M. L. y R. G. Romani Barrientos. 2000. El clima. En: Torres de Luna, M<sup>a</sup> Pilar, (Ed.), *Geografía de Galicia*. Faro de Vigo, S.A. Vigo. Págs. 109-192.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 15-39.
- Pinton, R., Z. Varanini y P. Nannipieri. 2001. The Rhizosphere. *Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Pivetz, B.E., 2001. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites*. EPA/540/S-01/500. United States Environmental Protection Agency, Washington.
- Polder, M. D., E. M. Hulzebos and D. T. Jager. 1998. Bioconcentration of gaseous organic chemicals in plant leaves: comparison of experimental data with model predictions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 962-968.
- Potters, G., T. P. Pasternak, Y. Guisez, K. J. Palme y M. A. K. Jansen. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12: 98-105.
- Powell, R. L. 1997. The use of vascular plants as "field" biomonitors. En: Wang, W., Gorsuch, J. W. y Hughes, J. S. (Eds.), *Plants for environmental studies*. CRC Press LLC. Boca Raton. Págs. 335-366.
- Pozo, K., T. Harner, F. Wania, D. C. G. Muir, K. C. Jones y L. A. Barrie. 2006. Toward a global network for persistent organic pollutants in air: results from the GAPS study. *Environmental Science and Technology*, 40: 4867-4873.
- Prager, J. C. 1995. *Environmental Contaminant Reference Databook*. Volume 1. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Quintana, I. 1997. Progress and development at the Bilbao site in Spain. En: 4<sup>th</sup> International HCH and Pesticide Forum Book. Poznan. Polonia. Págs. 59-62.
- Quintero Díaz, J. C. 2004. Biorrecuperación de suelos contaminados con hexaclorociclohexano. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Ramesh, A., S. Tanabe, K. Kannan, A. N. Subramanian, P. L. Kumaran y R. Tatsukawa. 1992. Characteristic trend of persistent organochlorine contamination in wildlife from a tropical agricultural watershed, South India. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23: 26-36.
- Riederer, M. 2005. Uptake and transport of xenobiotics. En: Hock, B. y Elstner, E. F., (Eds.), *Plant toxicology*. Marcel Dekker New York. Págs. 131-150.
- Roberts, T. R. y D. H. Huston. 1999. *Metabolic pathways of agrochemicals*. Part 2: insecticides and fungicides. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Rodríguez-Garrido, B., M. Camps Arbestain, M. C. Monterroso y F. Macías. 2004. Reductive dechlorination of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane isomers by hydroxocobalamin in the presence of either dithiothreitol or titanium(III) citrate as reducing agents. *Environmental Science and Technology*, 38: 5046-5052.
- Rubinos, D., R. Villasuso, S. Muniategui, M. T. Barral y F. Díaz-Fierros. 2007. Using the landfarming technique to remediate soils contaminated with hexachlorocyclohexane isomers. *Water, Air, and Soil Pollution*, 181: 385-399.
- Rulkens, W. 1993. Alternatives and perspectives of technical solutions. En: HCH and halogenated pesticides. State of art for risk assessment and technology development. IWU, Magdeburgo. Págs. 156-160.
- Rulkens, W., H. Van Wree y L. Urlings. 1997. Overview state of the art of cleaning technologies for soils contaminated with HCH. En: 4th Forum HCH and Unwanted Pesticides Book. Poznan, Polonia. Págs. 24-32.
- Salazar, A. G. y G. M. Paulsen. 1971. Physiological responses of *Sorghum bicolor* to Benzene Hexachloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19: 1005-1007.
- Salt, D. E., R. D. Smith y I. Raskin. 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 643-668.
- Sandermann, H. J. 2004. Bound and unextractable pesticidal plant residues: chemical characterization and consumer exposure. *Pest Management Science*, 60: 613-623.
- Sawhney, B. L. y K. W. Brown. 1989. Reactions and movement of organic chemicals in soils. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
- Schnoor, J. L. 2002. *Pytoremediation of soil and groundwater*. Technology Evaluation Report TE-02-01. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center.

- Schnoor, J. L., L. A. Licht, S. C. McCutcheon, N. L. Wolfe y L. H. Carreira. 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology*, 29: 318A-323A.
- Schönherr, J. y M. Riederer. 1989. Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, 108: 1-70.
- Schreiber, L., K. Hartmann, M. Skrabs y J. Zeier. 1999. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1267-1280.
- Schwarz, O. J. y L. W. Jones. 1997. Bioaccumulation of xenobiotic organic chemicals by terrestrial plants. En: Wang, W., Gorsuch, J. W. y Hughes, J. S. (Eds.), *Plants for environmental studies*. CRC Press LLC. Boca Raton. Págs. 417-449.
- Senesi, N., E. Loffredo, V. D'orazio, G. Brunetti, T. M. Miano y P. La Cava. 2001. Adsorption of pesticides by humic acids from organic amendments and soils. En: Hayes, M. H. B., Malcolm, R. L., Clapp, C. E., Senesi, N., Bloom, P. R. y Jardine, P. M. (Eds.), *Humic substances and chemical contaminants*. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin. Págs. 129-153.
- Simonich, S. L. y R. A. Hites. 1995. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science*, 269: 1851-1854.
- Sinclair, C. J. y A. B. A. Boxall. 2003. Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products. *Environmental Science and Technology*, 37: 4617-4625.
- Smith, K. E. C. y K. C. Jones. 2000. Particles and vegetation: implications for the transfer of particle-bound organic contaminants to vegetation. *The Science of the Total Environment*, 246: 207-236.
- Suntio, L. R., W. Y. Shiu, D. Mackay, J. N. Seiber y D. Glotfelty. 1988. Critical review of Henry's law constants for pesticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 103: 1-59.
- Swannell, R. P. J. 1993. HCH contaminated soil: Occurrence and options for remediation. En: *HCH and halogenated pesticides. State of art for risk assessment and technology development*. IWU. Magdeburg. Págs. 137-155.
- Taylor, A. W. y W. F. Spencer. 1990. Volatilization and vapor transport processes. En: Cheng, H. H. (Ed.), *Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin. Págs. 213-269.
- Tolls, J. y M. S. McLachlan. 1994. Partitioning of semivolatile organic compounds between air and *Lolium multiflorum* (Welsh ray grass). *Environmental Science and Technology*, 28: 159-166.
- Topp, E., I. Scheunert, A. Attar y F. Korte. 1986. Factors affecting the uptake of <sup>14</sup>C-labeled organic chemicals by plants from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 11: 219-228.
- Trapp, S. 2002. Dynamic root uptake model for neutral lipophilic organics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 203-206.
- Trapp, S. 2007. Fruit tree model for uptake of organic compounds from soil and air. SAR and QSAR in *Environmental Research*, 18: 367-387.
- Trapp, S. y M. Matthies. 1995. Generic one-compartment model for uptake of organic chemicals by foliar vegetation. *Environmental Science and Technology*, 29: 2333-2338.
- Travis, C. C. y A. D. Arms. 1988. Bioconcentration of organics in beef, milk, and vegetation. *Environmental Science and Technology*, 22: 271-274.
- Turnbull, A. 1996. Chlorinated pesticides. *Issues in Environmental Science and Technology*, 113-135.
- USC. 2003. Evaluación y bioremediación de suelos contaminados con isómeros de HCH en el Polígono de Torneiros, Porriño (Pontevedra). Informe Final de Proyecto. Universidad de Santiago de Compostela.
- U. S. D. H. H. S. U. S. Department of Health and Human Services. 2005. Toxicological profile for Alpha-, Beta-, Gamma-, and Delta-hexachlorocyclohexane. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia.
- van Camp, L., B. Bujarrabal, A. R. Gentile, R. J. A. Jones, L. Montanarella, C. Olazábal, S-K. Selvaradiou. 2004. Reports of the Technical Working Groups established under the Thematic Strategy for Soil Protection EUR 21319 EN/1, 872 pp. Office for Official Publications of the European Communities. Luxemburgo.
- van Pul, W. A. J., T. F. Bidleman, E. Brorström-Lundén, P. J. H. Builtjes, S. Dutchak, J. H. Duyzer, S.-E. Gryning, K. C. Jones, H. F. G. Van Dijk y J. A. Van Jaarsveld. 1999. Atmospheric transport and deposition of pesticides: an assessment of current knowledge. *Water, Air, and Soil Pollution*, 115: 245-256.
- Vijgen, J., IHPA. 2006. The legacy of lindane HCH isomer production. International and HCH and Pesticides Association. URL: <http://www.iHPA.info/docs/library/Lindane%20Main%20Report%20DEF20JAN06.pdf>.
- Wahid, P. A. y N. Sethunathan. 1979. Sorption-desorption of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  isomers of hexachlorocyclohexane in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 1050-1053.
- Walker, K., D. A. Vallero y R. G. Lewis. 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environmental Science and Technology*, 33: 4373-4378.
- Wang, W., J. W. Gorsuch y J. S. Hughes. 1997. *Plants for environmental studies*. CRC Press LLC. Boca Raton.
- Wania, F. 2003. Assessing the potential of persistent organic chemicals for long-range transport and accumulation in Polar regions. *Environmental Science and Technology*, 37: 1344-1351.
- Wania, F. y D. Mackay. 1993. Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in Polar regions. *Ambio*, 22: 10-18.
- Wania, F. y D. Mackay. 1996. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Technology*, 30: 390A-396A.

## CAPÍTULO 1

---

- Wauchope, R. D., Y. Simon, Jan B.H.J. Linders, R. Kloskowski, K. Tanaka, B. Rubin, A. Katayama, W. Kördel, Z. Gerstl, M. Lane y J. B. Unsworth. 2002. Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Management Science*, 58: 419-445.
- Weber, J. B. y C. T. Miller. 1989. Organic chemical movement over and through soil. En: Sawhney, B. L. y Brown, K. W. (Eds.), *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin. Págs. 305-334.
- Weber, W. J. y Q. Huang. 2003. Inclusion of persistent organic pollutants in humification processes: Direct chemical incorporation of phenanthrene via oxidative coupling. *Environmental Science and Technology*, 37: 4221-4227.
- Welke, B., K. Ettliger y M. Riederer. 1998. Sorption of volatile organic chemicals in plant surfaces. *Environmental Science and Technology*, 32: 1099-1104.
- Welsch-Pausch, K., M. S. McLachlan and G. Umlauf. 1995. Determination of the principal pathways of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to *Lolium multiflorum* (Welsh ray grass). *Environmental Science and Technology*, 29: 1090-1098.
- White, J. C. 2000. Phytoremediation of weathered *p,p'*-DDE residues in soil. *International Journal of Phytoremediation*, 2: 133-144.
- Whitfield Aslund, M. L., B. A. Zeeb, A. Rutter y K. J. Reimer. 2007. In situ phytoextraction of polychlorinated biphenyl - (PCB) contaminated soil. *The Science of the Total Environment*, 374: 1-12.
- WHO, World Health Organization. 1991. Lindane. *Environmental Health Criteria* 124. Ginebra.
- WHO, World Health Organization. 1992. Alpha and Beta-Hexachlorocyclohexane. *Environmental Health Criteria* 123. Ginebra.
- Wild, E., J. Dent, G. O. Thomas y K. C. Jones. 2005. Real-time visualization and quantification of PAH photodegradation on and within plant leaves. *Environmental Science and Technology*, 39: 268-273.
- Wild, E., J. Dent, G. O. Thomas y K. C. Jones. 2007. Use of two-photon excitation microscopy and autofluorescence for visualizing the fate and behavior of semivolatile organic chemicals within living vegetation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 2486-2493.
- Willett, K. L., E. M. Ulrich y R. A. Hites. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science and Technology*, 32: 2197-2207.
- Wolfe, N. L. y C. F. Hoehamer. 2003. Enzymes used by plants and microorganisms to detoxify organic compounds. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L. (Eds.), *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants*. Wiley Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 159-188
- Wolska, L., B. Zygmunt y J. Namiesnik. 2003. Organic pollutants in the Odra river ecosystem. *Chemosphere*, 53: 561-569.
- Zeltia. 2008. Grupo zeltia, s. A. <http://www.zeltia.es/>

## **CAPÍTULO 2**

### **Residuos de hexaclorociclohexano en suelos agrícolas de Galicia: composición y distribución**

Este trabajo ha sido presentado, parcialmente:

Calvelo Pereira, R., Macías, F. y Monterroso, M. C. Residues of hexachlorocyclohexane isomers in agricultural soils of Galicia, NW of Spain. International Workshop on Bioavailability of Pollutants and Soil Remediation. Sevilla, ESPAÑA. 10-14 Septiembre 2006. POSTER.

	<i>pág.</i>
RESUMEN	65
2.1. INTRODUCCIÓN	66
2.2 MATERIAL Y MÉTODOS	68
2.2.1. Área de estudio y toma de muestras	68
2.2.2. Análisis de isómeros de HCH en suelos	71
2.2.3. Análisis estadístico	72
2.3. RESULTADOS	74
2.3.1. Concentración y composición del HCH en los suelos agrícolas de Galicia	74
2.3.2. Distribución del HCH y efecto de las propiedades del suelo	75
2.3.3. Distribución espacial del HCH	82
2.4. DISCUSIÓN	83
2.4.1. Acumulación de HCH en el horizonte superficial de los suelos agrícolas	83
2.4.2. Origen de los residuos de HCH	85
2.4.3. Evaluación del nivel de contaminación por presencia de residuos de HCH	87
2.5. CONCLUSIONES	88
2.6. BIBLIOGRAFÍA	89

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo es caracterizar la presencia y concentración de residuos de hexaclorociclohexano (HCH) en los suelos agrícolas de Galicia. Para ello se ha determinado la concentración de los isómeros de HCH de 252 muestras superficiales de suelo obtenidas a partir de una malla de 8x8 km situada en áreas agrícolas de Galicia. La determinación de HCH se realizó mediante una extracción en hexano:acetona (1:1, v/v) y posterior análisis por GC/ECD. El intervalo de concentración de HCH total (suma de  $\alpha+\beta+\gamma+\delta$ ) oscila entre 4 y 2 305 ng g<sup>-1</sup> (peso seco), siendo los isómeros dominantes  $\alpha$ -HCH (<1 – 1 404 ng g<sup>-1</sup>) y  $\gamma$ -HCH (<1 – 569 ng g<sup>-1</sup>). La distribución de los residuos es muy heterogénea. La provincia de A Coruña es la zona que presenta mayores niveles de residuos. No se ha podido relacionar la distribución actual del HCH con ninguna propiedad de suelo (materia orgánica, pH, arcillas, metales). No obstante, el análisis estadístico multivariante de las muestras ha ayudado a caracterizar tres poblaciones de datos con una composición muy definida de HCH. Estas poblaciones pueden relacionarse con el origen o fuente del HCH: HCH técnico y/o lindano. La composición de la primera de las poblaciones es muy similar al HCH técnico ( $\alpha/\gamma$  aprox. 4), mientras que una segunda población se asemeja a la composición del lindano

(99%  $\gamma$ -HCH). La tercera población (casi exclusivamente  $\alpha$ -HCH), remite a la existencia de un "fondo" de contaminación antrópica que se ha ido estableciendo durante un largo período de tiempo. El análisis pormenorizado de estas poblaciones permite, asimismo, establecer la posible escala temporal de la aplicación de productos que en su composición contenían HCH técnico o lindano. Finalmente, se analiza el posible riesgo derivado de la presencia de HCH en los suelos agrícolas, en base a la legislación actual.

### 2.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se detectan residuos de la utilización de pesticidas organoclorados procedentes de su empleo durante décadas para combatir diversas plagas (Aigner y col., 1998; Harner y col., 1999; Zhu y col., 2005; Bidleman y col., 2006; Wang y col., 2006; Toan y col., 2007). La utilización a nivel mundial de estos compuestos empezó a finales de la década de 1940, no deteniéndose en muchos casos hasta muy recientemente (Rosen y Kraybill, 1966; Li, 1999). Estos compuestos son generalmente muy persistentes en los suelos, tendiendo a la acumulación en las capas superficiales. Por otro lado, dada su relativa movilidad en los diferentes compartimentos del medio, se han detectado en numerosos ecosistemas y su dispersión ha alcanzado una escala global (Simonich y Hites, 1995). La preocupación sobre los problemas ecotoxicológicos de estos compuestos ha supuesto que los organismos internacionales hagan esfuerzos por llevar a cabo una regulación sobre su utilización y eliminación (Jones y de Voogt, 1999). Es especialmente preocupante el hecho de que estos compuestos pueden acumularse en la red trófica a través de los cultivos afectando en última instancia al hombre (Willet y col., 1998).

El hexaclorociclohexano (HCH) ha sido uno de los pesticidas organoclorados más utilizado en el pasado. Existen distintos isómeros que responden a una única fórmula molecular (1-,2-,3-,4-,5-,6-hexaclorociclohexano), pero que se diferencian en la posición axial-ecuatorial de las moléculas de cloro alrededor del anillo de 6 átomos de carbono ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH son los isómeros más comunes; WHO, 1991, 1992). La producción de este tipo de compuestos incluye una mezcla de los isómeros más importantes, conocida como **HCH técnico** que presenta un alto contenido de  $\alpha$ -HCH y moderados contenidos de  $\gamma$ -HCH, el isómero que realmente presenta la actividad insecticida que caracteriza a este compuesto (relación  $\alpha/\gamma$  variable: 12 a 4; Breivik y col., 1999; Vijgen, 2006). Las industrias dedicadas a la producción de HCH, gracias a métodos de purificación del HCH técnico, llegaron a obtener un producto comercial de alto contenido en isómero  $\gamma$ -HCH (siempre >95%, generalmente, >99%  $\gamma$ -HCH), conocido como **lindano** y utilizado desde la década de 1940 (Tomlin, 2000). Tanto el lindano como el HCH técnico han sido usados tradicionalmente para el control de insectos en frutos, cultivos de grano, cultivos vegetales, bosques, así como para el control de vectores de enfermedades o el tratamiento de semillas, e incluso en tratamientos médicos (problemas de piel, piojos) (WHO, 1991; WHO, 1992; Amadori, 1993). La producción de ambos compuestos fue notablemente elevada a nivel mundial (período 1945-1980), especialmente del HCH técnico (Li, 1999). En la década de 1970 se empezaron a detectar los problemas ambientales que estos compuestos ocasionan (Turnbull, 1996). Si bien la producción de lindano se ha detenido a nivel mundial, no ha sucedido necesariamente lo mismo con su consumo, ya que existe un stock de producto acumulado.

Una vez que los isómeros de HCH han entrado en los suelos, estas sustancias se someten a multitud de procesos (adsorción, absorción, degradación, disolución, evaporación, lavado) que son en gran

medida controlados por parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y edáficos (Wenzel y col., 2002). Los diferentes isómeros de HCH se pierden de los suelos por diversos procesos físicos (volatilización, lavado en el perfil, erosión) así como por descomposición microbiana (biodegradación) o hidrólisis (degradación abiótica) (Quintero Díaz, 2004; Mackenzie y col., 2005). La intensidad de la degradación dependerá de factores ambientales, tales como la temperatura, el tipo de suelo, el pH, el potencial redox, la humedad o el contenido en carbono orgánico, así como de parámetros específicos del propio contaminante (solubilidad acuosa, presión de vapor, constante de la ley de Henry) (Manz y col., 2001; Cousins y col., 1999). Otros procesos que pueden afectar a la pérdida de HCH en los suelos son la acumulación y en ocasiones degradación mediada por las plantas, bien en las raíces, las partes aéreas o en la rizosfera (Kidd y col., 2008). No obstante, los residuos de HCH no permanecen pasivamente en los suelos, sino que pueden ser removilizados (Bedos y col., 2002; Bidleman y col., 2006).

Los suelos agrícolas, a causa de unas tasas de aplicación de pesticidas muy elevadas, se consideran como una fuente potencial de emisión de pesticidas organoclorados "envejecidos" (Harner y col., 1999). De hecho, aunque estos residuos se hayan degradado en alguna proporción, es muy probable que una gran fracción del residuo continúe en los suelos, sometido a volatilización y transporte debido al denominado Efecto de Destilación Global (Wania, 2003). De hecho, el HCH puede ser transportado a gran distancia (vía atmósfera) desde las áreas agrícolas contaminadas o bien desde lugares de desecho o focos de contaminación puntuales, convertidos en reservorios de contaminación de pesticidas obsoletos (Aigner y col., 1998; Toan y col., 2007). En este sentido, la distancia de dicho transporte dependerá de las condiciones locales de equilibrio suelo-atmósfera, de la temperatura, relieve, precipitaciones, altitud, etc. que caracterizan las zonas contaminadas (Daly y col., 2007; Grimalt y col., 2004). Así pues, en los estudios de contaminación puede ser muy controvertido determinar la **fuentes primaria de emisión** de estos compuestos. En este sentido, tanto las diferencias de composición de los isómeros de HCH como la relación entre los isómeros  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH pueden ser utilizadas como un indicio de la existencia de diferentes fuentes de contaminación: HCH técnico y lindano (Toan y col., 2007).

La Comunidad Autónoma de Galicia tiene una vocación tradicionalmente agrícola a pesar de las limitaciones del medio físico, la estructura de la propiedad y la baja rentabilidad del sector hacen de su aptitud para el cultivo en general (Macías y Calvo de Anta, 2001). Galicia presenta una baja superficie dedicada a la agricultura (8 744 Km<sup>2</sup>, un 29.6% del total), que se reparte entre superficie cultivada (14.4%) y prados y/o pastizales (15.1%), concentrándose principalmente en las provincias de Lugo y A Coruña (Xunta de Galicia, 2004). La mayor parte de esta superficie está dedicada a cultivos herbáceos y prados, en zonas bajas. Entre los cultivos herbáceos destacan los cultivos forrajeros, los cereales y tubérculos; por su parte, el viñedo y los frutales constituyen los cultivos leñosos. Respecto a la aptitud para el cultivo de esta superficie, es variable, generalmente inferior a la capacidad teórica, debido a las limitaciones del medio, la estructura de la propiedad y la baja rentabilidad de la agricultura (Macías y Calvo de Anta, 2001). Los suelos de mayor aptitud agronómica se localizan en el sector litoral, penetrando en los valles fluviales, sobre todo en las provincias de A Coruña y Lugo, así como en la zona de desembocadura del río Miño.

Existe una alta probabilidad del uso agrícola de pesticidas organoclorados, (HCH técnico y/o lindano) durante largo período de tiempo en el territorio de Galicia. Además, se ha constatado la existencia

de un gran foco de contaminación por vertido incontrolado de residuos de fabricación de lindano que ha desembocado en la contaminación de suelos, vegetación y aguas en la zona de O Porriño, Pontevedra (Calvelo Pereira y col., 2006). Esta zona podría estar actuando como foco de emisión y transporte de HCH a otras áreas más o menos alejadas. No existen estudios que hayan caracterizado una zona amplia del territorio gallego para conocer la naturaleza, extensión y probables causas de la presencia de HCH en suelos, especialmente los de uso agrícola.

La legislación de la Comunidad Autónoma de Galicia y del Gobierno de España han regulado los niveles máximos aceptables de los isómeros de HCH y otros compuestos debido al riesgo potencial que suponen para los ecosistemas y la salud humana. La legislación de la Comunidad Autónoma de Galicia recoge, de acuerdo con la Ley de Residuos, un valor límite en relación con la concentración de HCH en suelos que permite, con carácter general, la intervención en el caso de suelos que sobrepasen los  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  de concentración de HCH total ( $\alpha+\beta+\gamma$ ), sea cual sea el uso (**concentración límite**; Decreto 263/1999<sup>1</sup>). Por otro lado, la legislación del Estado Español recoge unos **Niveles Genéricos de Referencia** (NGR; Ley 10/98<sup>2</sup>; Real Decreto 9/2005<sup>3</sup>) en función del uso del suelo, que oscilan entre 1 (uso industrial), 0.1 (uso urbano) y  $0.01 \text{ mg kg}^{-1}$  (otros usos) de concentración para algunos isómeros de HCH ( $\alpha, \beta, \gamma$ ). Si los niveles detectados en los suelos son superiores a 100 veces el NGR correspondiente, Administración Autonómica puede considerar que el suelo en cuestión está contaminado y se debe actuar en consecuencia, si bien lo idóneo es la realización de un Análisis de Riesgos específico.

El **objetivo** del presente estudio es conocer y caracterizar la presencia y concentración de residuos de HCH en los suelos agrícolas de Galicia a través del análisis de un número de muestras representativo de la superficie total agrícola de la zona. Se pretende, asimismo, obtener información del origen de los residuos, así como de las propiedades del suelo que puedan tener influencia sobre el comportamiento del HCH en los suelos agrícolas, y evaluar la posible contaminación de estos suelos de acuerdo con la normativa legal vigente.

## 2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.2.1. Área de estudio y toma de muestras

La Comunidad Autónoma de Galicia se encuentra localizada geográficamente entre los 41 y 44º de latitud Norte y los 6 y 9º de longitud Oeste, una posición excéntrica en el suroeste del continente europeo. La superficie total del territorio es de  $29\,574 \text{ Km}^2$ , repartida entre diferentes zonas altimétricas (Xunta de Galicia, 2004). Galicia es una región oceánica peninsular, con grandes precipitaciones aunque repartidas de modo muy irregular (precipitación anual ponderada:  $1\,180 \text{ mm}$ ); la temperatura media ponderada de Galicia es de  $13.3 \text{ }^\circ\text{C}$ , variable con la estación. Tanto temperatura como precipitación, se integran de modo genérico con la altitud y el relieve accidentado del territorio gallego (Martínez Cortizas y Pérez Alberti,

---

<sup>1</sup> Decreto 263/1999, do 30 de setembro, polo que se fixa a concentración límite en solos afectados por vertidos de residuos de HCH. Corrección de erros (29 outubro) Decreto 263/1999, do 30 de setembro, polo que se fixa a concentración límite en solos afectados por vertidos de residuos de HCH.

<sup>2</sup> Ley 10/98, de 21 de abril, de Residuos.

<sup>3</sup> Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

## Hexaclorociclohexano en suelos agrícolas de Galicia

1999). Las rocas graníticas (granitos, granodioritas, gneises, etc.) constituyen el material geológico más abundante de Galicia; en la parte oriental de Galicia se localizan amplias zonas con pizarras y filitas, materiales metamórficos de bajo grado; en diversos enclaves de A Coruña y Pontevedra se localizan materiales básicos (rocas ígneas y metamórficas) con bajos contenidos en cuarzo y minerales resistentes; en la zona centro y centro sur de Galicia hay esquistos con metamorfismo de bajo orden, relativamente alterables; por último, existen pequeños enclaves de serpentinitas y rocas carbonatadas, así como amplias zonas cubiertas por sedimentos terciarios y cuaternarios, asociados a las desembocaduras de los ríos y a las cuencas tectónicas (Macías y Calvo de Anta, 2001). Los suelos de Galicia presentan una variedad originada por la litología y el grado de alteración de material de partida. Otros factores que influyen son la posición topográfica, el tiempo de evolución, la erosión y la influencia humana. Una secuencia típica de suelos en Galicia es Leptosol-Regosol-Cambisol, si bien en todo el territorio se encuentran una gran variedad de suelos (Macías y Calvo de Anta, 2001). La aptitud agronómica es variable, aunque tendiendo a ser baja.

**Tabla 2.1.** a) Propiedades físico-químicas de los isómeros principales de HCH; (b) resumen de la composición del HCH técnico, HCH de grado técnico o mezclas técnicas de isómeros de HCH; (c) composición media del lindano.

<b>a) Propiedades físico-químicas del HCH</b>						
Propiedad	$\alpha$ -BCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	$\delta$ -HCH	Referencia	
Solubilidad acuosa (mg L <sup>-1</sup> )	10	5	7.3	10	Prager, 1995	
	1.6	0.32	6.2	9.0	Manz y col., 2001.	
Log K <sub>ow</sub>	3.8	3.78	3.61-3.72	4.14	Prager, 1995.	
	3.81	3.80	3.80	4.10	Suntio y col., 1988.	
Presión Vapor (Pa, 20°C)	5.3 10 <sup>-3</sup>	4.3 10 <sup>-5</sup>	2.9 10 <sup>-3</sup>	2.3 10 <sup>-3</sup>	Manz y col., 2001.	
Constante Ley Henry, H, (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	0.870	0.120	0.130	0.073	Suntio y col., 1988.	

<b>b) HCH técnico</b>						
Porcentaje						
$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	$\delta$ -HCH	Otros	$\alpha/\gamma$ (aprox.)	Referencia
65-70	7-10	14-15	1-2	1-2	5	WHO, 1992.
76.1	3	13.8	7.1	-	5	Buser y Mueller, 1995.
60-70	5-12	10-12	6-10	3-4	6	Willet y col., 1998.
55-80	5-14	8-15	2-16	1-5	4-7	Breivik y col., 1999.
55-80	5-14	8-15	2-16	3-5	5-7	Li, 1999.
60-70	5-12	10-15	6-10	3-4	4-6	Walker y col., 1999.
67-70	13	5-6	6	-	12	Fabre y col., 2005.

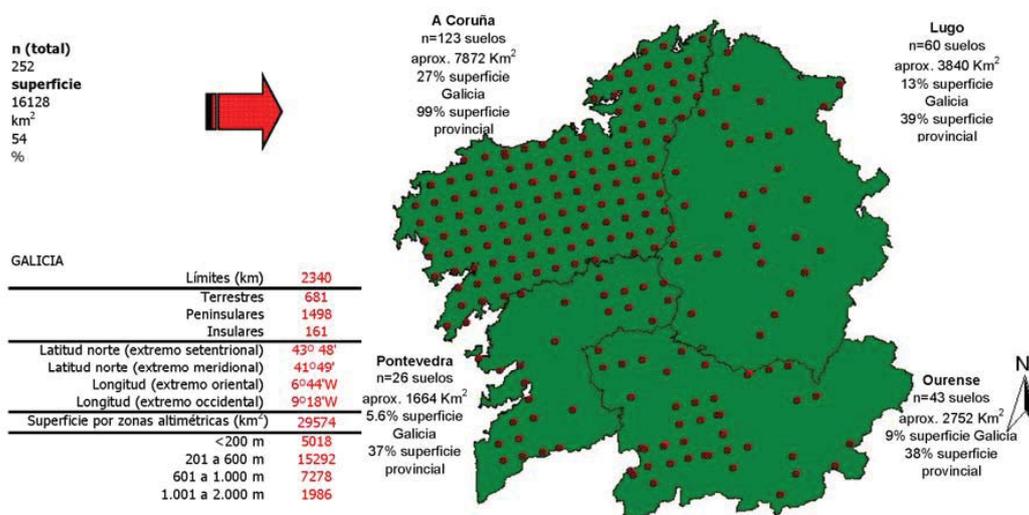
  

<b>c) Lindano</b>		
Porcentaje		
$\gamma$ -HCH	Otros	Referencia
>99	<1	WHO, 1991.
99-99.5	0.5-1	Fabre y col., 2005
$\gamma$ -HCH casi puro		Li y Vijgen, 2006.

La cuadrícula de muestreo básica fue una malla con intervalos de 8 por 8 km. El número total de muestras de suelo obtenidas durante 2003-2004 en la Comunidad Autónoma de Galicia fue de 252, lo que se corresponde con una superficie de 16 128 km<sup>2</sup>, el 54% del total (Figura 2.1). La distribución por

provincias de las muestras se relaciona con la superficie agrícola disponible y el relieve, en base a una caracterización cartográfica previa. Los puntos de muestreo fueron georeferenciados y en cada uno se obtuvo una muestra compuesta a partir de 19 - 21 submuestras tomadas de los 25 cm superiores del horizonte superficial en un patrón cruzado, con 10 m de distancia entre los incrementos. Todo el proceso de selección de los puntos de muestreo georeferenciados, descripción del área y toma de muestras está descrito con gran detalle en López Arias y Grau Corbí (2004a, 2004b).

Para cada muestra se dispone de los siguientes datos: contenidos en carbono, nitrógeno y azufre (%), relación C/N, pH (agua y KCl), granulometría (% arena, limo y arcilla), así como los contenidos de diferentes elementos (Fe, Al, Ti, Cu, Hg, Se, Pb, Cd, Ni, Zn) (Tabla 2.2). Otras variables de las que se dispone información son: litología (tipo de material de partida) y tipo de cultivo dominante, factores que a priori podrían informar sobre la composición de los suelos o bien la distribución del HCH. Se trata de suelos de textura generalmente arenosa (franco arenosa), muy relacionado con el material de partida (dominio de rocas graníticas). El porcentaje de carbono de la capa superficial varía entre 0.4 y 17 (media: 6.6%). El pH de los suelos muestreados es generalmente bajo (media: 5.2), aunque se encuentran valores máximos de hasta 6.4, relacionados con el manejo agrícola característico de los suelos gallegos (Calvo de Anta y col., 1992). Los diferentes elementos analizados se encuentran en niveles medios normales dentro de los suelos agrícolas.



**Figura 2.1.** Mapa de localización de los puntos de muestreo, destacando las características generales de la región muestreada.

Adicionalmente, se han calculado dos nuevas variables,  $K_d$  y  $CaRc$ .  $K_d$  es el coeficiente de distribución de un pesticida en un suelo ( $L\ kg^{-1}$ ), relacionado con el contenido en carbono orgánico del mismo y con el coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) de modo que  $K_{oc}=0.41K_{ow}$  y  $K_d=\gamma K_{oc}$  siendo  $\gamma$  la fracción de carbono orgánico del suelo (Mackay, 2001; Wauchope y col., 2002). Es una aproximación

## Hexaclorociclohexano en suelos agrícolas de Galicia

sencilla a la capacidad de retención de HCH en los suelos. Por otro lado, el Cociente Arcilla-Carbono (CaRC = %arcilla / %C) puede caracterizar cual es la contribución de la fracción mineral a la sorción de un pesticida (Green y Karichoff, 1990; Liu y col., 2008).

**Tabla 2.2.** Resumen estadístico de algunas de las propiedades generales de los suelos agrícolas de Galicia muestreados.

Galicia		mínimo	máximo	media	d. s. <sup>1</sup>	mediana
C	%	0.4	17.0	6.6	3.3	5.9
N	%	0.2	1.4	0.5	0.3	0.5
S	%	0.02	0.17	0.06	0.02	0.05
pH(H <sub>2</sub> O)		4.1	6.4	5.2	0.4	5.2
pH(KCl)		3.2	7.6	4.4	0.5	4.3
arena	%	1.2	90.4	63.3	15.4	66.0
limo	%	2.0	74.8	22.9	12.4	20.2
arcilla	%	3.5	29.4	13.8	5.1	12.9
Fe	mg kg <sup>-1</sup>	667.0	95102.0	30072.5	16399.8	33552.0
Al	mg kg <sup>-1</sup>	9778.0	123765.0	48033.8	17818.4	49328.5
Ti	mg kg <sup>-1</sup>	140.0	1640.0	725.2	280.3	700.0
Cu	mg kg <sup>-1</sup>	3.0	86.0	24.2	15.4	24.0
Hg	μg kg <sup>-1</sup>	19.6	238.7	80.1	33.9	74.7
Se	μg kg <sup>-1</sup>	295.0	2044.0	1008.9	378.3	989.0
Pb	mg kg <sup>-1</sup>	8.0	271.0	25.8	25.0	22.0
Cd	μg kg <sup>-1</sup>	38.0	426.0	146.4	76.4	130.0
Ni	mg kg <sup>-1</sup>	6.0	595.0	32.3	53.2	24.0
Zn	mg kg <sup>-1</sup>	20.0	184.0	64.9	28.9	60.0

<sup>1</sup> d. s.: desviación estándar.

### 2.2.2. Análisis de isómeros de HCH en suelos

*Reactivos.* α-HCH (98.7% de pureza) de Riedel-de-Haën AG; β-HCH (98.1% de pureza) de Riedel-de-Haën AG; γ-HCH (99% de pureza) de Sigma; δ-HCH (98.6% de pureza) de Riedel-de-Haën AG; Sulfato sódico anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (99% de pureza) de Panreac; Hexano (95% de pureza) de Fluka; Acetona (99.5% de pureza) de Fluka; Acetato de etilo (99.8% de pureza) de Sigma; Carutchos Sep Pak ® 20 cc (5 g) Florisil ®; Alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (neutra) de Sigma.

*Método de extracción de HCH en suelos.* Las muestras de suelo secadas y tamizadas por luz de malla 2 mm fueron molidas para reducir el tamaño de partícula (hasta <50 μm). Se realizó una extracción de 0.08 g de muestra de suelo con 8 mL de una disolución hexano:acetona (1:1), en un baño de ultrasonidos. Se pasaron por filtros de fibra de vidrio, se enrasaron a 10 mL con hexano y se realizaron distintas diluciones para alcanzar el rango adecuado para la posterior determinación por cromatografía en caso de ser necesario. Los extractos se conservaron en nevera a -4°C.

*Procedimiento de análisis cromatográfico.* Para realizar la identificación y cuantificación de los distintos isómeros de HCH se utilizó un equipo de cromatografía de gases con detector de captura

electrónica (GC/ECD). El cromatógrafo de gases es un modelo GC 8532 Mega 2 series (Fisons Instruments, Milan, Italia) equipado con un detector de captura electrónica modelo ECD 850 (Thermo Quest, Milan, Italia). Se trabajó con un equipo de inyección automática (modelo AS 800, Fisons Instruments, Milan, Italia) de tipo split/splitless en modo splitless. El volumen de inyección utilizado fue de 1  $\mu\text{L}$ . Para la separación de los distintos isómeros se usó una columna capilar Rtx®-ClPesticides (Restek Corporation, E.E.U.U. Bellefonte, PA) de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno con una fase estacionaria adosada al capilar. La temperatura de inyección es de 270°C y la temperatura del detector, de 300°C. Como gas portador se usó helio (He), con una presión de 115 KPa y como gas auxiliar del detector se usó nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), con una presión de 105 KPa. Se trabajó en condiciones de gradiente de temperatura, con un programa que partía de 60°C (3 min) con una rampa de temperatura de 30°C  $\text{min}^{-1}$ , hasta 180°C (0 min), luego una segunda rampa de 6°C  $\text{min}^{-1}$ , hasta 230°C (0 min), para finalizar con una rampa de 30°C  $\text{min}^{-1}$  hasta 270°C (4 min). Las curvas de calibración se obtuvieron por inyección de disoluciones patrón en hexano de la mezcla de los 4 isómeros, preparadas a partir de una disolución inicial de 500  $\text{mg L}^{-1}$  en acetona, de concentraciones 1, 5, 10 y 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Para evaluar la presencia de picos cromatográficos que pudiesen interferir se ha utilizado un suelo como **muestra blanco**, preparado del mismo modo que los suelos agrícolas, aproximadamente cada 10 muestras. El **límite de cuantificación**, determinado de acuerdo con las recomendaciones de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos en el caso de análisis de residuos de pesticidas (EPA, 2000), fue de 1.6  $\text{ng g}^{-1}$ . En los casos en los que el HCH no fue detectado o su concentración fue inferior de dicho límite, se utilizó el 65% de dicho valor, considerado como límite de detección (1.0  $\text{ng g}^{-1}$ ) para la presentación de los resultados y el análisis estadístico.

### 2.2.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se ha utilizado el paquete SPSS 14.0. En primer lugar se ha hecho un **análisis exploratorio** de los datos. Se ha realizado una comparación **medias** agrupando las muestras en función de las distintas variables edáficas: se han utilizado pruebas paramétricas (test t, análisis de la varianza-ANOVA) o pruebas no paramétricas (prueba U de Mann Whitney, prueba U de Kruskal-Wallis). Asimismo, se han analizado las correlaciones que las diferentes variables presentaban entre sí.

Por otro lado, el tamaño de la base de datos disponible facilita la aplicación de técnicas de análisis estadístico más complejas como el **análisis multivariante** de los datos. Este análisis puede ofrecer una información fundamental sobre las relaciones que se establecen entre los niveles de contaminación y las diferentes propiedades de los suelos, así como las relaciones entre las propiedades de los suelos (Sena y col., 2002; Zhang y col., 2007; Martínez Cortizas y col., 2007a,b). No todos los parámetros pudieron analizarse en el conjunto de los puntos de muestreo, lo que supone que el número de casos disponible puede ser diferente en función de la variable que se considere. En este estudio se ha optado por dar preferencia al mayor número de casos posible para optimizar el análisis de las variables cuantitativas. El objetivo del análisis multivariante es la reducción de los datos a través de técnicas de exploración que facilitan la comprensión de la estructura de la varianza de la población y los factores principales que controlan la misma. El análisis de **conglomerados jerárquicos** se ha ejecutado para todas las variables de este estudio salvo el cociente  $\alpha/\gamma$ , que no ha proporcionado información adicional, distorsionando la

**Hexaclorociclohexano en suelos agrícolas de Galicia**

**Tabla 2.3.** Resultados principales obtenidos en el análisis de residuos de HCH en suelos agrícolas de Galicia. a) número de muestras y porcentaje de positivos; b) valores de concentración (ng g<sup>-1</sup>) mínimo, máximo, medio (media geométrica y media aritmética), desviación estándar y mediana del HCH total (suma de  $\alpha+\beta+\gamma+\delta$ ) y de los isómeros individuales.

a)	N total		positivos		%		b)						
	HCH total	$\alpha/\gamma^2$	HCH total	$\alpha/\gamma^2$	HCH total	$\alpha/\gamma^2$	mínimo	máximo	media geométrica	media aritmética	desviación estándar	mediana	
<b>Galicia</b>	HCH total	252	174	69	HCH total	<l. d. <sup>1</sup>	2305.1	200.3	327.8	82.8			
	$\alpha$ -HCH	169	67	$\alpha$ -HCH	<l. d.	1404.4	122.1	216.5	70.2				
	$\beta$ -HCH	15	6	$\beta$ -HCH	<l. d.	867.1	13.7	69.7	1.0				
	$\gamma$ -HCH	65	26	$\gamma$ -HCH	<l. d.	569.2	60.3	119.4	1.0				
	$\delta$ -HCH	11	4	$\delta$ -HCH	<l. d.	181.3	4.2	16.6	1.0				
	$\alpha/\gamma^2$	62	25	$\alpha/\gamma^2$	0.2	7.0	1.6	1.3	1.5				
<b>A Coruña</b>	HCH total	123	108	88	HCH total	<l. d.	2305.1	336.8	418.2	161.8			
	$\alpha$ -HCH	106	86	$\alpha$ -HCH	<l. d.	1404.4	193.6	285.6	79.0				
	$\beta$ -HCH	9	7	$\beta$ -HCH	<l. d.	867.1	19.4	92.9	1.0				
	$\gamma$ -HCH	61	50	$\gamma$ -HCH	<l. d.	569.2	13.7	146.0	1.0				
	$\delta$ -HCH	11	9	$\delta$ -HCH	<l. d.	181.3	1.5	23.4	1.0				
	$\alpha/\gamma$	61	50	$\alpha/\gamma$	0.2	7.0	1.6	1.3	1.7				
<b>Lugo</b>	HCH total	60	49	82	HCH total	<l. d.	517.4	60.2	97.2	89.5			
	$\alpha$ -HCH	49	82	$\alpha$ -HCH	<l. d.	216.5	41.6	58.9	86.5				
	$\beta$ -HCH	6	10	$\beta$ -HCH	<l. d.	255.7	1.7	50.8	1.0				
	$\gamma$ -HCH	1	2	$\gamma$ -HCH	<l. d.	112.2	1.1	14.4	1.0				
	$\delta$ -HCH	<l. d.	<l. d.	$\delta$ -HCH	<l. d.	<l. d.	-	-	-				
	$\alpha/\gamma$	-	-	$\alpha/\gamma$	-	-	-	-	-				
<b>Ourense</b>	HCH total	43	15	35	HCH total	<l. d.	420.0	12.1	73.4	4.0			
	$\alpha$ -HCH	14	33	$\alpha$ -HCH	<l. d.	417.0	4.4	72.7	1.0				
	$\beta$ -HCH	<l. d.	<l. d.	$\beta$ -HCH	<l. d.	<l. d.	-	-	-				
	$\gamma$ -HCH	1	2	$\gamma$ -HCH	<l. d.	112.5	1.1	17.0	1.0				
	$\delta$ -HCH	<l. d.	<l. d.	$\delta$ -HCH	<l. d.	<l. d.	-	-	-				
	$\alpha/\gamma$	-	-	$\alpha/\gamma$	-	-	-	-	-				
<b>Pontevedra</b>	HCH total	26	2	8	HCH total	<l. d.	447.5	5.4	88.6	4.0			
	$\alpha$ -HCH	<l. d.	<l. d.	$\alpha$ -HCH	<l. d.	<l. d.	-	-	-				
	$\beta$ -HCH	<l. d.	<l. d.	$\beta$ -HCH	<l. d.	<l. d.	-	-	-				
	$\gamma$ -HCH	2	8	$\gamma$ -HCH	<l. d.	444.5	1.5	88.6	1.0				
	$\delta$ -HCH	<l. d.	<l. d.	$\delta$ -HCH	<l. d.	<l. d.	-	-	-				
	$\alpha/\gamma$	-	-	$\alpha/\gamma$	-	-	-	-	-				

<sup>1</sup> <l. d. inferior al límite de detección (1.0 ng g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>  $\alpha/\gamma$  es el cociente  $\alpha$ -HCH/ $\gamma$ -HCH; <sup>3</sup> -cálculo no posible

formación de grupos. Los datos se han estandarizado (puntuaciones  $Z$ :  $Z_i = (x_i - M) / DS$ ; donde  $x_i$  es el dato de la variable  $x$  en la muestra  $i$ ,  $M$  es el valor medio de  $x$  en la población total y  $DS$  es la desviación estándar de la media), evitando así el efecto de la escala ocasionado por los órdenes de magnitud diferentes en las unidades de medida de cada variable. El análisis de **componentes principales** permite la reducción de datos a través de la obtención de nuevas variables resultado de la combinación lineal de las variables originales. Estas nuevas variables, los componentes, cumplen una serie de condiciones (son ortogonales, no se correlacionan entre si) que facilitan la explicación sucesiva del máximo de la varianza de las variables originales. El análisis de componentes principales se ha realizado en base a la optimización del número de casos, descartando por ello variables que no aportan una gran explicación de la varianza de los componentes encontrados (porcentaje de arena, limo, arcilla, cociente  $\alpha/\gamma$ ). La decisión de excluir estas variables se ha tomado tras una serie de análisis previos.

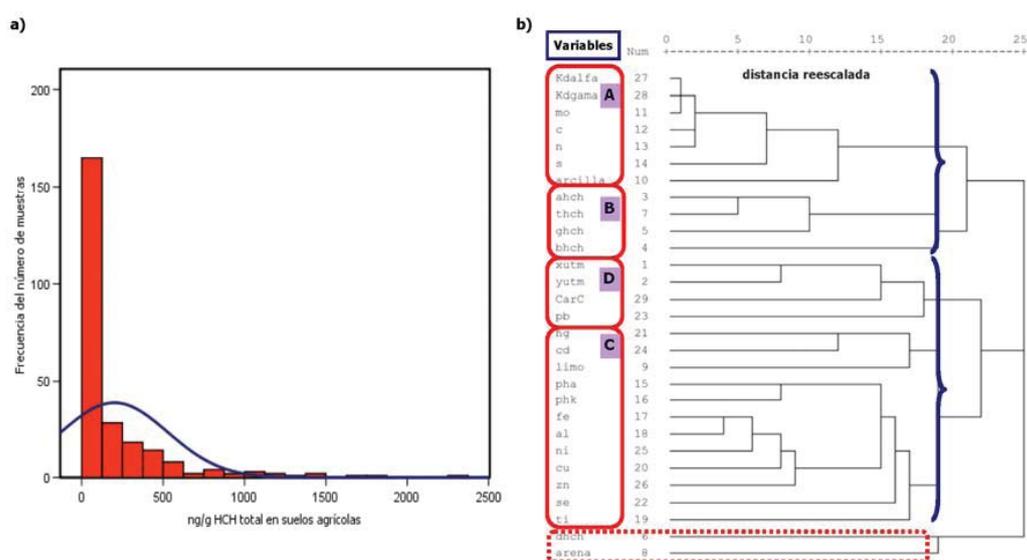
### 2.3. RESULTADOS

#### 2.3.1. Concentración y composición de los isómeros de HCH en los suelos agrícolas de Galicia

Los suelos agrícolas analizados presentan residuos de los isómeros de HCH más importantes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ ) en la capa superficial (25 cm), si bien en concentraciones muy variables. El HCH total (suma de  $\alpha + \beta + \gamma + \delta$ ) ha sido encontrado en cantidades superiores al límite de detección en el 70% de las muestras estudiadas (Tabla 2.3). El 67% de las muestras revelaron contenidos de residuos de  $\alpha$ -HCH; este isómero es, con diferencia, el isómero principal (Tabla 2.3). El siguiente isómero mayoritario es el  $\gamma$ -HCH, detectado en el 25 % de las muestras, siendo muy escasa la presencia de los isómeros  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH (inferior a un 10% del total de muestras analizadas). En muy pocos puntos de muestreo se han encontrado los cuatro isómeros al mismo tiempo. En cuanto a la distribución espacial de los isómeros de HCH, existen grandes diferencias entre las provincias. A Coruña es la zona que revela una mayor presencia de HCH total (el 88% de las muestras presentan niveles superiores al límite de detección). En este caso son el isómero  $\gamma$ -HCH (presente en el 50% del total de muestras) y, sobre todo, el  $\alpha$ -HCH (presente en el 86% del total de muestras) los que constituyen el residuo de HCH total (Tabla 2.3). Por su parte, en la provincia de Lugo, el 82% de los suelos analizados presentaron niveles de HCH total por encima del límite de detección, siendo  $\alpha$ -HCH el isómero mayoritario y casi exclusivo. En cuanto a la provincia de Ourense, tan solo el 35% de las muestras mostraron niveles significativos de HCH total, mientras que en el caso de Pontevedra, se ha encontrado HCH en menos del 10% de las muestras analizadas (Tabla 2.3)

A nivel de Galicia, la concentración de HCH total se encuentra entre niveles inferiores al límite de detección y 2305 ng g<sup>-1</sup> (suelo seco), con un valor medio de 200 ng g<sup>-1</sup> (mediana: 83 ng g<sup>-1</sup>; Tabla 2.3b). Los isómeros mayoritarios son  $\alpha$ -HCH (rango: <1 – 1 404 ng g<sup>-1</sup>) y  $\gamma$ -HCH (rango: <1 – 569 ng g<sup>-1</sup>), con valores medios de 122 y 60 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 2.3b). Las concentraciones de los isómeros  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH oscilan en unos niveles relativamente bajos (rango  $\beta$ -HCH: <1 - 867 ng g<sup>-1</sup>; rango  $\delta$ -HCH: <1 - 181 ng g<sup>-1</sup>), con unos valores medios de 14 y 4 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. La distribución de frecuencias es aproximadamente log-normal, para el HCH total y para el resto de los isómeros individuales (Figura 2.2).

La provincia de A Coruña es la que presenta los niveles más elevados, tanto de HCH total (rango:  $<1 - 2\ 305\ \text{ng g}^{-1}$ ; media: 337) como de los isómeros mayoritarios:  $\alpha$ -HCH, rango de concentraciones que oscila entre 1 y 1 404  $\text{ng g}^{-1}$  (media: 194) y  $\gamma$ -HCH, rango de concentraciones que oscila entre 1 y 570  $\text{ng g}^{-1}$  (media: 116) (Tabla 2.3b). En la provincia de Lugo el HCH total oscila entre  $<1$  y 517  $\text{ng g}^{-1}$  (media: 110); si bien existe una destacable presencia de residuos de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH, sus niveles de concentración son inferiores a los vistos en A Coruña, oscilando entre 1 – 216 y 1 – 212  $\text{ng g}^{-1}$ , (valores medios: 90 y 3, respectivamente). En las provincias de Ourense y Pontevedra el HCH se ha detectado en un pequeño número de muestras oscilando en unas concentraciones más bajas (HCH total, rango:  $<1-447\ \text{ng g}^{-1}$ ).



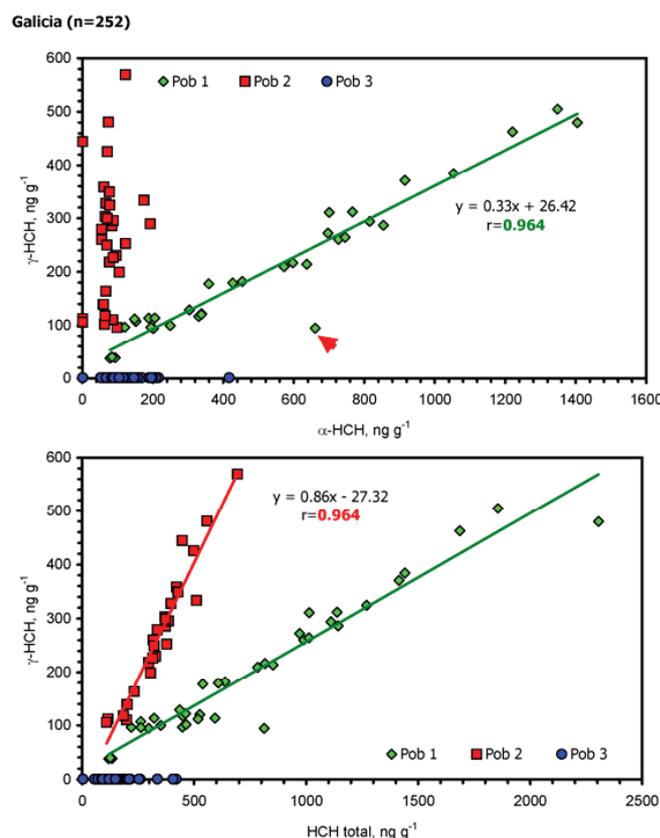
**Figura 2.2.** a) Distribución de frecuencias y curva normal de los pesticidas analizados (HCH total); b) Dendograma del análisis de conglomerados jerárquicos con las variables consideradas.

Por otro lado, el cociente entre los dos isómeros principales de HCH detectados,  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH, es muy variable, oscilando entre 0.2 y 7.0 (media: 1.6; Tabla 2.3). Este cociente se ha calculado únicamente en los puntos de muestreo que presentan concentraciones de ambos isómeros significativamente diferentes al límite de detección (el 25% de los puntos de muestreo).

### 2.3.2. Distribución del HCH y efecto de las propiedades del suelo

No se han encontrado diferencias significativas entre los contenidos de HCH (ni HCH total ni alguno de los isómeros individuales) en función de las variables cualitativas analizadas (litología, tipo de cultivo, textura). El análisis de Conglomerados Jerárquicos nos permite ver la asociación entre las distintas variables (Figura 2.2). Los isómeros de HCH se asocian entre sí (conglomerado B), principalmente HCH total y  $\alpha$ -HCH, reflejando el dominio de este isómero. A continuación, el isómero  $\gamma$ -HCH se asocia y, finalmente, el  $\beta$ -HCH, pero a gran distancia. La materia orgánica se asocia a muy corta distancia con las variables C, N, S y  $K_d$ , tal como era de esperar (conglomerado A; Figura 2.2b). Asimismo, a este grupo se incorpora la arcilla,

aunque a una distancia superior. Estos dos conglomerados se asocian finalmente, separándose del resto de variables. De ellas, el conglomerado C agrupa distintos con el pH y el limo. Las variables geográficas forman otro grupo con el contenido en plomo y el cociente arcilla/carbono orgánico (conglomerado D). Las variables  $\delta$ -HCH y porcentaje de arena no se agrupan en los conglomerados principales definidos



**Figura 2.3.** Relación  $\alpha$  vs.  $\gamma$ -HCH y  $\gamma$ -HCH vs. HCH total en el conjunto de todas las muestras analizadas. Pob 1, Pob 2 y Pob 3 son, respectivamente, las Poblaciones de datos encontradas en este estudio (1, 2 y 3).

Las relaciones entre el HCH y las propiedades del suelo no son claras, por lo que se ha prestado mayor atención a las relaciones entre los isómeros. Se han representado las correlaciones entre los isómeros mayoritarios y entre éstos y el HCH total, con lo que se aprecia claramente la existencia de diferentes **grupos de datos** o **poblaciones de muestras**, tanto a nivel de toda Galicia (Figura 2.3) como en la provincia que presenta mayor contaminación, A Coruña (Figura 2.4). Cada una de estas poblaciones presenta una distribución de los isómeros particular. La correlación entre el isómero  $\alpha$ -HCH y el  $\gamma$ -HCH es muy alta en la Población 1 ( $r=0.963$  en el conjunto de muestras de Galicia;  $r=0.965$  en A Coruña). Además, los niveles de  $\alpha$ -HCH son significativamente más elevados que en las Poblaciones 2 y 3 ( $P<0.05$ ; Tabla 2.4). El valor del cociente  $\alpha/\gamma$  también es significativamente mayor en la Población 1 con respecto a la Población 2 (medias: 2.6 y 0.4, respectivamente;  $P<0.05$ ).

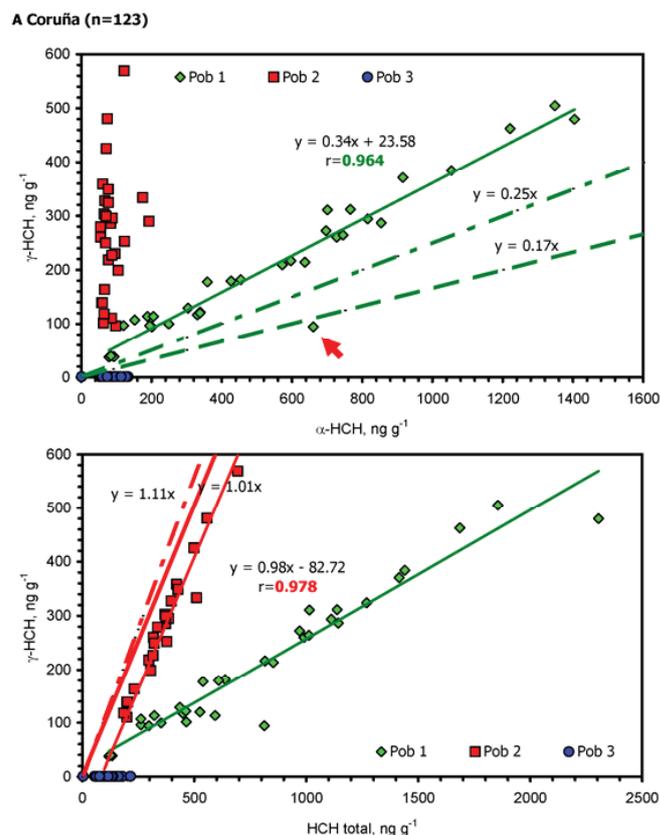
**Hexaclorociclohexano en suelos agrícolas de Galicia**

**Tabla 2.4.** Resumen estadístico de las variables estudiadas en cada una de las poblaciones de datos definidas (Pob 1, Pob 2, Pob 3). Estadística referida a la provincia de A Coruña.

Variable	POB 1 (n=31)				POB 2 (n=30)				POB 3 (n=62)						
	min.	max.	media	d.s. <sup>1</sup> mediana	min.	max.	media	d.s. mediana	min.	max.	media	d.s. mediana			
$\alpha$ -HCH <sup>2</sup>	79.0	1404.4	566.6	366.8	572.5	55.2	193.1	89.1	34.8	77.4	1.0	133.5	57.6	39.5	64.6
$\beta$ -HCH	1.0	419.9	25.0	80.3	1.0	1.0	867.1	43.9	165.9	1.0	1.0	151.8	4.8	21.9	1.0
$\gamma$ -HCH	37.5	504.9	212.9	131.0	181.8	96.2	569.2	254.4	117.4	256.4	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0
$\delta$ -HCH	1.0	181.3	14.6	37.1	1.0	1.0	66.9	3.2	12.0	1.0	1.0	72.1	6.1	17.6	1.0
HCH total	118.5	2305.1	819.1	523.3	783.9	185.3	1270.3	390.6	207.8	353.3	4.0	215.8	69.6	48.1	69.5
$\alpha/\gamma$	1.7	7.0	2.6	0.9	2.6	0.2	1.4	0.4	0.3	0.4	-	-	-	-	-
C (%)	1.6	14.1	6.8	3.7	6.1	2.4	17.0	8.2	3.4	8.0	0.4	15.2	6.3	3.3	5.8
N (%)	0.16	1.13	0.52	0.29	0.49	0.19	1.41	0.66	0.29	0.69	0.17	1.08	0.49	0.24	0.46
S (%)	0.02	0.11	0.06	0.02	0.05	0.03	0.17	0.07	0.03	0.06	0.03	0.10	0.05	0.02	0.05
CN	10.0	20.9	13.0	2.2	12.5	9.6	15.6	12.7	1.5	12.6	1.2	17.7	12.8	2.4	12.9
pH H <sub>2</sub> O	4.1	5.9	5.3	0.4	5.4	4.3	6.3	5.1	0.5	5.1	4.2	7.6	5.2	0.6	5.1
pHKCl	3.5	5.3	4.5	0.4	4.5	3.6	5.4	4.4	0.5	4.4	3.2	7.6	4.5	0.7	4.4
arena (%)	41.6	79.4	60.2	11.3	64.3	25.2	79.7	60.8	11.6	61.9	33.9	78.3	57.5	13.5	60.9
limo (%)	10.4	42.4	23.8	8.8	22.0	12.8	45.4	22.6	8.1	21.1	10.1	53.3	27.6	11.3	24.9
arcilla (%)	10.0	22.3	16.1	3.9	16.3	3.8	29.4	16.5	5.1	16.7	5.3	23.7	14.9	4.8	13.6
Fe <sup>3</sup>	667	81770	32822	15137	36108	7999	44662	26707	12733	27997	7110	95102	36530	18277	36885
Al	9778	83103	49614	17135	53439	13110	77770	44808	16447	46107	12888	123765	53481	19883	52884
Ti	160	1080	658	223	630	140	1260	701	220	690	380	1640	798	298	740
Cu	5	53	26	13	26	6	56	22	14	22	3	86	28	18	26
Hg	27	142	82	32	81	49	213	91	37	84	33	239	85	36	78
Se	395	1703	1002	377	1006	328	1870	952	387	927	341	2044	1083	323	1066
Pb	9	33	21	5	21	13	43	23	7	22	8	271	34	42	23
Cd	54	339	142	68	123	45	426	174	100	141	71	335	155	59	137
Ni	6	595	51	107	33	7	53	25	13	24	6	193	32	33	23
Zn	29	184	71	34	61	22	108	58	26	46	20	163	65	29	59
Kd $\alpha$ -HCH <sup>4</sup>	21.5	357.0	160.8	87.7	167.3	63.6	431.9	202.6	82.8	200.9	49.1	426.0	159.9	87.0	140.7
Kd $\gamma$ -HCH	21.0	348.8	157.2	85.7	163.5	62.2	422.0	198.0	80.9	196.3	48.0	416.3	156.3	85.0	137.5
CAR <sup>5</sup>	1.7	13.0	4.3	2.8	3.3	1.1	6.4	2.6	1.2	2.4	1.1	6.6	3.1	1.4	3.0

<sup>1</sup> d.s.: desviación estándar; <sup>2</sup> Concentraciones de HCH en ng g<sup>-1</sup>; <sup>3</sup> Concentraciones de los diferentes elementos químicos en mg Kg<sup>-1</sup> (Hg, Se y Cd,  $\mu$ g Kg<sup>-1</sup>); <sup>4</sup> Kd: coeficiente de distribución del isómero indicado entre la fase acuosa y el suelo; L kg<sup>-1</sup>; <sup>5</sup> CARC: cociente arcilla (%) / contenido en carbono orgánico (%).

La Población 2, por su parte, presenta como isómero mayoritario el  $\gamma$ -HCH, determinando la composición del HCH total. El valor medio de concentración de  $\gamma$ -HCH es significativamente superior al que presenta la población 1 (254 y 213 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente; P<0.05; Tabla 2.4). La Población 3, finalmente, se caracteriza por constituir el grupo más numeroso de muestras y además, el isómero  $\alpha$ -HCH esta presente casi en exclusiva, si bien en unos niveles un orden de magnitud inferior si se comparan con los detectados en la Población 1 (concentración media, Población 1: 567 ng g<sup>-1</sup>, Población 3: 58 ng g<sup>-1</sup>).



**Figura 2.4.** Relación  $\alpha$  vs.  $\gamma$ -HCH y  $\gamma$ -HCH vs. HCH total en las muestras de la provincia de A Coruña. Pob 1, Pob 2 y Pob 3 son, respectivamente, las Poblaciones de datos encontradas en este estudio (1, 2 y 3).

Respecto a las propiedades de los suelos, en los grupos de muestras definidos por estas tres Poblaciones, se caracterizan por pequeñas diferencias en los contenidos medios de los elementos analizados (Fe, Al, Ti, Cu, Hg, Se, Pb, Cd, Ni, Zn; Tabla 2.4). Así, por ejemplo, la Población 2 presenta niveles medios de cadmio elevados (174  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), niveles de níquel y zinc bajos (25 y 58  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente), en relación con las otras dos poblaciones. La textura de los diferentes grupos de muestras, no obstante, es muy similar, dominando suelos con tendencia arenosa. Por otro lado, la Población 2 presenta un mayor contenido medio de materia orgánica (significativo a P<0.05; Tabla 2.4), así como valores mayores de carbono, nitrógeno y azufre. Finalmente, los suelos de la Población 2 presentan el cociente arcilla-carbono orgánico más bajo (CARC; Tabla 2.4).

## Hexaclorociclohexano en suelos agrícolas de Galicia

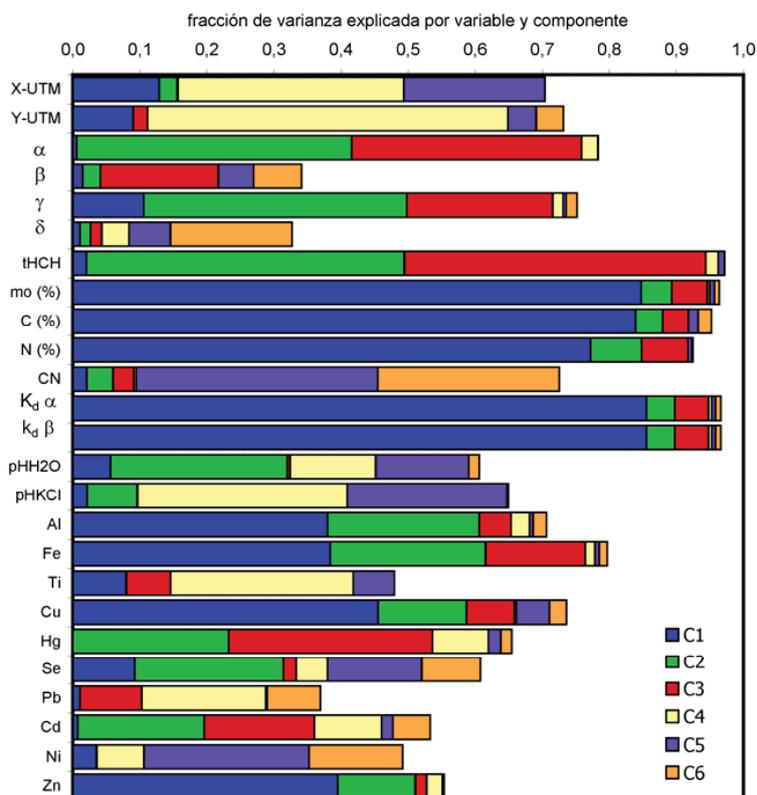
El Análisis de Componentes Principales es útil para caracterizar las relaciones de las propiedades del suelo y los isómeros de HCH analizados. Se ha utilizado la base de datos conjunta, sin considerar las Poblaciones 1, 2 y 3, asegurando así un número suficiente de datos para el análisis. Seis componentes principales (**C1-C6**) tienen autovalores superiores a 1 y representan el 69% de la varianza total (Tabla 2.5). Los tres primeros componentes (**C1**, **C2** y **C3**) explican hasta un 50% de la varianza total. **C1** se caracteriza por cargas (o correlaciones componente-variable original) fuertemente positivas de la materia orgánica, el carbono, el nitrógeno y los coeficientes de reparto (0.879-0.925) y por las cargas negativas de varios elementos como aluminio, hierro, cobre y Zn (-0.616 a -0.675) (Tabla 2.5). Por otro lado, **C2** se asocia fundamentalmente a las variables relacionadas con el HCH (cargas 0.626 a 0.689 para  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH y HCH total), así como al pH en agua (0.513), el aluminio y el hierro (0.476-0.481) (Tabla 2.5). La varianza de **C3**, por su parte, esta caracterizada con las cargas del mercurio (0.551) y en menor medida con el cadmio (0.405), mientras que  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH y HCH total presentan cargas negativas relativamente altas (entre -0.467 y -0.671). El resto de componentes principales no presentan un patrón claro (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5.** Cargas de las variables utilizadas en este estudio para el análisis de componentes principales (C1-C6). En negrita, se resaltan las variables con las mayores cargas para cada componente principal.

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>
X-UTM	<b>-0.359</b>	0.161	-0.046	<b>-0.580</b>	<b>0.459</b>	-0.015
Y-UTM	-0.300	-0.004	0.148	<b>-0.733</b>	0.205	0.202
$\alpha$ -HCH	0.077	<b>0.640</b>	<b>-0.586</b>	-0.156	-0.005	-0.018
$\beta$ -HCH	-0.120	0.164	<b>-0.419</b>	0.016	-0.229	0.268
$\gamma$ -HCH	0.326	<b>0.626</b>	<b>-0.467</b>	-0.124	-0.066	-0.129
$\delta$ -HCH	0.104	-0.125	-0.129	0.202	-0.248	<b>0.426</b>
HCH total	0.143	<b>0.689</b>	<b>-0.671</b>	-0.135	-0.095	0.030
mo (%)	<b>0.921</b>	0.213	0.230	0.062	0.082	0.085
C (%)	<b>0.916</b>	0.201	0.196	0.000	0.121	0.140
N (%)	<b>0.879</b>	0.276	0.263	-0.018	-0.073	-0.043
CN	0.144	<b>-0.199</b>	-0.177	0.058	<b>0.600</b>	<b>0.520</b>
Kd $\alpha$ -HCH	<b>0.925</b>	0.206	0.224	0.069	0.074	0.089
Kd $\gamma$ -HCH	<b>0.925</b>	0.206	0.224	0.069	0.074	0.089
pHH <sub>2</sub> O	-0.238	<b>0.513</b>	-0.066	0.358	0.372	-0.125
pHKCl	0.146	0.273	0.025	<b>0.559</b>	0.488	0.045
Al	<b>-0.616</b>	<b>0.476</b>	0.217	0.166	-0.074	0.141
Fe	<b>-0.620</b>	<b>0.481</b>	0.385	0.121	0.079	0.109
Ti	-0.282	-0.025	0.257	<b>0.522</b>	-0.248	-0.007
Cu	<b>-0.675</b>	0.363	0.268	0.053	0.222	0.160
Hg	-0.014	0.482	<b>0.551</b>	-0.289	-0.135	-0.129
Se	-0.304	0.471	0.138	0.216	<b>-0.375</b>	0.296
Pb	-0.104	-0.009	0.303	<b>-0.430</b>	0.042	0.283
Cd	0.085	0.434	<b>0.405</b>	-0.317	-0.130	-0.236
Ni	-0.188	-0.003	-0.033	0.264	<b>0.496</b>	-0.374
Zn	<b>-0.629</b>	0.340	0.130	0.152	-0.011	0.054
Varianza explicada (%)	25.9	13.3	9.8	9	6.8	4.3
Varianza explicada acumulada (%)	25.9	39.2	49	58.1	64.9	69.2

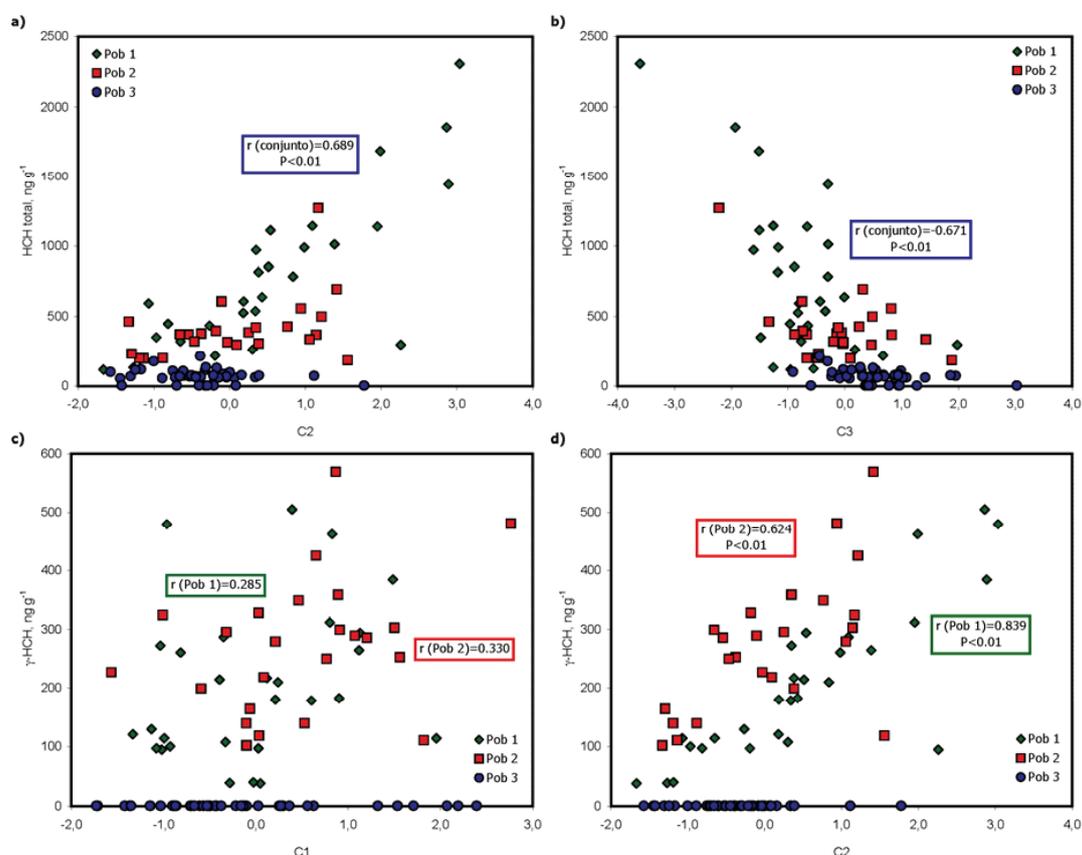
Este conjunto de componentes principales explica hasta un 90% de la varianza de materia orgánica, C, N, y K<sub>d</sub> (Figura 2.5). Los seis componentes explican, asimismo, entre un 70 y un 80% de la variación de los contenidos en  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH y HCH total, la relación C/N, los contenidos en aluminio, hierro y cobre, así como la varianza de las coordenadas geográficas (X-UTM e Y-UTM). Considerando

únicamente C1, C2 y C3, la variación explicada para las propiedades citadas anteriormente es superior al 65%, salvo en el caso de las variables geográficas, asociadas fundamentalmente a C5.



**Figura 2.5.** Fracción de la varianza total de los parámetros del suelo considerados explicada por los seis primeros componentes principales.

Se han representado las variables originales frente a las puntuaciones de cada uno de los componentes, pero considerando las tres poblaciones de datos definidas (Figura 2.6). El HCH total sigue una tendencia clara: a mayor puntuación de **C2**, mayor contenido de HCH en el suelo ( $r=0.689$ ;  $P<0.01$ ), sin diferencias entre las poblaciones. No obstante, la tendencia es la opuesta en el caso de **C3** ( $r=0.671$ ;  $P<0.01$ ). Por otra parte, si se representa la concentración  $\gamma$ -HCH frente a las puntuaciones de los componentes, se encuentran diferencias entre las Poblaciones 1 y 2 en función del componente principal que se considere (Figura 2.6c,d). La tendencia no es clara considerando **C1** (poco relacionado con el HCH) pero sí en el caso de **C2**, que separa la Población 1 ( $r=0.839$ ;  $P<0.01$ ) de la Población 2 ( $r=0.624$ ;  $P<0.01$ ).



**Figura 2.6.** Relaciones entre los isómeros de HCH y las puntuaciones de los componentes principales definidos (C1, C2 y C3), en función de las poblaciones de datos consideradas (Pob 1, Pob 2, Pob 3). a) Componente 2 y HCH total; b) Componente 3 y HCH total; c) Componente 1 y  $\gamma$ -HCH; d) Componente 2 y  $\gamma$ -HCH.

Las correlaciones obtenidas entre los contenidos de HCH de los suelos agrícolas utilizados en este estudio y las propiedades fisicoquímicas varían en función del conjunto de datos que se considere (Tabla 2.6). Los isómeros mayoritarios se correlacionan entre sí y con el HCH total en el conjunto de muestras global ( $\alpha$ - vs.  $\gamma$ -HCH,  $r=0.600$ ;  $\alpha$ -HCH vs. HCH total,  $r=0.923$ ; significativo en ambos casos a  $P<0.01$ ; Tabla 2.6a). El isómero  $\gamma$ -HCH se correlaciona razonablemente bien con el porcentaje de arcilla, el carbono (respectivamente,  $r=0.326$  y  $0.301$ ; significativo a  $P<0.01$ ; Tabla 2.6a). No obstante, las correlaciones varían al considerar las poblaciones por separado. La correlación entre  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH aumenta notablemente en la **Población 1** ( $r=0.965$ , significativo a  $P<0.01$ ; Tabla 2.6b). Asimismo, hay una correlación positiva de  $\alpha$ -HCH con el contenido en aluminio ( $r=0.421$ , significativo a  $P<0.05$ ). Se encuentra también un aumento de la correlación entre el cociente  $\alpha/\gamma$  y el aluminio. Por su parte, en la **Población 2**, la correlación del isómero  $\gamma$ -HCH con la arcilla mejora ( $r=0.714$ ; significativo a  $P<0.01$ ; Tabla 2.6c). En esta población, asimismo, la correlación entre  $\alpha$ -HCH y el cociente  $\alpha/\gamma$  es alta ( $r=0.530$ ).

## CAPÍTULO 2

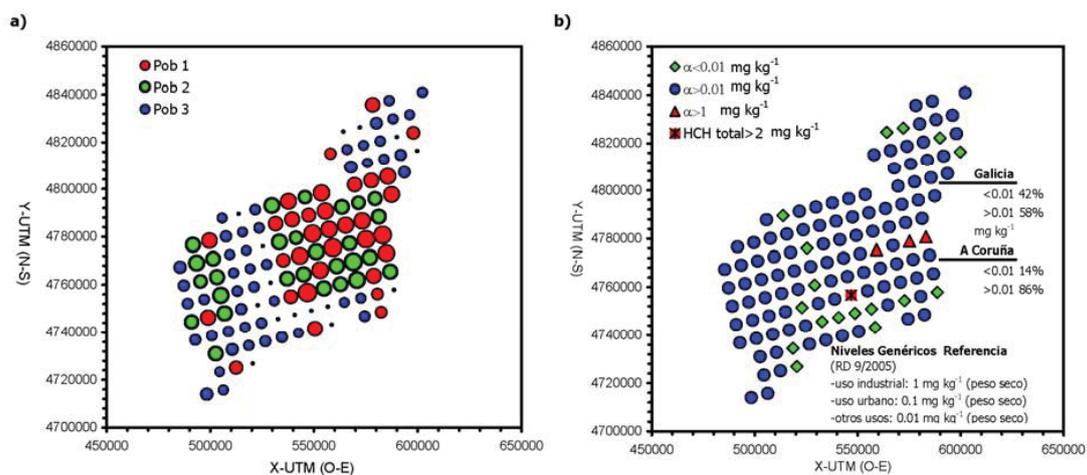
**Tabla 2.6.** Coeficientes de correlación calculados para las variables más importantes en este estudio. a) conjunto de todos los suelos analizados; b) Población 1; c) Población 2.

a) TOTAL	$\alpha$ -HCH	$\gamma$ -HCH	HCH total	$\alpha/\gamma$	arcilla (%)	C (%)	Al	Cd
$\alpha$ -HCH								
$\gamma$ -HCH	0.600	**						
HCH total	0.923	**	0.802	**				
$\alpha/\gamma$	0.687	**	-0.208	0.471	**			
Arcilla (%)	0.058	0.326	**	0.148	-0.232			
C (%)	0.064	0.301	**	0.119	-0.228	0.466	**	
Al	0.103	-0.017	0.077	0.207	0.000	-0.393	**	
Cd	0.039	0.165	0.061	-0.120	0.432	**	0.161	0.136
b) POB 1	$\alpha$ -HCH	$\gamma$ -HCH	HCH total	$\alpha/\gamma$	arcilla (%)	C (%)	Al	Cd
$\alpha$ -HCH								
$\gamma$ -HCH	0.965	**						
HCH total	0.982	**	0.965	**				
$\alpha/\gamma$	0.276	0.033	0.198					
Arcilla (%)	0.094	0.170	0.055	-0.336				
C (%)	0.223	0.264	0.210	-0.022	0.623	*		
Al	0.421	*	0.373	0.389	*	0.606	**	0.299
Cd	0.347	0.364	0.309	0.116	0.614	*	0.343	0.292
c) POB 2	$\alpha$ -HCH	$\gamma$ -HCH	HCH total	$\alpha/\gamma$	arcilla (%)	C (%)	Al	Cd
$\alpha$ -HCH								
$\gamma$ -HCH	0.043							
HCH total	0.173	0.585	**					
$\alpha/\gamma$	0.530	**	-0.685	**	-0.330			
Arcilla (%)	-0.198	0.714	**	0.339	-0.576	**		
C (%)	-0.038	0.454	*	0.004	-0.285	0.669	**	
Al	-0.161	0.215	0.219	-0.246	0.259	-0.304		
Cd	0.279	0.210	0.100	0.265	0.446	0.078	0.163	

\*\* Correlación significativa a  $P < 0.01$ . \* Correlación significativa a  $P < 0.05$

### 2.3.3. Distribución espacial del HCH

En la Figura 2.7a se muestra la distribución espacial de las diferentes poblaciones de datos definidas en este estudio dentro de la provincia de A Coruña. En la Figura 2.7b se describe la distribución de los puntos de muestreo que superan el Nivel Genérico de Referencia para el **uso de suelo agrícola** en alguno de los isómeros de HCH ( $0.01 \text{ mg kg}^{-1}$ ). En el conjunto de los suelos agrícolas de Galicia muestreados, un 58% presenta niveles superiores al Nivel Genérico de Referencia (NGR). Este porcentaje asciende hasta un 86% de las muestras de la zona de A Coruña. Teniendo en cuenta la legislación específica de la Comunidad Autónoma de Galicia, tan solo uno de los suelos presenta un nivel de concentración de HCH total (suma de  $\alpha+\beta+\gamma$ ) superior a  $2 \text{ mg kg}^{-1}$ , la concentración límite de intervención (Figura 2.7b).



**Figura 2.7.** a) Proyección espacial de la concentración de HCH total ( $\text{Log}_{10}$ ) en la provincia de A Coruña en función de las tres poblaciones de datos encontradas en este estudio (Pob 1, Pob 2 y Pob 3 son, respectivamente, las Poblaciones de datos 1, 2 y 3). El tamaño de los círculos es representativo de la concentración..b) Proyección espacial de los niveles de  $\alpha$ -HCH encontrados en la provincia de A Coruña en relación con los Niveles Genéricos de Referencia que recoge la legislación española. Los emplazamientos en rojo indican los suelos cuya concentración supera el NGR en 100 veces para uso agrícola; el cuadro rojo hace referencia a la muestra que supera los  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  de HCH total.

## 2.4. DISCUSIÓN

### 2.4.1. Acumulación de HCH en el horizonte superficial de los suelos agrícolas

En los suelos agrícolas analizados se han detectado niveles de residuos de HCH ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -HCH) en concentraciones superiores al límite de detección. Existe una gran variabilidad de los niveles de concentración de los residuos de HCH, especialmente en la provincia de A Coruña (distribución log-normal; Figura 2.2). Esto concuerda con las tendencias encontradas en suelos agrícolas de diversas partes del mundo (Aigner y col., 1998; Harner y col., 1999). A Coruña es la provincia que revela mayor presencia de HCH. Esto es debido en gran medida a que se trata de la zona más investigada, dado que la superficie agrícola disponible muestreada de modo efectivo es muy grande (malla de muestreo muy completa; Figura 2.1). También se trata de la zona de cultivo más extensa y continua y que inició antes el cambio de agricultura de subsistencia a la moderna. Por otro lado, en el caso de Lugo, Ourense y Pontevedra, la orografía más accidentada ha supuesto una limitación para el muestreo.

La existencia de residuos de HCH se considera como contaminación dado que son compuestos de origen antrópico, de carácter persistente y capacidad de acumulación en los organismos vivos. Dado que sólo se ha analizado el HCH, no es posible descartar la presencia de otros compuestos organoclorados en estos mismos suelos. Los niveles de concentración de HCH detectados en algunas zonas de Galicia superan los niveles relativamente bajos (en torno a  $100 \text{ ng g}^{-1}$  de HCH total) que se ha detectado en los últimos años (1990-2007) en diversos suelos agrícolas de Europa, América o Asia (Tabla 2.7a). Hay que retroceder

## CAPÍTULO 2

a estudios anteriores a la década de 1990 para encontrar niveles similares de contaminación (Tabla 2.7c). En todo caso, la presencia de residuos de HCH en los suelos se relaciona directamente con la aplicación al suelo y a los cultivos del pesticida, bien sea como HCH técnico, bien sea como lindano, a través de diversos productos comerciales y formulaciones de composición variable (Tabla 2.1). Esto sugiere que la contaminación detectada puede ser antigua, anterior a 1990, la época de prohibición generalizada de la comercialización del HCH y sus derivados (Li, 1999). Hay que destacar que el cese de la comercialización no implica el cese de la utilización, dado que aún queda pesticida almacenado factible de haber sido utilizado en las dos últimas décadas (Vijgen, 2005). De hecho, algunos autores relacionan elevados contenidos de pesticidas detectados recientemente con el mantenimiento de viejas prácticas de abono en los suelos, de modo que el uso del HCH en la zona no se habría detenido de modo completo (Gong y col., 2004).

**Tabla 2.7.** Resumen de los niveles de concentraciones de HCH total ( $\text{ng g}^{-1}$  suelo seco) en suelos agrícolas y naturales del mundo (1970-2007). a), suelos agrícolas, período 1990-2007; b) suelos no agrícolas, período 1990-2007; c) suelos agrícolas, período 1970-1990.

Continente	País	Fecha	$\text{ng g}^{-1}$	Referencia
<b>a)</b>				
America	Canadá	1989	10-1000	Szeto y Price, 1991.
Europa	Polonia	1993-1994	10-100	Falandysz y col., 2001.
América	Canadá	1999-2000	1-100	Bidleman y col., 2006.
Asia	Vietnam	2006	1-100	Toan y col., 2007.
Asia	Corea de Sur	2001	1-10	Kim y Smith, 2001
America	Méjico	2003	1-10	Waliszewski y col., 2004
América	Estados Unidos	1995-1996	n.d. <sup>1</sup> -1	Aigner y col., 1998.
América	Estados Unidos	1999	n.d.-1	Harner y col., 1999.
<b>b)</b>				
Asia	India	1996-2003	100-1000	Courdouan y col., 2004.
Asia	China	2001	1-1000	Gong y col., 2004.
Europa	España	1991	10-100	Hernández y col., 1991.
Europa	Alemania	2002	10-100	Wenzel y col., 2002.
Asia	China	2002	1-100	Tao y col., 2005.
Asia	China	2005	1-100	Zhu y col., 2005.
Asia	China	2000	1-100	Zhang y col., 2006.
Asia	China	2001	1-100	Wang y col., 2006.
America	Canadá	2003-2004	n.d.-100	Daly y col., 2007.
<b>c)</b>				
Asia	India	1988	>1000	Li, 1999.
Asia	China	1980-1981	100-1000	
Asia	Japón	1970	100-1000	
Europa	Antigua Checoslovaquia	1982-1989	100-1000	
Europa	Rusia	1988-1989	100-1000	
Asia	Filipinas	1975	10-100	
Europa	España	1975	10-100	
Europa	Uzbekistan	1988-1989	10-100	
Europa	Antigua URSS; parte europea	1982-1989	10-100	
Asia	Indonesia	1982	1-10	
Asia	Malasia	1981	1-10	
Asia	Vietnam	1990	1-10	
Europa	Alemania Oriental	1982-1989	1-10	
Europa	Hungría	1982-1989	1-10	
Oceanía	Australia	1990-1990	1-10	
Asia	Taiwán	1990	n.d.-1	
Asia	Tailandia	1988-1990	n.d.-1	

<sup>1</sup> n.d. no detectado.

Los isómeros de HCH, una vez presentes en un suelo, pueden sufrir diversos procesos, sobre todo degradación biótica y abiótica, llevada a cabo por diferentes microorganismos y hongos o bien catalizada por sustancias inorgánicas (Middeldorp y col., 1996; Kumar y col., 2006). El HCH se adsorbe con relativa

intensidad a la fracción coloidal del suelo (arcilla, materia orgánica) evitando así su degradación (Wahid y Sethunathan, 1979; Manz y col., 2001). Las diferencias encontradas en las propiedades del suelo entre las poblaciones de muestras definidas (Población 1, Población 2, Población 3) no explican la distribución de los diferentes isómeros de HCH ni la concentración de HCH total. Si bien existen variaciones en los contenidos de carbono, mercurio, o cadmio, no hay ningún parámetro sencillo que explique la distribución del HCH. En todo caso, la intensidad de la degradación de estos compuestos en los suelos depende de: el pH, el potencial redox, la humedad o la calidad de la fracción orgánica (Szeto y Prize, 1991; Cousins y col., 1999; Falandysz y col., 2001; Wenzel y col., 2002). La tendencia de la Población 2 a retener tanto  $\alpha$ - como  $\gamma$ -HCH podría relacionarse con su mayor contenido en carbono orgánico. La retención facilitaría la conservación del contaminante en el perfil (menor lavado), mientras que la degradación puede estar ralentizada por un pH bajo y una textura arenosa que no facilitarían la actividad microbiana (Waliszewski y col., 2004). Esto incide en que tanto el contenido como las características de la materia orgánica de los suelos influyen en la persistencia del HCH. En principio, hay una mayor relación del HCH con la materia orgánica que con la textura o bien los diferentes elementos del suelo. Otros estudios han encontrado relaciones similares entre pesticidas organoclorados (HCH y DDTs) y parámetros del suelo como los contenidos en C y N (Zhang y col., 2005). Por otro lado, diversos autores destacan que la concentración inicial del contaminante y la posible absorción por la vegetación pueden ser importantes para evaluar el contenido y distribución de los pesticidas en los suelos agrícolas (Covaci y col., 2001; Zhang y col., 2005). No obstante, se ha comprobado que la asociación entre los isómeros de HCH es muy fuerte (constituyen un conglomerado bien definido), mientras que con el resto de propiedades del suelo es relativamente débil, aún considerando la fracción coloidal. Este es un indicio de que un factor que define el comportamiento del HCH en los suelos muestreados es el **contenido total** y, por tanto, el resultado lógico de que su presencia y mayor abundancia está asociada a su uso y a un mayor aporte.

Por otro lado, se ha identificado un componente principal (C1) claramente relacionado con la **materia orgánica del suelo**, pero que no se relaciona directamente las concentraciones del HCH encontradas ni su distribución (Figura 2.6). C2 y C3, por su parte, son dos componentes principales vinculados con el HCH y su composición ( $\alpha$ - vs.  $\gamma$ -HCH), por lo que se relacionan con el **origen complejo de la contaminación**. Es decir, el análisis de componentes principales no ha aportado nueva información sobre las relaciones del HCH con las propiedades del suelo, pero sí ha confirmado la importancia de la fuente de contaminación a la hora de estudiar el contenido de HCH en suelos agrícolas. Otros autores, al analizar las concentraciones de pesticidas organoclorados en suelos con técnicas de análisis multivariante, han llegado a conclusiones similares respecto al origen complejo de la contaminación (Manz y col., 2001; Singh y col., 2007). Por otro lado, tanto la elevada contaminación detectada como el largo período de tiempo transcurrido desde su aparición complican el estudio.

### 2.4.2. Origen de los residuos de HCH

La distribución actual del HCH en los suelos agrícolas está marcada por un origen disperso geográficamente, una gran carga con el paso del tiempo y una evolución compleja. Ante todo, los elevados niveles de concentración sugieren un alto nivel de exposición y durante décadas. Las **fuentes** son difíciles de concretar:

- contaminación **difusa** debido a uso de insecticida en cultivos: HCH total y/o lindano (Harner y col., 1999)
- contaminación originada en un **foco emisor** (depósito de residuos de la fabricación de pesticidas organoclorados) (Hernández y col., 1991; Heinisch y col 1993)
- participación del llamado **Transporte a Larga Distancia**: parte de la contaminación tiene su origen en otras zonas y se deposita aquí en función de las condiciones atmosféricas locales (Wania y Mackay, 1996)

En principio, la utilización de diferentes productos comerciales y formulaciones de estos compuestos a lo largo de varias décadas para el control de insectos y otras plagas es la causa principal de la presencia de HCH en los suelos agrícolas (Covaci y col., 2001). Dada la distribución y composición de los residuos de HCH detectados en los suelos analizados, no es factible que la presencia de HCH sea debida a un foco puntual de elevada contaminación. En la provincia de Pontevedra, en los últimos años se ha detectado y caracterizado una amplia zona contaminada por la emisión de residuos relacionados con la producción de lindano en la localidad de O Porriño (Concha Graña y col., 2004; Calvelo Pereira y col., 2006; Vega y col., 2007). No obstante, ni la composición del HCH detectado en los suelos agrícolas ni la distribución geográfica de la misma parece reflejar una influencia de los elevados niveles de contaminación de esta zona restringida geográficamente. No obstante, dada la abundancia del isómero  $\alpha$ -HCH en los residuos de O Porriño, y la relativa facilidad de su evaporación y transporte a larga distancia, no se puede descartar cierta contribución de este foco puntual a un nivel de "fondo" de isómero  $\alpha$ -HCH. Asimismo, la contaminación difusa de las zonas agrícolas también puede estar sometida a una redistribución regional provocada por las características de la circulación atmosférica general y local, y otras variables ambientales (viento, precipitaciones, temperatura) (Lohmann y col., 2007).

El hecho de encontrar diferentes poblaciones de muestras en función de la distribución relativa de isómeros en el HCH total indica que varios procesos han actuado durante largo tiempo. Dado que el perfil de la contaminación se puede relacionar estrechamente con las mezclas técnicas utilizadas, la fuente principal de contaminación se puede relacionar tanto con el HCH técnico como con el lindano (Tabla 2.1; Figura 2.4). La distribución del HCH en los suelos agrícolas esta determinada por la relación entre los isómeros mayoritarios:  $\alpha$  y  $\gamma$ -HCH. No obstante, es  $\alpha$  el isómero dominante, lo que denota que la fuente principal de la contaminación es el uso de HCH técnico. De hecho, la denominada **Población 1** se caracteriza por presentar dos isómeros mayoritarios,  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH, pero con dominio del primero en una proporción aproximada a 3 a 1 (pendiente 0.33 en la recta de regresión). Esta relación remite directamente a la formulación del HCH técnico, que generalmente oscila entre 6 a 1 (coeficiente 0.17) y 4 a 1 (coeficiente 0.25). Un número elevado de muestras reflejan una evolución del cociente  $\alpha/\gamma$  con tendencia a un aumento porcentual de  $\gamma$ -HCH (el cociente baja), bien causado por un pérdida preferente de  $\alpha$ -HCH o bien por una entrada posterior de  $\gamma$ -HCH como lindano, que se superpusiese (en lugares y cantidades similares) al "fondo" originado por el HCH técnico. La existencia de otra población de muestras caracterizada por una gran proporción de  $\gamma$ -HCH, aún en presencia de niveles relativamente altos de  $\alpha$ -HCH, es lo que indica que el lindano se ha utilizado en estos suelos. Dicha población (**Población 2**) se caracteriza porque  $\gamma$ -HCH determina la composición del HCH total (Figura 2.4). Esta población se aleja de la recta teórica que presentaría un suelo contaminado exclusivamente por  $\gamma$ -HCH a causa de la presencia de  $\alpha$ -HCH (coeficiente 1.11, correspondiente a un 99% de  $\gamma$ -HCH). De hecho, el punto de corte en el eje X de la recta de regresión HCH total-  $\gamma$ -HCH en ausencia de  $\gamma$ -HCH puede interpretarse como el nivel de isómero  $\alpha$ -HCH de

“fondo”, es decir, previo a la adición del lindano ( $x=0$ ;  $y=83 \text{ ng g}^{-1}$ ; Figura 2.4). El origen de este “fondo” podría estar relacionado con contaminación difusa provocada a escala regional por la evaporación preferencial del isómero  $\alpha$ -HCH y su posterior transporte a otras zonas. Este isómero podría provenir tanto del HCH técnico utilizado previamente como de una contaminación regional a larga distancia (Bidleman y Leone, 2004). Si el sistema aire-suelo no se encuentra en equilibrio, facilitaría una evaporación preferente de  $\alpha$ -HCH (por diferencias en la presión de vapor) y un transporte a mayor distancia, reflejando la aplicación histórica del pesticida y las tasas de disipación (Harner y col., 1999). La **Población 3**, por su parte, se define únicamente por su contenido en  $\alpha$ -HCH. Esto supone que está relacionada directamente con el “fondo” de  $\alpha$ -HCH, lo que explica que su extensión geográfica sea la mayor de las tres poblaciones. De hecho, en la provincia de A Coruña, la zona de la población 3 se corresponde con las zonas en las que la agricultura moderna entró más tarde y zonas con cultivos de menor extensión.

La evolución temporal de los acontecimientos se podría resumir del siguiente modo: un primer episodio de contaminación provocado por el uso más o menos extensivo de HCH técnico de modo generalizado en suelos agrícolas; con el paso de las décadas,  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH pueden evaporarse ( $\alpha$  de modo preferencial), ser transportados y depositarse en zonas cercanas (podría existir asimismo una entrada difusa procedente de regiones alejadas); finalmente, a partir de determinada fecha se introduce el uso de lindano en muchos cultivos, afectando a la evolución de la contaminación de las zonas que ya presentaban contaminación previa por HCH técnico. Si se representan geográficamente estas tres poblaciones de datos, se observa una “zonación” (Figura 2.7a): una zona exterior muy amplia constituida por las muestras de la Población 3 que engloba al resto de suelos (contaminación difusa), una zona en el cuadrante noroeste-noreste (región A Coruña-Santiago-Ordenes), de gran contaminación constituida por muestras de la Población 1 y la Población 2 (superposición de ambas entradas de HCH) y una amplia región al este dominada por muestras de la Población 2 (contaminación de HCH técnico+lindano o bien un uso preferencial de lindano). Para considerar la distribución geográfica de la contaminación en detalle, es necesario estudiar parámetros como el relieve, la temperatura, la precipitación, la circulación de los vientos, etc. El estudio exhaustivo de éstas y otras variables geográficas y sus relaciones (geoestadística) aportaría mayor información a cerca de la distribución del HCH en los suelos de Galicia.

Finalmente, cabe destacar que la escasa presencia del isómero  $\beta$ -HCH en los suelos agrícolas de Galicia. Los niveles de entrada en los suelos por aporte agrícola de HCH técnico serían similares a los niveles del isómero  $\gamma$ -HCH. No obstante,  $\beta$ -HCH puede estar sometido a otros procesos que conducirían, a largo plazo, a su desaparición del suelo: degradación (biótica y abiótica) lavado en profundidad en el perfil asociado a materia orgánica disuelta (Kalbitz y col., 1997; Wang y col., 2006), acumulación preferencial en la biota en general y en la biomasa vegetal en particular (cultivo propiamente dicho, restos vegetales) (González y col., 2003). Por su parte, el isómero  $\delta$ -HCH no aparece muy representado en los suelos muestreados, lo que se puede relacionar directamente con las bajas concentraciones de entrada en los suelos agrícolas que conlleva la utilización tanto del HCH técnico como del lindano (Tabla 2.1). Con el paso del tiempo, no obstante, la biodisponibilidad de estos isómeros podría disminuir con el efecto de “envejecimiento” y la formación de los denominados residuos enlazados, lo que ocurre durante los procesos de descomposición y humificación de la materia orgánica (Alexander, 2000; Mordaunt y col., 2005). Las técnicas analíticas empleadas en este estudio no han permitido la constatación de dicha posibilidad.

### 2.4.3. Evaluación del nivel de contaminación por presencia de residuos de HCH

Las concentraciones de HCH detectadas en los suelos agrícolas en este estudio, relativamente elevadas, tienen importancia si se considera la evaluación del riesgo que supone o puede suponer para los diferentes ecosistemas y, en última instancia, el ser humano. Se deben relacionar los niveles de concentración detectados con los Niveles Genéricos de Referencia que la legislación considera. Se denominan **suelos contaminados** aquellos que superan el NGR en 100 veces, a no ser que se disponga de una valoración de riesgos para la salud humana. En función de esta definición, tan sólo 4 de los suelos pueden considerarse contaminados por la presencia de  $\alpha$ -HCH (Figura 2.7b). No obstante, los niveles de HCH detectados indican que es necesario un estudio pormenorizado de muchos de los puntos de muestreo, efectuando una valoración de riesgo para cada uno. En el caso de la muestra que supera los 2 mg kg<sup>-1</sup> de HCH total, al superar límite de la legislación autonómica para la declaración de intervención del suelo, la protección del ambiente implicaría nuevos estudios para profundizar en el conocimiento del riesgo potencial para la salud humana.

### 2.5. CONCLUSIONES

En los suelos agrícolas de Galicia se ha encontrado un amplio intervalo de concentración de HCH total (desde niveles inferiores al límite de detección hasta 2 403 ng g<sup>-1</sup>), con una distribución muy heterogénea y contribución variable de los dos isómeros mayoritarios ( $\alpha$  y  $\beta$ ). En un porcentaje importante de las muestras, los contenidos de HCH son elevados, si bien no se pueden considerar estos suelos agrícolas como contaminados en base a la legislación vigente. Los resultados indican que la presencia del HCH deriva principalmente del uso prolongado de productos con HCH técnico y/o lindano. Es posible establecer una secuencia temporal aproximada de dicha aplicación de pesticidas: inicialmente se utilizó el HCH técnico y con posterioridad el lindano. No puede descartarse, no obstante, que la utilización de ambos pesticidas coincidiese en el tiempo. Se ha detectado, además, la presencia de un "fondo" de isómero  $\alpha$ -HCH en los suelos agrícolas de Galicia, lo que indica que otros procesos han actuado sobre los pesticidas depositados en los suelos (Transporte a Larga Distancia). Hay que destacar que ningún parámetro del suelo puede, de modo sencillo, explicar ni la persistencia ni la distribución de los residuos de HCH.

Este estudio pone de manifiesto que el destino de los isómeros de HCH en los suelos agrícolas se relaciona con diversos factores: (i) la dosis de aplicación, (ii) el uso y manejo del suelo, (iii) el origen del residuo (compuesto por HCH técnico o lindano), (iv) duración de la aplicación y (v) las características del suelo (materia orgánica, pH). Finalmente, se puede decir que las características geográficas y climáticas de la zona afectada y las modificaciones de los parámetros ambientales en la escala temporal acorde con el período de aplicación del pesticida podrían ejercer influencia, si bien no se han considerado en este estudio. Esto resalta la importancia de las técnicas de análisis geoestadístico, que podrían añadir nuevas informaciones que clarifiquen la distribución de los isómeros de HCH en los suelos agrícolas de Galicia.

### Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Dr. Luís Rodríguez Lado su labor en el muestreo de los suelos. Por su parte, la analítica de suelos ha sido realizada por el personal del Laboratorio de Edafología y Química

Agrícola de la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela. El Dr. D. Antonio Martínez Cortizas, Catedrático de Edafología y Química Agrícola, ha sido un apoyo inestimable en el enfoque llevado a cabo con el análisis estadístico multivariante. El presente trabajo ha sido realizado gracias a una Beca de la Diputación de A Coruña, disfrutada durante el período Septiembre 2006-Septiembre 2007.

## 2.6. BIBLIOGRAFÍA

- Aigner, E. J., A. D. Leone y R. L. Falconer. 1998. Concentrations and enantiomeric ratios of organochlorine pesticides in soils from the U.S. Corn belt. *Environmental Science and Technology*, 32: 1162-1168.
- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, 34: 4259-4265.
- Amadori, E. 1993. The production and use of HCH. En: HCH and halogenated pesticides. State of art for risk assessment and technology development. IWU, Magdeburgo. Págs. 11-13.
- Bedos, C., P. Cellier, R. Calvet, E. Barriuso y B. Gabrielle. 2002. Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview. *Agronomie*, 22: 21-33.
- Bidleman, T. F. y A. D. Leone. 2004. Soil-air exchange of organochlorine pesticides in the southern United States. *Environmental Pollution*, 128: 49-57.
- Bidleman, T. F., A. D. Leone, F. Wong, L. Van Vliet, S. Szeto y B. D. Ripley. 2006. Emission of legacy chlorinated pesticides from agricultural and orchard soils in British Columbia, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 1448-1457.
- Breivik, K., J. M. Pacyna y J. Munch. 1999. Use of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996. *The Science of the Total Environment*, 239: 151-163.
- Buser, H. R. y M. D. Mueller. 1995. Isomer and enantioselective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage sludge under anaerobic conditions. *Environmental Science and Technology*, 29: 664-672.
- Calvelo Pereira, R., M. Camps-Arbestain, B. Rodríguez Garrido, F. Macías y C. Monterroso. 2006. Behaviour of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environmental Pollution*, 144: 210-217.
- Calvo de Anta, R., F. Macías Vázquez y A. Riveiro Cruz. 1992. Aptitud agronómica de los suelos de la provincia de La Coruña. Editorial Diputación Provincial. La Coruña.
- Concha-Graña, E., M. I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, E. Fernandez-Fernandez y D. Prada-Rodriguez. 2004. Development of pressurized liquid extraction and cleanup procedures for determination of organochlorine pesticides in soils. *Journal of Chromatography A*, 1047: 147-155.
- Courdouan, A., S. Marcacci, S. Gupta y J. P. Schwitzguébel. 2004. Lindane and technical HCH residues in Indian soils and sediments: a critical appraisal. *Journal of Soils and Sediments*, 4: 192-196.
- Cousins, I. T., B. Gevao y K. C. Jones. 1999. Measuring and modelling the vertical distribution of semi-volatile organic compounds in soils. I: PCB and PAH soil core data. *Chemosphere*, 39: 2507-2518.
- Covaci, A., C. Hura y P. Schepens. 2001. Selected persistent organochlorine pollutants in Romania. *The Science of the Total Environment*, 280: 143-152.
- Daly, G. L., Y. D. Lei, C. Teixeira, D. C. G. Muir y F. Wania. 2007. Pesticides in western Canadian mountain air and soil. *Environmental Science and Technology*, 41: 6020-6025.
- EPA, Environmental Protection Agency. 2000. Assigning values to non-detected/non-quantified pesticide residues in human health food exposure assessment. Office of Pesticide Programs. Washington, D.C.
- Fabre, B., E. Roth y V. Heintz. 2005. Les isomeres de l'hexachlorocyclohexane. UHA-ADEME. Mulhouse, Francia.
- Falandysz, J., B. Brudnowska, M. Kawano y T. Wakimoto. 2001. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in soils from the southern part of Poland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40: 173-178.
- Gong, Z. M., F. L. Xu, R. Dawson, J. Cao, W. X. Liu, B. G. Li, W. R. Shen, W. J. Zhang, B. P. Qin, R. Sun y S. Tao. 2004. Residues of hexachlorocyclohexane isomers and their distribution characteristics in soils in the Tianjin area, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46: 432-437.
- Gonzalez, M., K. S. B. Miglioranza, J. E. Aizpún De Moreno y V. J. Moreno. 2003. Occurrence and distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in tomato (*Lycopersicon esculentum*) crops from organic production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1353-1359.
- Green, R. E. y S. W. Karickhoff. 1990. Sorption estimates for modeling. En: Cheng, H. H. (Ed.), *Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin. Págs. 79-101.
- Grimalt, J. O., B. L. Van Drooge, A. Ribes, R. M. Vilanova, P. Fernandez y P. Appleby. 2004. Persistent organochlorine compounds in soils and sediments of European high altitude mountain lakes. *Chemosphere*, 54: 1549-1561.
- Harner, T., J. L. Wideman, L. M. M. Jantunen, T. F. Bidleman y W. J. Parkhurst. 1999. Residues of organochlorine pesticides in Alabama soils. *Environmental Pollution*, 106: 323-332.

- Heinisch, E., K. Jonas y S. Klein. 1993. HCH isomers in soil and vegetation from the surroundings of an industrial landfill of the former GDR, 1971-1989. *The Science of the Total Environment*, 134: 151-159.
- Hernández, L. M., M. A. Fernández y M. J. González. 1991. Lindane pollution near an industrial source in northeast Spain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46: 9-13.
- Jones, K. C. y P. De Voogt. 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution*, 100: 209-221.
- Kalbitz, K., P. Popp, W. Geyer y G. Hanschmann. 1997.  $\beta$ -HCH mobilization in polluted wetland soils as influenced by dissolved organic matter. *The Science of the Total Environment*, 204: 37-48.
- Kidd, P., A. Prieto-Fernández, C. Monterroso y M. Acea. 2008. Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil*, 302: 233-247.
- Kim, J.-H. y A. Smith. 2001. Distribution of organochlorine pesticides in soils from South Korea. *Chemosphere*, 43: 137-140.
- Kumar, M., S. K. Gupta, S. K. Garg y A. Kumar. 2006. Biodegradation of hexachlorocyclohexane-isomers in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2318-2327.
- Li, Y. y J. Vijgen. 2006. Global lindane usage. En: J. Vijgen (Ed.), *The legacy of lindane HCH isomer production*. IHPA. Págs 35-60.
- Li, Y. F. 1999. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *The Science of the Total Environment*, 232: 121-158.
- Liu, Z., Y. He, J. Xu, P. Huang y G. Jilani. 2008. The ratio of clay content to total organic carbon content is a useful parameter to predict adsorption of the herbicide butachlor in soils. *Environmental Pollution*, 152: 163-171.
- Lohmann, R., K. Breivik, J. Dachs y D. Muir. 2007. Global fate of POPs: current and future research directions. *Environmental Pollution*, 150: 150-165.
- López Arias, M. y J. M. Grau Corbí. 2004a. Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de los suelos agrícolas y de pastos de la España peninsular. I: Resultados globales. Departamento de Medio Ambiente. INIA. Madrid.
- López Arias, M. y J. M. Grau Corbí. 2004b. Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de los suelos agrícolas y de pastos de la España peninsular. I: Resultados por provincias. Departamento de Medio Ambiente. INIA. Madrid.
- Macías, F. y R. Calvo de Anta. 2001. Los suelos. En: Atlas de Galicia. Xunta de Galicia, Consellería de Presidencia: Sociedade para o Desenvolvemento Comarcal de Galicia. Santiago de Compostela. Págs. 173-217.
- Mackay, D. 2001. *Multimedia environmental models: The fugacity approach*. CRC Press. Boca Raton.
- Mackenzie, K., J. Battke y F. D. Kopinke. 2005. Catalytic effects of activated carbon on hydrolysis reactions of chlorinated organic compounds: Part 1.  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *Catalysis Today*, 102-103: 148-153.
- Manz, M., K. D. Wenzel, U. Dietze y G. Schuurmann. 2001. Persistent organic pollutants in agricultural soils of central Germany. *The Science of the Total Environment*, 277: 187-198.
- Martínez Cortizas, A. y A. Pérez Alberti. 1999. *Atlas climático de Galicia*. Xunta de Galicia. Santiago de Compostela.
- Martínez Cortizas, A., J. C. Nóvoa, X. Pontevedra-Pombal, T. Taboada, E. García Rodeja y W. Chesworth. 2007a. Elemental composition of reference European volcanic soils. En: Stoops, G., Gerard, M., Arnalds, O., Bartoli, F., Buurman, P., García-Rodeja, E. y Oskarsson, H. (Eds.), *Soils of volcanic regions of Europe*. Springer Verlag. Berlín Heidelberg. Págs. 289-306.
- Martínez Cortizas, A., J. C. Nóvoa, X. Pontevedra-Pombal, T. Taboada, E. García-Rodeja y P. Buurman. 2007b. Multivariate statistical analysis of chemical properties of European volcanic soils. En: Stoops, G., Gerard, M., Arnalds, O., Bartoli, F., Buurman, P., García-Rodeja, E. y Oskarsson, H. (Eds.), *Soils of volcanic regions of Europe*. Springer Verlag. Berlín Heidelberg. Págs. 369-388.
- Middeldorp, P. J. M., M. Jaspers, A. J. B. Zehnder y G. Schraa. 1996. Biotransformation of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane under methanogenic conditions. *Environmental Science and Technology*, 30: 2345-2349.
- Mordaunt, C. J., B. Gevao, K. C. Jones y K. T. Semple. 2005. Formation of non-extractable pesticide residues: observations on compound differences, measurement and regulatory issues. *Environmental Pollution*, 133: 25-34.
- Oldal, B., E. Maloschik, N. Uzinger, A. Anton y A. Szekacs. 2006. Pesticide residues in Hungarian soils. *Geoderma*, 135: 163-178.
- Prager, J. C. 1995. *Environmental Contaminant Reference Databook. Volume 1*. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Quintero Díaz, J. C. 2004. *Biorrecuperación de suelos contaminados con hexaclorociclohexano*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Rosen, A. A. y H. F. Kraybill. 1966. *Organic pesticide in the environment*. American Chemical Society. Washington, D.C.
- Sena, M. M., R. T. S. Frighetto, P. J. Valarini, H. Tokeshi y R. J. Poppi. 2002. Discrimination of management effects on soil parameters by using principal component analysis: a multivariate analysis case study. *Soil and Tillage Research*, 67: 171-181.
- Simonich, S. L. y R. A. Hites. 1995. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science*, 269:

- 1851-1854.
- Singh, K., A. Malik, S. Sinha y V. Singh. 2007. Multi-block data modeling for characterization of soil contamination: a case study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 185: 79-93.
- Suntio, L. R., W. Y. Shiu, D. Mackay, J. N. Seiber y D. Glotfelty. 1988. Critical review of Henry's law constants for pesticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 103: 1-59.
- Szeto, S. Y. y P. M. Price. 1991. Persistence of pesticide residues in mineral and organic soils in the Fraser valley of British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1679-1684.
- Tao, S., F. L. Xu, X. J. Wang, W. X. Liu, Z. M. Gong, J. Y. Fang, L. Z. Zhu y Y. M. Luo. 2005. Organochlorine pesticides in agricultural soil and vegetables from Tianjin, China. *Environmental Science and Technology*, 39: 2494-2499.
- Toan, V., V. Thao, J. Walder, H.-R. Schmutz y C. Ha. 2007. Contamination by selected organochlorine pesticides (OCPs) in surface soils in Hanoi, Vietnam. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 78: 195-200.
- Tomlin, C. D. S. 2000. *The Pesticide Manual*. British Crop Protection Council Alton, UK. Farnham, Surrey.
- Turnbull, A. 1996. Chlorinated pesticides. *Issues in Environmental Science and Technology*, 113-135.
- Vega, F. A., E. F. Covelo y M. L. Andrade. 2007. Accidental organochlorine pesticide contamination of soil in Porriño, Spain. *Journal of Environmental Quality*, 36: 272-279.
- Vijgen, J. 2005. Obsolete pesticides: How to solve a worldwide society problem? En: Lens, P., Grotenhuis, T., Malina, G. y Tabak, H. (Eds.), *Soil and sediments remediation*. IWA Publisher. London. Págs 331-340.
- Vijgen, J., IHPA. 2006. The legacy of lindane HCH isomer production. International and HCH and Pesticides Association. URL: <http://www.iHPA.info/docs/library/Lindane%20Main%20Report%20DEF20JAN06.pdf>.
- Wahid, P. A. y N. Sethunathan. 1979. Sorption-desorption of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  isomers of hexachlorocyclohexane in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 1050-1053.
- Waliszewski, S. M., O. Carvajal, R. M. Infanzon, P. Trujillo, A. A. Aguirre y M. Maxwell. 2004. Levels of organochlorine pesticides in soils and rye plant tissues in a field study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7045-7050.
- Walker, K., D. A. Vallero y R. G. Lewis. 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environmental Science and Technology*, 33: 4373-4378.
- Wang, X., X. Piao, J. Chen, J. Hu, F. Xu y S. Tao. 2006. Organochlorine pesticides in soil profiles from Tianjin, China. *Chemosphere*, 64: 1514-1520.
- Wania, F. 2003. Assessing the potential of persistent organic chemicals for long-range transport and accumulation in Polar regions. *Environmental Science and Technology*, 37: 1344-1351.
- Wania, F. y D. Mackay. 1996. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Technology*, 30: 390A-396A.
- Wauchope, R. D., Y. Simon, J. BHJ. Linders, R. Kloskowski, K. Tanaka, B. Rubin, A. Katayama, W. Kördel, Z. Gerstl, M. Lane y J. B. Unsworth. 2002. Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Management Science*, 58: 419-445.
- Wenzel, K. D., M. Manz, A. Hubert y G. Schuurmann. 2002. Fate of POPs (DDX, HCHs, PCBs) in upper soil layers of pine forests. *The Science of the Total Environment*, 286: 143-154.
- WHO, World Health Organization. 1991. Lindane. *Environmental Health Criteria* 124. Ginebra.
- WHO, World Health Organization. 1992. Alpha and Beta-Hexachlorocyclohexane. *Environmental Health Criteria* 123. Ginebra
- Willett, K. L., E. M. Ulrich y R. A. Hites. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science and Technology*, 32: 2197-2207.
- Xunta de Galicia. 2004. *Anuario de Estadística Agraria*. Consellería do Medio Rural. Xunta de Galicia.
- Zhang, H., Y. Lu, R. W. Dawson, Y. Shi y T. Wang. 2005. Classification and ordination of DDT and HCH in soil samples from the Guanting reservoir, China. *Chemosphere*, 60: 762-769.
- Zhang, H. B., Y. M. Luo, Q. G. Zhao, M. H. Wong y G. L. Zhang. 2006. Residues of organochlorine pesticides in Hong Kong soils. *Chemosphere*, 63: 633-641.
- Zhang, H. B., Y. M. Luo, M. H. Wong, Q. G. Zhao, G. L. Zhang. 2007. Concentrations and possible sources of polychlorinated biphenyls in the soils of Hong Kong. *Geoderma*, 138: 244-251.
- Zhu, Y., H. Liu, Z. Xi, H. Cheng y X. Xu. 2005. Organochlorine pesticides (DDTs and HCHs) in soils from the outskirts of Beijing, China. *Chemosphere*, 60: 770-778.



## **CAPÍTULO 3**

### **Comportamiento de $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - y $\delta$ -hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta de una zona contaminada**

Este trabajo ha sido presentado, parcialmente:

Monterroso, M. C., Camps Arbestain, M., Calvelo Pereira, R., Rodríguez-Garrido, B., Muniategui, S., López-Mahía, P., Prada, D., Macías, F. 2002. Environmental fate and behaviour of HCH isomers in a soil-plant system in a contaminated site. *Organohalogen Compounds*, 59: 307-310.

Calvelo Pereira, R., Camps-Arbestain, M., Rodríguez-Garrido, B., Macías, F., y C. Monterroso. 2006. Behaviour of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environmental Pollution*, 144: 210-217.

	<i>Pág.</i>
RESUMEN	95
3.1. INTRODUCCIÓN	96
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	98
3.2.1. Trabajo de campo	98
3.2.2. Muestreo de suelos y vegetación	100
3.2.3. Análisis de HCH en suelos y vegetación	101
3.2.4. Tratamiento estadístico de los datos	102
3.3. RESULTADOS	102
3.3.1. Niveles generales de HCH en suelos: extracción en hexano:acetona	102
3.3.2. Niveles de HCH en plantas	103
3.3.3. Estudio de la rizosfera	105
3.4. DISCUSIÓN	108
3.4.1. Comportamiento del HCH en el suelo y acumulación en la vegetación	108
3.4.2. Factores que influyen en la acumulación de los isómeros de HCH en las plantas	109
3.4.3. El efecto rizosfera	110
3.5. CONCLUSIONES	111
3.6. BIBLIOGRAFÍA	112

## RESUMEN

En este Capítulo se investiga el comportamiento del pesticida organoclorado hexaclorociclohexano (HCH) en el sistema suelo-planta. Se han medido las concentraciones de los isómeros de HCH principales ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH) en suelo, rizosfera y vegetación de una zona contaminada en el Polígono Industrial de Torneiros, O Porriño, Pontevedra. Se trata de una antigua zona de depósito de residuos procedentes de la fabricación de lindano (99%  $\gamma$ -HCH). La concentración del HCH total (suma de  $\alpha$ + $\beta$ + $\gamma$ + $\delta$ -HCH) ha alcanzado niveles cercanos a 20 000 mg kg<sup>-1</sup>. Todas las plantas analizadas (*Avena sativa* L., *Chenopodium* spp., *Solanum nigrum* L., *Cytisus striatus* (Hill) Roth., y *Vicia sativa* L.) acumulaban todos los isómeros de HCH en sus tejidos, especialmente  $\beta$ -HCH. Los mecanismos de acumulación de HCH en los tejidos vegetales más probables son, por un lado, sorción del HCH del suelo en las raíces, y, por otro lado, adsorción en los tejidos aéreos del HCH previamente volatilizado a partir del suelo contaminado. Las concentraciones de HCH obtenidas en el suelo del cepellón y en el suelo de la rizosfera de algunas de las especies vegetales seleccionadas sugieren que las raíces tienden a reducir los niveles de los isómeros de

HCH en la rizosfera. Estos resultados ilustran la importancia de la vegetación en la distribución de los compuestos organoclorados en el sistema suelo-planta.

### 3.1 INTRODUCCIÓN

El hexaclorociclohexano (HCH) es un pesticida de gran toxicidad y persistencia, responsable de graves problemas ambientales desde el inicio de su comercialización en la década de 1940 (Turnbull, 1996; Vijgen, 2005). El HCH se obtiene de la cloración de benceno en presencia de luz. Existen ocho isómeros ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\eta$ -, y  $\theta$ ), que posee dos enantiómeros, todos ellos con la misma fórmula molecular (1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-hexaclorociclohexano), diferenciándose en la posición axial-ecuatorial de los átomos de cloro alrededor del anillo de 6 átomos de carbono (Matolcsy y col., 1988; Willet y col., 1998). El compuesto que se obtiene inicialmente es una mezcla de los diferentes isómeros, conocida como HCH técnico, que presenta actividad insecticida. No obstante, de los ocho isómeros de HCH, tan solo el isómero gamma es el responsable de la actividad biocida; este isómero se ha comercializado con el nombre genérico de lindano (99% de  $\gamma$ -HCH; Metcalf, 1955, Walker y col., 1999). Este compuesto ha tenido gran éxito como insecticida de contacto y por ingestión, siendo muy utilizado en todo el mundo; esto favoreció la instalación de industrias de fabricación y formulación, una de ellas instalada en O Porriño, Pontevedra, desde 1947 (Eptisa, 1999). La producción del lindano implica la obtención de un conjunto de residuos enriquecidos en isómeros de HCH sin propiedades insecticidas, de composición muy variable (generalmente, 65-70% de  $\alpha$ -HCH, 7-10% de  $\beta$ -HCH, 7% de  $\delta$ -HCH, 1-2% de  $\epsilon$ -HCH, <2%  $\eta$ - y  $\theta$ -HCH; Willet y col., 1998). Durante décadas, estos residuos se han depositado de modo incontrolado en áreas cercanas a la fábrica, causando la contaminación del medio (Eptisa, 1999; USC, 2003).

Por lo general, las concentraciones de los diferentes isómeros de HCH son fácilmente detectables en sumideros tan dispares como vegetación, suelo, agua, aire, por lo que es factible usar dichas concentraciones para rastrear de algún modo los procesos de transporte a nivel mundial y los diferentes destinos de estos residuos. Los isómeros que más comúnmente se encuentran en el ambiente son el  $\alpha$ -, el  $\beta$ - y el  $\gamma$ -HCH, siendo  $\alpha$ -HCH típico de ambientes acuáticos y atmósfera, mientras que  $\beta$ -HCH (molécula muy lipofílica y más estable) predomina en suelos y en diferentes tejidos y fluidos animales (Walker y col., 1999; Li y Macdonald, 2005). El medio se contamina por la presencia de estas sustancias debido a su uso como pesticida agrícola durante décadas, o bien a causa de un vertido incontrolado de los residuos de fabricación de los compuestos comerciales. Estos compuestos orgánicos de carácter tóxico presentan tendencia a depositarse en los suelos. Una vez que los diferentes isómeros llegan a entrar en contacto con el suelo, bien se adsorben a las partículas del suelo, bien son retirados del suelo a través de diferentes procesos (volatilización, degradación microbiana, lixiviación, absorción radicular; Fabre y col., 2005). Esta distribución, con el tiempo, ocasiona una contaminación a nivel global de las aguas superficiales, otros suelos y los organismos vivos (Li, 1999).

Así pues, la vegetación puede constituir un importante sumidero de compuestos organoclorados, ya que se acumulan en los diferentes tejidos y órganos de las plantas (Buckley, 1982; Simonich y Hites, 1994). Existen dos **rutas** principales de entrada de los compuestos orgánicos de origen xenobiótico en las

plantas: i), ruta **suelo-planta** y ii), ruta **aire-planta** (Wang y col., 1997). El peso molecular, la solubilidad acuosa, la polaridad y sobre todo la hidrofobicidad son los parámetros que determinan en un principio el destino de un pesticida en el suelo (Tabla 3.1) (Pivetz, 2001; Burken, 2003). La transferencia suelo-planta es muy importante para compuestos hidrofílicos o moderadamente hidrofóbicos, que presentan un coeficiente de reparto octanol:agua moderado a bajo ( $\text{LogK}_{\text{ow}}$ : 0.5-3.0), pues facilita su transporte al interior de la planta a través de los tejidos de la raíz (Briggs y col., 1982; Burken y Schnoor, 1998). Para compuestos fuertemente hidrofóbicos, como los isómeros de HCH, esta ruta es relativamente poco probable. No obstante, las interacciones entre la raíz y la zona de suelo que la rodea (la **rizosfera**), pueden afectar al comportamiento de los contaminantes, modificando las propiedades físico-químicas del sistema, introduciendo cambios en los microorganismos y afectando a la entrada de los contaminantes en las plantas (Anderson y col., 1993; Pinton y col., 2001; Davis y col., 2002). Con el desarrollo de las técnicas de bio y fitocorrección se ha puesto de manifiesto la importancia de estas interacciones entre el sistema radicular de las plantas y su entorno edáfico más cercano en los procesos de descontaminación de suelos. Este "**efecto rizosfera**" se limita a un volumen de suelo muy pequeño, en función de la tasa de exudación de las raíces y del uso que los microorganismos hagan de los compuestos liberados (rizodepositos). Éstos constituyen un conjunto heterogéneo de compuestos orgánicos de muy distintos pesos moleculares, liberados o secretados por las raíces. Entre los compuestos de elevado peso molecular destacan el mucílago y enzimas (ectoenzimas), mientras que entre los compuestos de bajo peso molecular se encuentran ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos y aminoácidos (Pinton y col., 2001; Marschner, 2003). Otras modificaciones que tienen lugar en la rizosfera, asociadas a la actividad de las raíces, se deben a procesos de (i) absorción de nutrientes, con liberación de  $\text{H}^+$  y/o  $\text{HCO}_3^-$ , (ii) respiración radicular, con consumo de  $\text{O}_2$  y liberación de  $\text{CO}_2$ , y (iii) absorción de  $\text{H}_2\text{O}$ , con lo que se crean unas condiciones físico-químicas (pH, Eh, potencial hídrico) distintas a las que tienen lugar en zonas del suelo alejadas de las raíces (Marschner, 2003).

Por otro lado, la segunda ruta preferente de acumulación de HCH en la vegetación, la **ruta aire-planta**, afectará a compuestos volátiles o relativamente volátiles que presentan tendencia a la deposición en los tejidos aéreos de la vegetación; este es el caso de los diferentes isómeros de HCH, que se han detectado en numerosas restos vegetales (Muir y col., 1993). Este proceso está relacionado con características específicas de la fisiología de la especie vegetal a considerar, tal como el contenido en lípidos de la cutícula o la superficie específica expuesta hacia la atmósfera, que constituye el lugar de entrada (Schreiber y Schönherr, 1992; Bakker, 2000; Barber y col., 2004). Esta ruta implicaría un proceso inicial de volatilización a partir del suelo y posterior reparto a partir de la fase gaseosa (reparto en equilibrio, deposición seca y/o húmeda) o bien como partículas (Welsch-Pausch y col., 1995). En todo caso, la deposición se ve afectada por factores ambientales tales como la temperatura o la velocidad del viento (Paterson y col., 1991; Simonich y Hites, 1995a).

Por último, estos compuestos presentan una gran tendencia a la concentración en los horizontes superficiales de los suelos como resultado de la incorporación de la hojarasca en descomposición contaminada con HCH (Horstmann y McLachlan, 1996). Los procesos que más influyen en el comportamiento de los contaminantes en el suelo - especialmente de los contaminantes orgánicos - son los relacionados con la descomposición y humificación de los restos vegetales. La nueva fracción orgánica que

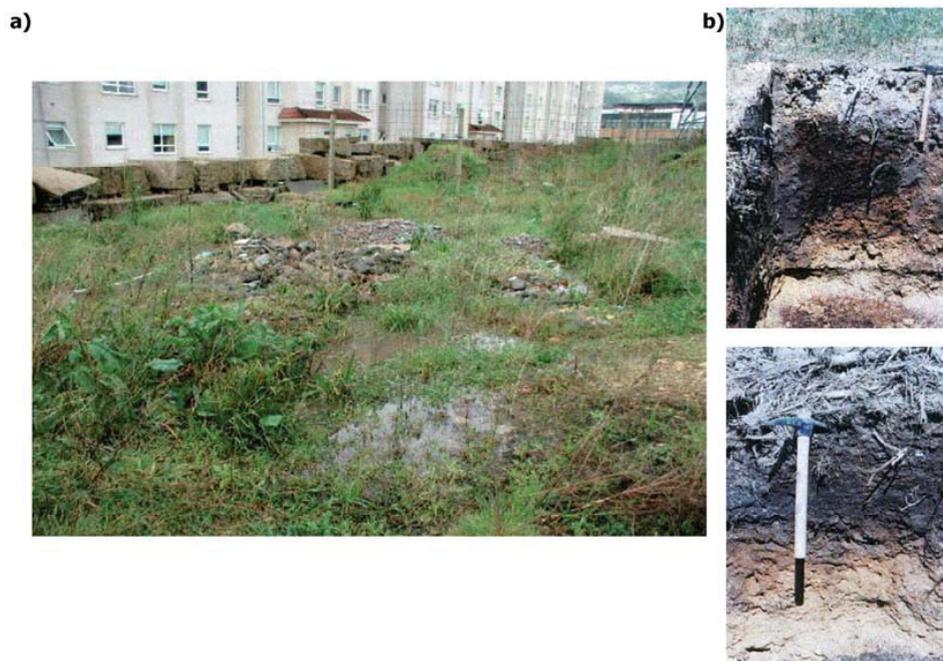
así se va formando es fundamental para el desarrollo del suelo, y con ello mejorar las propiedades de la zona contaminada. Con el paso del tiempo, no obstante, la biodisponibilidad de estos compuestos disminuye con el efecto de "envejecimiento" y la formación de los denominados residuos enlazados, lo que ocurre durante los procesos de descomposición y humificación de la materia orgánica (Alexander, 2000; Weber y Huang, 2003). Estos procesos también tienen lugar en la rizosfera, caracterizada por un contenido de materia orgánica superior a zonas del suelo más alejadas de las raíces. Sin embargo, las plantas pueden influir indirectamente en la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos ya que la liberación de exudados radiculares puede incluir compuestos que actúan como surfactantes (Pinton y col., 2001).

Hasta la fecha no hay muchos estudios que investiguen el "efecto rizosfera" sobre el comportamiento de los isómeros de hexaclorociclohexano (HCH) presentes en sistemas edáficos. A menudo los suelos contaminados con elevados niveles de isómeros HCH se encuentran en zonas cercanas a los puntos de producción, donde antaño se vertían los isómeros HCH sin propiedades insecticidas (mayoritariamente  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ ), que representaban el 85% del producto formado en el proceso de fabricación. Este es el caso de la zona del Polígono Industrial de Torneiros, en O Porriño (Pontevedra), donde actualmente se están realizando estudios de descontaminación de suelos y aguas afectados por estos compuestos organoclorados (ver Capítulo 1). El **objetivo** de este trabajo es investigar las concentraciones de los isómeros mayoritarios de HCH  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -HCH en suelos, rizosfera y vegetación localizados en un lugar contaminado cercano a la zona de depósito de residuos de HCH. Se pretende contribuir al conocimiento de los mecanismos de acumulación de estos isómeros en los diferentes compartimentos de los ecosistemas terrestres: suelo y planta.

### 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.1. Trabajo de campo

El presente estudio se ha realizado en una parcela experimental en Torneiros, O Porriño, de una extensión aproximada de 3 560 m<sup>2</sup>, contaminada con los diferentes isómeros de HCH. La composición del residuo de HCH era la siguiente: 77%  $\alpha$ -HCH, 16%  $\beta$ -HCH, 5%  $\gamma$ -HCH y 2%  $\delta$ -HCH (USC, 2003). Los valores medios anuales de precipitación y temperatura del área de estudio son 1504 mm y 14.4°C, respectivamente, si bien existen grandes variaciones estacionales ligadas a la orografía de la zona (Martínez Cortizas y Pérez Alberti, 1999). Los suelos predominantes en esta zona derivan de sedimentos aluvio-coluviales de textura muy heterogénea, con la abundancia de fragmentos gruesos, siendo la permeabilidad muy variable (Foto 3.1). Se trata de Tecnosoles Úrbicos y/o Regosoles Técnicos (IUSS Working Group, 2007). En todo caso, el suelo de la zona de estudio es muy complejo a consecuencia de que la zona se ha rellenado varias veces. En un primer momento el lugar presentaba un aspecto muy heterogéneo respecto a la vegetación, los materiales superficiales (suelos o desechos de origen antrópico) y la topografía (Foto 3.1). Las principales características físico-químicas de los suelos se resumen en la Tabla 3.2. Son suelos con valores de pH bajos, baja saturación en el complejo de cambio y relativamente ricos en carbono orgánico, siendo pobres en nitrógeno. La presencia de aluminio en el complejo de cambio, si bien variable, tiende a ser muy alta.



**Foto 3.1.** a) aspecto general parcela; b) perfiles característicos de los suelos de la parcela contaminada.

**Tabla 3.1.** Propiedades físico-químicas del  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -hexaclorociclohexano.

Propiedad	Isómero				Referencias
	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	$\delta$ -HCH	
Densidad (Kg L <sup>-1</sup> )	1.87	1.89	1.85	- <sup>1</sup>	Prager, 1995.
Punto de fusión (°C)	157-160	309-310	112.5	138-139	Suntio y col., 1988.
Presión de vapor (Pa, 20°C)	5.3 10 <sup>-3</sup>	4.3 10 <sup>-5</sup>	2.9 10 <sup>-3</sup>	2.3 10 <sup>-3</sup>	Manz y col., 2001.
Constante de la Ley de Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	0.870	0.120	0.130	0.073	Suntio y col., 1988.
Solubilidad					
En agua (mg L <sup>-1</sup> )	10	5	7.3	10	Prager, 1995.
	1.6	0.32	6.2	9.0	Manz y col., 2001.
Coefficientes de reparto					
Log K <sub>ow</sub> <sup>2</sup>	3.8	3.78	3.61-3.72	4.14	Prager, 1995.
	3.81	3.80	3.80	4.10	Suntio y col., 1988.
Log K <sub>oc</sub> <sup>3</sup>	3.0-3.57	3.57	3.57	3.8	U.S. D. H. H. S., 2005.
Log K <sub>oa</sub> <sup>4</sup>	7.25	8.09	7.88-7.99	8.66	Calculado <sup>4</sup>
Factores de bioconcentración (FBC)					
FBC (tejidos grasos humanos)	20±8	527±140	19±9	8.5	Willet y col., 1998.
FBC (animales acuáticos)	2.6±0.5	2.9±0.3	2.5±0.4	- <sup>1</sup>	Willet y col., 1998.

<sup>1</sup> no hay dato; <sup>2</sup> coeficiente de reparto octanol-agua; <sup>3</sup> coeficiente de reparto octanol-carbono orgánico; <sup>4</sup> coeficiente de reparto octanol-aire, calculado a partir de Suntio y col., (1988), Bacci y col., (1990) y Paterson y col., (1991).

En abril de 2001 se procedió a desbrozar la vegetación y allanar la superficie de la parcela experimental. En junio de 2001 se realizaron tareas agrícolas de arado (30 cm), encalado y fertilización del terreno, para mejorar las condiciones. Posteriormente se realizó una siembra homogénea con mezcla de

dos especies de uso agrícola: *Vicia sativa* L. y *Avena sativa* L. En poco tiempo se alcanzó una elevada cobertura vegetal en toda la parcela, a excepción de un área de unos 100 m<sup>2</sup> en la que se encontraron los niveles de contaminación más elevados. De las especies sembradas, *Avena sativa* L. consiguió un establecimiento y desarrollo muy buenos, mientras que el grado de implantación y desarrollo de *Vicia sativa* L. fueron escasos. Además de las especies cultivadas se desarrollaron de forma espontánea otras plantas, de las que destacaban por su abundancia: *Chenopodium spp.*, *Solanum nigrum* L. y *Cytisus striatus* (Hill) Roth. En el área de mayor contaminación se establecieron únicamente *Avena sativa* L. y *Cytisus striatus* (Hill) Roth., lo que motivó el interés de un estudio pormenorizado de estas dos especies.

**Tabla 3.2.** Valores medio, máximo y mínimo de los diferentes parámetros físico-químicos en los horizontes superficiales de los suelos de la parcela de Torneiros. (n = 8).

		media	mínimo	máximo
pH H <sub>2</sub> O		5.3	3.7	7.5
pH KCl		4.7	3.2	6.8
Al		1.6	0.01	6.1
Ca	cmolc kg <sup>-1</sup>	3.4	0.1	22.9
Mg		0.2	0.01	0.6
Na		0.1	0.02	0.5
K		0.2	0.02	0.6
CICe		5.5	0.7	23.4
% Al cambio		47.8	0.1	90.9
%C		3.9	0.2	16.7
%N		0.2	0.02	0.9
C/N		55.5	10.0	18.5
P Olsen (mg kg <sup>-1</sup> )		5.6	0.2	37.0

### 3.2.2. Muestreo de suelos y vegetación

En octubre de 2001 se tomaron muestras del horizonte superficial (20 cm) del suelo en 18 puntos distribuidos en dos transectos dentro de la parcela experimental (nueve puntos por transecto). Las muestras se secaron al aire, se tamizaron por 2 mm y se molieron (<50 µm) para posteriores análisis. En 8 puntos de muestreo se tomaron plantas enteras de las especies más comunes en toda la parcela: *Avena sativa* L., *Chenopodium spp.*, *Solanum nigrum* L. y *Cytisus striatus* (Hill) Roth., así como de *Vicia sativa* L. Las plantas se lavaron para eliminar las partículas de suelo adheridas a su superficie y se separaron en las diferentes fracciones considerando los tejidos principales (raíz, tallo y hojas). Las muestras de vegetación se secaron a temperatura ambiente para evitar una pérdida excesiva del contaminante por volatilización; finalmente se molieron y almacenaron para su análisis posterior.

De las cuatro especies más comunes se seleccionaron dos para hacer el estudio de la rizosfera: *Avena sativa* L. y *Cytisus striatus* (Hill) Roth. Ambas plantas mostraron elevada resistencia a altas concentraciones de HCH; fueron las únicas especies que se establecieron en las áreas más contaminadas de la parcela. Esta última tiene gran interés, además, por ser leguminosa, espontánea y muy común en la zona contaminada. De cada especie se recogieron tres cepellones enteros y se separaron en **suelo de cepellón** (sin contacto con la raíz; suelo del entorno de la raíz), **rizosfera** (suelo adherido a las raíces) y **raíz**. En la obtención de la rizosfera se utilizó una versión modificada del método de agitación de Chung y

Zasozki (1994); el paso que implica un secado de las raíces y suelo muy adherido a 60°C no fue utilizado (Camps Arbertain y col, 2003). Las muestras se prepararon para su posterior análisis mediante secado al aire y tamizado (suelo) y molido (suelo y raíz). Dada la dificultad que plantea la recogida de suelo rizosférico, inicialmente tan sólo se dispuso de tres plantas por especie. En un muestreo posterior de una zona similar de la parcela se pudieron recoger y tratar del mismo modo dos nuevas muestras de cada una de las especies, completando así un número representativo de réplicas ( $n = 5$ ). En el tratamiento de algunas de las muestras se perdió la correspondiente parte aérea, no siendo posible presentar esos datos.

### 3.2.3. Análisis de HCH en suelos y vegetación

**Reactivos utilizados:**  $\alpha$ -HCH (98.7% de pureza) de Riedel-de-Haën AG;  $\beta$ -HCH (98.1% de pureza) de Riedel-de-Haën AG;  $\gamma$ -HCH (99% de pureza) de Sigma;  $\delta$ -HCH (98.6% de pureza) de Riedel-de-Haën AG; 2,4,5,6,-Tetracloro-*m*-xileno (TCMX) de Supelco (Bellefonte, PA, USA); Sulfato sódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (99% de pureza) de Panreac; Hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) (95% de pureza) de Fluka; Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ) (99.5% de pureza) de Fluka; Acetato de etilo ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) (99.8% de pureza) de Sigma; Cartuchos Sep Pak ® 20 cc (5 g) Florisil ®; Alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (neutra) de Sigma.

#### Método de extracción de HCH en suelos

**i. Extracción en hexano:acetona (1:1):  $\text{HCH}_{\text{HA}}$ .** Las muestras de suelo secadas y tamizadas por luz de malla 2 mm fueron molidas para reducir el tamaño de partícula (hasta  $< 50 \mu\text{m}$ ). Se extrajeron 0.2 g de muestra con 15 mL de una disolución de hexano:acetona (1:1, v/v) en un baño de ultrasonidos (30 minutos), se pasaron por filtros de fibra de vidrio, se enrasaron a 25 mL con hexano; el extracto se diluyó a niveles dentro del rango adecuado para la posterior determinación cromatográfica. Los extractos se conservaron en nevera a  $-4^\circ\text{C}$ . Esta extracción se realizó en todas las muestras de suelo.

**ii. Extracción en agua:  $\text{HCH}_{\text{H}_2\text{O}}$ .** En el caso de las muestras de suelo de cepellón y rizosfera de *Avena* y *Cytisus*, se determinó adicionalmente la concentración de los diferentes isómeros de HCH solubles en agua. Una fracción de las muestras de suelo secadas, tamizadas y molidas (aproximadamente 0.2 g) se extrajo con agua destilada en un baño de ultrasonidos, se filtró (filtro de fibra de vidrio) y enrasó a 25 mL con agua destilada. Este extracto se centrifugó a 4000 rpm durante 12 minutos y se filtró de nuevo. Finalmente se realizó una extracción de una alícuota con hexano (1:2, v/v) y se diluyó a niveles dentro del rango adecuado para la determinación cromatográfica. Los extractos se conservaron en nevera a  $-4^\circ\text{C}$ .

#### Método de extracción de HCH en matrices vegetales

Se tomaron 0.3 g de muestra seca y molidas de las distintas fracciones y se extrajeron en 15 mL de disolvente orgánico (disolución de hexano:acetona 1:1, v/v) en horno microondas. Posteriormente se secaron con sulfato sódico anhidro, filtrándose el extracto. Se procedió, a continuación, a pasos sucesivos de purificación en cartucho de Florisil (5 g) y Alúmina (2 g), eluyendo con 35 mL de hexano:acetato de etilo

(80:20). Se enrasaron finalmente a 50 mL con hexano y se procedió a diluir los extractos dentro del rango lineal. Los extractos se conservaron en nevera a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Esta analítica fue realizada en el Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidade de A Coruña.

Para realizar la identificación y cuantificación de los distintos isómeros de HCH se utilizó un equipo de cromatografía de gases con detector de captura electrónica (GC/ECD). El cromatógrafo de gases es un modelo GC 8532 Mega 2 series (Fisons Instruments, Milan, Italia) equipado con un detector de captura electrónica modelo ECD 850 (Thermo Quest, Milan, Italia). Se trabajó con un equipo de inyección automática (modelo AS 800, Fisons Instruments, Milan, Italia) de tipo split/splitless en modo splitless. El volumen de inyección utilizado fue de  $1\ \mu\text{L}$ . Para la separación de los distintos isómeros se usó una columna capilar Rtx®-ClPesticides (Restek Corporation, E.E.U.U. Bellefonte, PA) de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno con una fase estacionaria adosada al capilar. La temperatura de inyección es de  $270^{\circ}\text{C}$  y la temperatura del detector, de  $300^{\circ}\text{C}$ . Como gas portador se usó helio (He), con una presión de 115 KPa y como gas auxiliar del detector se usó nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), con una presión de 105 KPa. Se trabajó en condiciones de gradiente de temperatura, con un programa que partía de  $60^{\circ}\text{C}$  (3 min) con una rampa de temperatura de  $30^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$ , hasta  $180^{\circ}\text{C}$  (0 min), luego una segunda rampa de  $6^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$ , hasta  $230^{\circ}\text{C}$  (0 min), para finalizar con una rampa de  $30^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$  hasta  $270^{\circ}\text{C}$  (4 min). Las curvas de calibración se obtuvieron por inyección de disoluciones patrón en hexano de la mezcla de los 4 isómeros, preparadas a partir de una disolución inicial de  $500\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$  en acetona, de concentraciones 5, 10, 25 y  $50\ \mu\text{L}^{-1}$ . El 2,4,5,6,-Tetracloro-*m*-xileno (TCMX) se utilizó como patrón interno en el análisis de muestras de vegetación.

### 3.2.4. Tratamiento estadístico de los datos

Los datos fueron normalizados (transformación logarítmica,  $\text{Log}_{10}$ ) antes de la utilización de un test *t* de Student y un análisis de la varianza (ANOVA) para ver las diferencias significativas en los resultados. Como los datos de concentración mostraron una gran dispersión se ha optado por utilizar el dato de mediana y no el de media.

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Niveles generales de HCH en suelos: extracción en hexano:acetona

La concentración de  $\text{HCH}_{\text{HA}}$  total (suma de  $\alpha$ - +  $\beta$ - +  $\delta$ - +  $\gamma$ -HCH) en los primeros 20 cm de suelo oscila en unos márgenes muy amplios (entre 2 y  $19\ 905\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ) (Tabla 3.3). Los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  son mayoritarios en todas las muestras analizadas. La concentración de  $\alpha$ -HCH varía entre  $1.1$  y  $13\ 375\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ , mientras que la de  $\beta$ -HCH, entre  $0.9$  y  $6\ 513\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ , con valores medios de  $9.6$  y  $10.5\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ , respectivamente (Tabla 3.3). Las concentraciones de los isómeros menos abundantes,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, oscilan entre  $0.1$  y  $11.3\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  (Tabla 3.3). La distribución relativa de los distintos isómeros con respecto al  $\text{HCH}_{\text{HA}}$  total es diferente a la distribución característica del residuo original encontrado en la parcela experimental

## Comportamiento del hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta

de O Porriño (Figura 3.1). Así, aunque el isómero  $\alpha$ -HCH presente en el residuo sólido originado por la producción de HCH constituye un 77% del HCH total, este valor desciende a un 62% en los suelos del área de estudio (valores medios). Por el contrario, el porcentaje del isómero  $\beta$ -HCH aumenta de un modo claro, desde un 16% del HCH total en el residuo hasta el 38% en los suelos (valores medios; Figura 3.1), llegando incluso a convertirse en el isómero dominante en alguno de los puntos de muestreo.

**Tabla 3.3.** Concentraciones mínima, máxima, media y mediana ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de los isómeros de HCH individuales y del HCHtotal ( $\alpha + \beta + \gamma + \delta$ ) extraídos con hexano:acetón en los suelos y en los diferentes tejidos vegetales (raíces, tallos, hojas) de las plantas analizadas; n es el número de muestra utilizadas en cada caso.

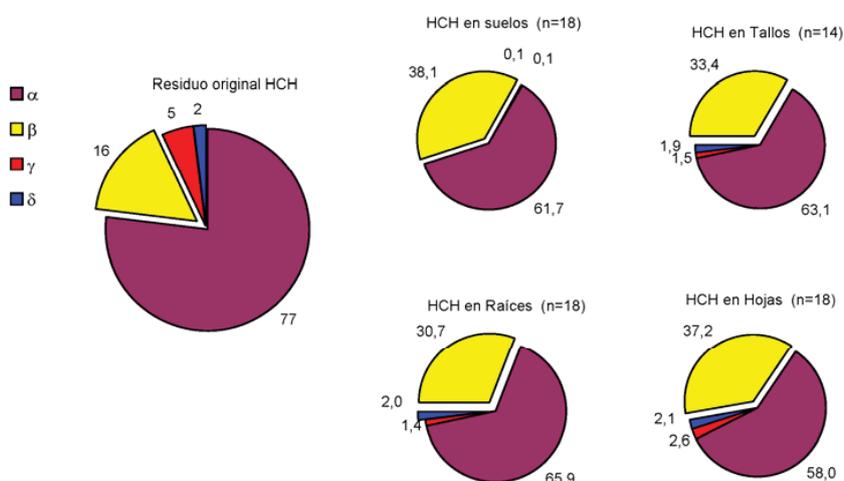
	n		mínimo	máximo	media		d.s. <sup>1</sup>	mediana
					geométrica	media aritmética.		
Suelo	18	<b>HCH total</b>	1.9	19 904.6	38.7	1 234.6	4 665.9	31.6
		$\alpha$	1	13 375.0	10.3	762.1	3 147.9	9.6
		$\beta$	0.9	6 512.5	23.8	469.8	1 522.7	10.5
		$\gamma$	0.1	11.3	0.7	1.9	3.2	0.7
		$\delta$	0.1	9.9	0.5	1.7	2.8	0.8
Raíz	18	<b>HCH total</b>	1.7	29.8	7.3	9.7	7.7	6.2
		$\alpha$	1	10.1	2	2.6	2.4	1.8
		$\beta$	0.7	18.9	4.6	6.7	5.5	4.2
		$\gamma$	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1
		$\delta$	0.1	0.8	0.1	0.2	0.2	0.1
Tallo	14	<b>HCH total</b>	1.6	20.5	8	9.7	5.6	10.1
		$\alpha$	0.7	4.4	2.1	2.4	1.2	1.9
		$\beta$	0.4	15.6	5	7	4.6	8.0
		$\gamma$	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1
		$\delta$	0.1	0.9	0.1	0.2	0.2	0.1
Hoja	18	<b>HCH total</b>	3.7	62.5	16.7	21.1	14.6	18.6
		$\alpha$	2.5	18.7	6.2	7.2	4.1	6.3
		$\beta$	0.9	40.3	8.9	12.9	10.1	11.1
		$\gamma$	0.1	1.4	0.4	0.5	0.4	0.3
		$\delta$	0.1	2.2	0.3	0.5	0.5	0.3

<sup>1</sup> d.s. desviación estándar.

### 3.3.2. Niveles de HCH en plantas

La concentración del HCH total en las muestras vegetales de todas las especies analizadas varía entre 1.6 y 63  $\text{mg kg}^{-1}$  (Tabla 3.3). Existen diferencias claras entre los tejidos considerados. En todo caso, existe un relación entre las concentraciones encontradas en los suelos y las que se corresponden con los tejidos vegetales ( $r > 0.500$ ; significativo en la mayoría de los casos; Tabla 3.4). Las mayores concentraciones se han encontrado en las partes aéreas de todas las especies vegetales muestreadas. El HCH total varía entre 1.7 y 30  $\text{mg kg}^{-1}$  en las raíces, entre 1.6 y 21  $\text{mg kg}^{-1}$  en los tallos y entre 4 y 62  $\text{mg kg}^{-1}$  en las hojas, con concentraciones medias de HCH total en raíces, tallos y hojas, respectivamente, 6, 10 y 22  $\text{mg kg}^{-1}$  (Tabla 3.3). Este patrón de distribución del HCH se ha encontrado en todas las especies analizadas, independientemente del nivel de contaminación que presente el suelo, como se observa en detalle en la Figura 3.2. Esta figura muestra los niveles de concentración los isómeros de HCH en suelo y tejidos vegetales en las plantas recogidas en dos de los puntos de muestreo: un punto de muestreo de gran contaminación en el suelo ( $\text{HCH}_{\text{HA}}$  total 19 905  $\text{mg kg}^{-1}$ ; Figura 3.2a), y un segundo punto con una concentración en suelo relativamente baja ( $\text{HCH}_{\text{HA}}$  total 45  $\text{mg kg}^{-1}$ ; Figura 3.2b). En ambos casos, las

especies vegetales que tienden a presentar la mayor y la menor capacidad de acumulación de HCH son, respectivamente, *Avena sativa* L. y *Chenopodium* spp, aunque las diferencias no son significativas a  $P < 0.05$ . En general,  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH son los isómeros mayoritarios encontrados en todas las plantas, si bien las mayores concentraciones se corresponden generalmente con el isómero  $\beta$ -HCH (por ejemplo, la concentración de  $\beta$ -HCH en hojas varía entre 1 y 40  $\text{mg kg}^{-1}$ , Tabla 3.3). Por su parte, los isómeros minoritarios,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, se acumulan en todas las plantas analizadas, pero siempre en concentraciones relativamente muy bajas. La concentración de  $\gamma$ -HCH oscila entre 0.1 y 1.4  $\text{mg kg}^{-1}$ , mientras que la de  $\delta$ -HCH varía entre 0.1 y 2.2  $\text{mg kg}^{-1}$  (Tabla 3.3).



**Figura 3.1.** Distribución porcentual de los isómeros de HCH ( $\text{HCH}_{\text{HA}}$ ) en los suelos y tejidos vegetales (raíz, tallo, hojas), comparada con la distribución de los restos de HCH del residuo original de O Porriño, Pontevedra.

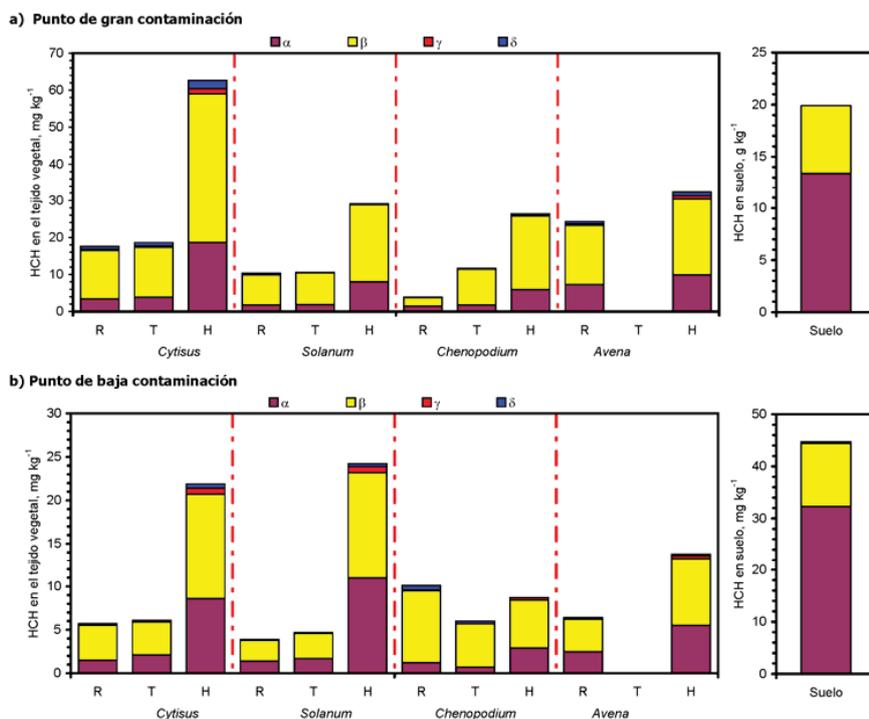
**Tabla 3.4.** Coeficientes de correlación entre las concentraciones de los isómeros de HCH en el suelo y los diferentes tejidos vegetales.

	SUELO				HCH total
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	
RAÍZ	0.601**	0.581*	0.698**	0.705**	0.626**
TALLO	n.s. <sup>1</sup>	0.707**	n.s.	0.616*	0.660*
HOJA	0.504*	0.778**	0.491*	n.s.	0.724**

\*\* correlación significativa,  $P < 0.01$ ; \* correlación significativa,  $P < 0.05$ ; <sup>1</sup> n.s. no significativo.

La distribución relativa de los cuatro isómeros de HCH en los tejidos vegetales es diferente con respecto a la observada en los suelos. En las plantas, el isómero  $\beta$ -HCH es el más abundante, seguido por el isómero  $\alpha$ -HCH (Figura 3.1; Figura 3.2). En las raíces, el isómero  $\beta$ -HCH constituye hasta un 66% del  $\text{HCH}_{\text{HA}}$  total, comparado con el 63 y el 58% que representa en el tallo y las hojas, respectivamente (valores medios; Figura 3.1). El patrón de distribución del isómero  $\alpha$ -HCH es otro, al presentar una acumulación

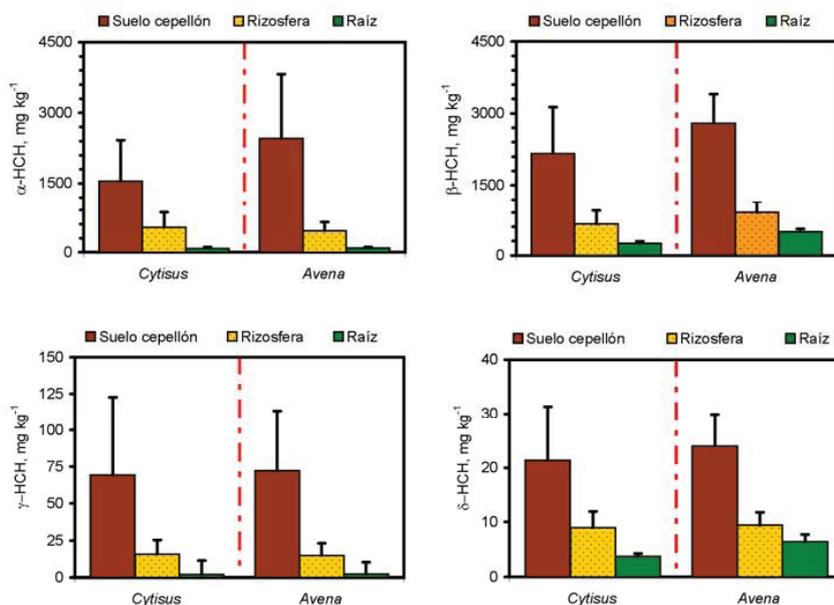
relativa mayor en la parte aérea. Los porcentajes medios de  $\alpha$ -HCH relativo al HCH total son 37, 33 y 31% en hojas, tallo y raíces, respectivamente. Finalmente, los isómeros minoritarios,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, representan sólo entre el 1.4 y el 3% del HCH total en los distintos tejidos vegetales analizados (Figura 3.1).



**Figura 3.2.** Concentración de los isómeros de HCH en los distintos tejidos de cuatro especies vegetales en dos lugares seleccionados: a) emplazamiento con un elevado nivel de contaminación y b) emplazamiento con un bajo nivel de contaminación. (R: raíces; T: tallos; H: hojas).

### 3.3.3. Estudio de la rizosfera

El suelo rizosférico de las dos especies estudiadas (Cytisus y Avena) presenta concentraciones de todos los isómeros de  $HCH_{HA}$  al menos un orden de magnitud inferior a los detectados en el suelo no rizosférico (Figura 3.3). La concentración de HCH total extraído en agua ( $HCH_{H_2O}$ ), por su parte, no supone nunca el 20% de las concentraciones detectadas al extraer con hexano:acetona, tanto en el suelo de cepellón como en la rizosfera, para las dos especies (Figura 3.3; Figura 3.4).

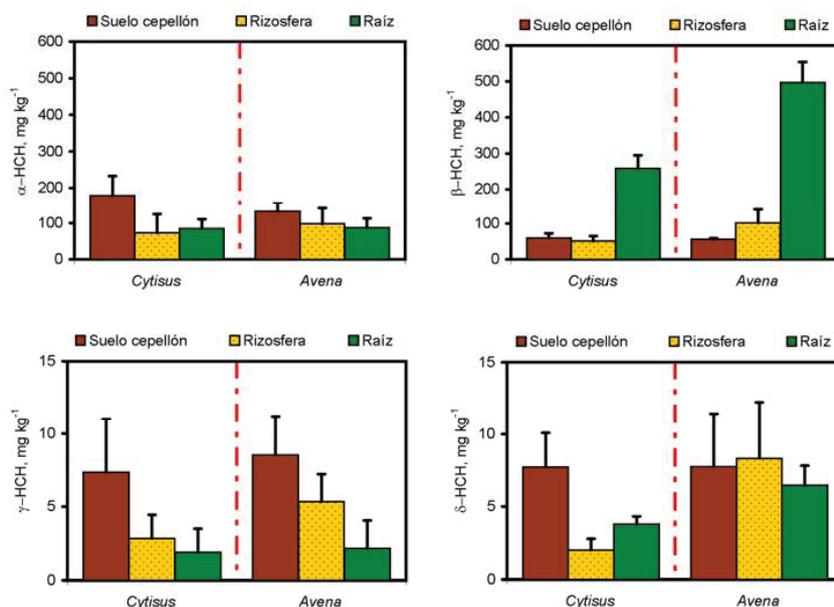


**Figura 3.3.** Concentración media (mg kg<sup>-1</sup>) de los isómeros de HCH extraídos con hexano:acetona (1:1, v/v; HCH<sub>HA</sub>) en las diferentes fracciones consideradas (suelo de cepellón, rizosfera y raíz) en las dos especies vegetales estudiadas (*Avena* y *Cytisus*). Las barras verticales representan el error estándar.

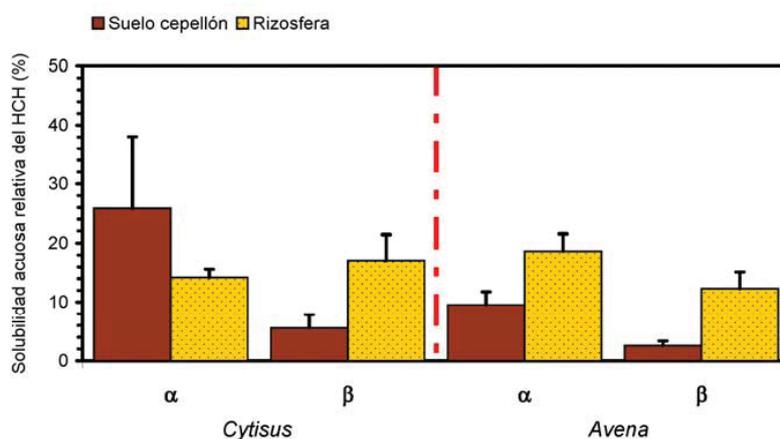
La diferencia entre los tipos de extractantes es de una importancia relativa mayor en el suelo de cepellón que en la rizosfera, especialmente en el caso del isómero  $\beta$  (la diferencia es significativa a  $P < 0.005$ ). Por otro lado, la distribución de los isómeros varía mucho entre los suelos, con predominio de  $\alpha$ -HCH<sub>H<sub>2</sub>O</sub> en el suelo de cepellón y predominio de  $\beta$ -HCH<sub>H<sub>2</sub>O</sub> en la rizosfera. La concentración de los isómeros de HCH en los tejidos vegetales, por su parte, es relativamente constante dentro de la misma especie, si bien *Avena sativa* L. es capaz de acumular más HCH en la raíz que *Cytisus striatus* (Hill) Roth., particularmente en el caso del isómero  $\beta$ -HCH.

Si se utiliza el cociente HCH<sub>H<sub>2</sub>O</sub>/HCH<sub>HA</sub> para determinar el porcentaje de solubilidad de cada isómero de HCH en agua y como un indicio para evaluar la biodisponibilidad, los resultados muestran que el isómero  $\alpha$ -HCH es más fácilmente biodisponible que el isómero  $\beta$ -HCH (Figura 3.5). Además, los valores del cociente  $\alpha$ -HCH<sub>H<sub>2</sub>O</sub>/ $\alpha$ -HCH<sub>HA</sub> y  $\beta$ -HCH<sub>H<sub>2</sub>O</sub>/ $\beta$ -HCH<sub>HA</sub> tienden a aumentar en la rizosfera con respecto al suelo del cepellón en *Avena sativa* L.

### Comportamiento del hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta



**Figura 3.4.** Concentración media (mg kg<sup>-1</sup>) de los isómeros de HCH extraídos con agua (HCH<sub>H2O</sub>) en el suelo de cepellón y el suelo de la rizosfera en las dos especies consideradas (*Avena* y *Cytisus*), en comparación con el HCH extraído en las raíces en hexano:acetona (1:1, v/v). Las barras verticales representan el error estándar.

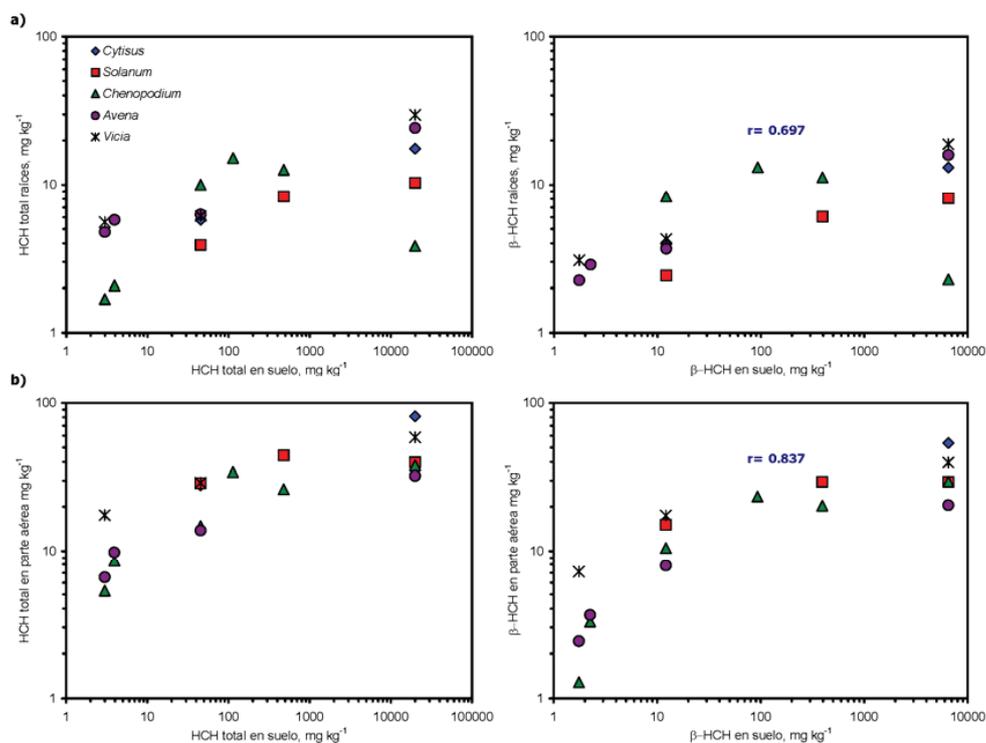


**Figura 3.5.** Solubilidad acuosa relativa expresada como porcentaje ( $\alpha\text{-HCH}_{\text{H}_2\text{O}} \times 100 / \alpha\text{-HCH}_{\text{HA}}$  y  $\beta\text{-HCH}_{\text{H}_2\text{O}} \times 100 / \beta\text{-HCH}_{\text{HA}}$ ) para los principales isómeros en los suelos considerados (suelo del cepellón y rizosfera) y para las dos especies vegetales consideradas (*Cytisus* y *Avena*). Las barras verticales indican el error estándar.

### 3.4. DISCUSIÓN

#### 3.4.1. Comportamiento del HCH en el suelo y acumulación en la vegetación

Las especies vegetales analizadas son capaces de acumular todos los isómeros principales de HCH en sus tejidos, aunque no en las mismas concentraciones. El mecanismo de acumulación de HCH en los tejidos vegetales es un proceso isómero-selectivo. Se encuentran cantidades más elevadas del isómero  $\beta$ -HCH que del resto de isómeros en las distintas fracciones vegetales consideradas. Esto es más acusado en los tejidos de la raíz, en contacto directo con el contaminante. La concentración de HCH en suelo cercano a las raíces tiene un efecto en la retención del  $\beta$ -HCH tanto en los tejidos radicales como en los tejidos aéreos. En general, el HCH se acumula en los tejidos aéreos en mayor cantidad que en las raíces, independientemente del tipo de planta. Hay una estrecha relación entre las concentraciones en los suelos con respecto a las concentraciones en los tejidos vegetales (Figura 3.6). Esto es más evidente en el caso del isómero  $\beta$ -HCH en los tejidos de la raíz, que presenta un ajuste lineal con un coeficiente de correlación alto ( $r=0.697$ ; Figura 3.6a). Si se considera la parte aérea globalmente (hojas y tallo), la relación es más clara, si bien ya no parece ser tan lineal ( $r=0.837$ ; Figura 3.6b). Esto indica que hay diferencias no sólo considerando los isómeros de HCH sino que también ejerce influencia el tipo de tejido que se considere y la constitución de éste.



**Figura 3.6.** Concentración de HCH ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en los suelos y tejidos vegetales de las especies vegetales utilizadas. a) suelo frente a raíz; b) suelo frente a parte aérea. Las concentraciones se expresan en escala logarítmica ( $\text{Log}_{10}$ ).  $n = 5$ .

### 3.4.2. Factores que influyen en la acumulación de los isómeros de HCH en las plantas

La acumulación de HCH en las raíces, especialmente en el caso del isómero  $\beta$ , se produce como resultado de un reparto hidrofóbico entre la solución acuosa y las superficies celulares de los tejidos de la raíz. Hay una gran preferencia por la sorción sobre la superficie de las raíces (**sorción no específica**). Los factores que pueden afectar a este proceso son, por un lado, la concentración y la hidrofobicidad del compuesto y, por otro lado, el contenido en lípidos y la superficie expuesta al reparto en la raíz. No obstante, otro mecanismo que podría estar actuando sería una **sorción específica** sobre las superficies vegetales a través de la unión con los componentes de la pared celular (Dietz y Schnoor, 2001).

Estudios previos sobre la acumulación de compuestos orgánicos en la vegetación han encontrado una relación entre el llamado Factor de Concentración de la Raíz (FCR), obtenido a partir de experimentos en cultivo hidropónico, y el coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) (Dietz y Schnoor, 2001; Burken, 2003). De los resultados de estos estudios se concluye que a mayor hidrofobicidad del compuesto considerado, mayor tendencia al reparto desde la disolución acuosa hacia los tejidos de la raíz. De acuerdo con esta relación empírica, dicha tendencia sería, para los isómeros de HCH, en el siguiente orden:  $\gamma < \beta \approx \alpha < \delta$  (orden creciente de valores de  $\text{Log}K_{ow}$ ; Tabla 3.1), lo que no concuerda exactamente con los resultados obtenidos en este estudio. En este caso, al calcular un valor aproximado del FCR (a partir de los datos obtenidos en el estudio de la rizosfera; cociente entre HCH en raíces y  $\text{HCH}_{\text{H}_2\text{O}}$  en suelo; datos no mostrados), para el isómero  $\beta$  ha sido  $>1$ , mientras que en el caso del resto de isómeros ( $\alpha, \gamma$ , y  $\delta$ ), si bien se obtienen valores muy variables, generalmente inferiores a 1. Esto indica que los resultados obtenidos en los experimentos en condiciones de laboratorio (hidropónico) no pueden ser fácilmente extrapolados a las condiciones naturales. En este último caso, los coloides del suelo – principalmente los coloides orgánicos – pueden actuar como superficies de sorción y competir con la superficie de las raíces en el reparto del HCH. De hecho, recientemente se ha constatado una cinética de adsorción de varios de los isómeros de HCH en horizontes superficiales ricos en materia orgánica (Rodríguez Garrido, 2003).

Respecto a la acumulación en los tejidos aéreos de las plantas, se ha descrito un proceso de absorción-translocación hacia los tejidos vegetales aéreos en el caso de compuestos moderadamente hidrofóbicos como anilina, fenol, benceno, atrazina o tolueno (Schnoor y col., 1995; Burken y Schnoor, 1998; Davis y col., 2002). No obstante, en el caso del HCH, es un proceso muy improbable, dado que la hidrofobicidad de los isómeros de HCH es muy alta ( $\text{Log} K_{ow} > 3.5$ ). Por otro lado, en este estudio se ha encontrado una gran acumulación de HCH en los tejidos aéreos, generalmente mayor a la acumulación en la raíz ( $\text{HCH tallo} / \text{HCH raíz} > 1$ ). Esto indica que, muy probablemente, existe un reparto aire-planta, previa volatilización del HCH a partir de los residuos en el suelo, constituyendo un proceso de acumulación muy importante para los residuos de HCH encontrados en las diferentes especies vegetales. El mecanismo de acumulación foliar ha sido descrito con anterioridad para diversos compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles (Bacci y col., 1990; Paterson y col., 1991; Schreiber y Schönherr, 1992; Tolls y McLachlan, 1994; Simonich y Hites, 1995a,b). En este proceso, tanto la presión de vapor como el coeficiente de reparto octanol-aire ( $\text{Log}K_{oa}$ , Tabla 3.1) pueden actuar como indicadores del comportamiento particular de cada uno de los isómeros de HCH. En este sentido, dado la mayor presión de vapor del isómero  $\alpha$ -HCH, esto podría justificar la volatilización preferencial de este isómero y con ello una tendencia a la acumulación

preferencial en las hojas. Por otro lado, ya que el isómero  $\beta$ -HCH presenta una mayor afinidad que el  $\alpha$ -HCH por el octanol – indicativo asimismo de una mayor preferencia por la fase lipídica de las paredes celulares vegetales – explicaría la mayor acumulación de  $\beta$  en las plantas. No obstante, características tales como las diferencias interespecíficas entre las plantas utilizadas en este estudio (concentración de lípidos, área superficial de las hojas, morfología foliar, etc.) serían muy importantes en la distribución del HCH entre el aire y la superficie vegetal (Bakker, 2000; Barber y col., 2004).

### 3.4.3. El efecto rizosfera

Las dos plantas utilizadas en este estudio muestran una tendencia a la reducción del nivel de los cuatro isómeros de HCH en el suelo de la rizosfera (Figura 3.3; Figura 3.4). La disipación de los contaminantes en la rizosfera ha sido descrita para el caso de otros insecticidas (Hsu y Bartha, 1979), tricloroetileno (Walton y Anderson, 1990), compuestos policíclicos aromáticos (Reilly y col., 1996) e hidrocarburos (Chaîneau y col., 2000). Este proceso puede ser el resultado de uno o varios de los siguientes factores: (i) secuestro por reparto preferencial hacia los tejidos lipofílicos y/o absorción por las raíces, tal y como se ha descrito; (ii) exudación por las raíces de las plantas de enzimas (deshalogenasas, por ejemplo), capaces de catalizar la reacción de retirada de las moléculas de cloro de los compuestos organoclorados (Wolfe y Hoehamer, 2003); (iii) aumento de la degradación en relación con el efecto rizosfera (Miya y Firestone, 2001). Recientemente, Kidd y col., (2008), han encontrado evidencias de dechloración de los isómeros de HCH (especialmente  $\alpha$ -HCH) debido a un proceso de fitoestimulación de la microbiota de la rizosfera en suelos contaminados con HCH.

Por otro lado, las tendencias descritas en el cociente  $\text{HCH}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{HCH}_{\text{HA}}$  para los isómeros mayoritarios, refleja la influencia de las raíces en la distribución y biodisponibilidad de estos isómeros. En este sentido, es posible que la exudación de compuestos con características surfactantes a través de las raíces (Anderson y col., 1993; Alexander, 2000) se pueda asociar con este proceso. De hecho, Nisius (1988) ha detectado moléculas biosurfactantes como la saponina en *Avena sp.*

Por último, los compuestos orgánicos como los isómeros de HCH podrían verse afectados por otros procesos en los suelos, tales como la formación de residuos enlazados, actuando como una vía por la cual estos compuestos se incorporarían al humus durante el proceso de humificación, transformándose en formas que no extraíbles con las técnicas analíticas utilizadas en este estudio (Mordaunt y col., 2005; Boucard y col., 2005). De un modo muy parecido, los procesos de adsorción específica podrían ocurrir en la parte externa de los tejidos vegetales, a través de una transformación de tipo química del compuesto original que resultaría en una unión irreversible de los metabolitos en la superficie de los tejidos vegetales (Bhadra y col., 1999; Sandermann, 2004).

### 3.5. CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos, se puede concluir que las plantas que son capaces de crecer en zonas contaminadas con HCH acumulan esta sustancia (isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , fundamentalmente) en sus tejidos, por lo que se confirman como un sumidero de este tipo de compuestos. La importancia de la bioacumulación depende de la concentración inicial del contaminante en el suelo, de las propiedades físico-químicas de cada isómero (fundamentalmente la hidrofobicidad y la volatilidad) y del tipo de especie vegetal y del tejido que se considere. En general, son los tejidos aéreos (principalmente las hojas) los que acumulan las mayores concentraciones de todos los isómeros de HCH, con preferencia por la retención del isómero  $\beta$ -HCH. La incorporación de los tejidos vegetales contaminados en el suelo influye, entre otros procesos, en la acumulación preferente de  $\beta$ -HCH en el horizonte superficial de los suelos, en comparación con las cantidades presentes en el residuo original. Los resultados reflejan la importancia de las plantas en la redistribución de estos compuestos en el sistema suelo-planta, permitiendo una mejor comprensión de la distribución y reciclado de estos compuestos en los ecosistemas terrestres.

Además, el estudio del efecto rizosfera indica que la especie vegetal tiene influencia en la solubilidad acuosa de los distintos isómeros de HCH, aumentando ésta por lo general, y con ello afectando a la biodisponibilidad de estos compuestos. Un aumento de la biodisponibilidad del HCH podría explicar, las bajas concentraciones encontradas en la rizosfera con respecto al suelo del cepellón, aunque otros factores como una degradación mediada por los microorganismos, el lixiviado o bien la volatilización preferente podrían contribuir a dichas diferencias. Para discernir la importancia de los diversos procesos son necesarios estudios adicionales centrados en los mecanismos bióticos y abióticos que influyen en el descenso de la concentración de HCH en los suelos de la rizosfera.

Los resultados de este estudio sugieren que las plantas pueden ser utilizadas para la atenuación de la contaminación de los horizontes superficiales de los suelos afectados por la presencia de HCH. En este sentido, las plantas actuarían como un "filtro verde", reteniendo de un modo eficaz el contaminante previamente volatilizado hacia la atmósfera y favoreciendo así la disipación de la contaminación en la zona de raíces. El uso de plantas es un método eficaz y ecológico de descontaminar los suelos (fitocorrección), especialmente en lugares de clima húmedo y templado, dado que el mantenimiento y costes asociados con estas técnicas son muy bajos.

### Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Carmen Pérez Llaguno la inestimable ayuda en el Laboratorio y al personal del Departamento de Química Analítica, Universidade de A Coruña por el análisis de los isómeros de HCH en las muestras de vegetación. Este estudio ha sido financiado por la Xunta de Galicia (Consellería de Medio Ambiente) y por el Ministerio de Ciencia y Tecnología del Gobierno de España (Proyecto: REN2002-04507-C02-01).

**3. 6. BIBLIOGRAFÍA**

- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, 34: 4259-4265.
- Anderson, T. A., E. A. Guthrie y B. T. Walton. 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science and Technology*, 27: 2630-2636.
- Bacci, E., D. Calamari, C. Gaggi y M. Vighi. 1990. Bioconcentration of organic chemical vapors in plant leaves: experimental measurements and correlation. *Environmental Science and Technology*, 24: 885-889.
- Bakker, M. I. 2000. Atmospheric deposition of semivolatile organic compounds to plants. Tesis Doctoral. Universidad de Utrecht.
- Barber, J. L., G. O. Thomas, G. Kerstiens y K. C. Jones. 2004. Current issues and uncertainties in the measurement and modelling of air-vegetation exchange and within-plant processing of POPs. *Environmental Pollution*, 128: 99-138.
- Bhadra, R., D. G. Wayment, J. B. Hughes y J. V. Shanks. 1999. Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots. *Environmental Science and Technology*, 33: 446-452.
- Boucard, T. K., R. D. Bardgett, K. C. Jones y K. T. Semple. 2005. Influence of plants on the chemical extractability and biodegradability of 2,4-dichlorophenol in soil. *Environmental Pollution*, 133: 53-62.
- Briggs, G. G., R. H. Bromilow y A. A. Evans. 1982. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. *Pesticide Science*, 13: 495-504.
- Buckley, E. H. 1982. Accumulation of airborne polychlorinated biphenyls in foliage. *Science*, 216: 520-522.
- Burken, J. G. 2003. Uptake and metabolism of organic compounds. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L. (Eds.), *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants*. Wiley Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 59-84.
- Burken, J. G. y J. L. Schnoor. 1998. Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology*, 32: 3379-3385.
- Camps Arbostain, M., M. E. Barreal, C. Mourenza, E. Álvarez, P. Kidd y F. Macías. 2003. Rhizosphere chemistry in acid forest soils that differ in their degree of al-saturation of organic matter *Soil Science*, 168: 267-279.
- Chaîneau, C. H., J. L. Morel y J. Oudot. 2000. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize. *Journal of Environmental Quality*, 29: 569-578.
- Chung, J.-B. y R. J. Zasoski. 1994. Ammonium-potassium and ammonium-calcium exchange equilibria in bulk and rhizosphere soil. *Soil Science Society of America Journal*, 58: 1368-1375.
- Davis, L. C., S. Castro-Diaz, Q. Zhang y L. E. Erickson. 2002. Benefits of vegetation for soils with organic contaminants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 457-491.
- Dietz, A. C. y J. L. Schnoor. 2001. Advances in phytoremediation. *Environmental Health Perspectives*, 109: 163-168.
- Eptisa, 1999. Informe-resumen de los trabajos realizados con relación a la investigación de detalle de la contaminación por HCH en el entorno del polígono de Torneiros-O Porriño-(Pontevedra). Informe Técnico.
- Fabre, B., E. Roth y V. Heintz. 2005. Les isomeres de l'hexachlorocyclohexane. UHA-ADEME. Mulhouse, Francia.
- Horstmann, M. y M. S. Mclachlan. 1996. Evidence of a novel mechanism of semivolatile organic compound deposition in coniferous forests. *Environmental Science and Technology*, 30: 1794-1796.
- Hsu, T. S. y R. Bartha. 1979. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 37: 36-41.
- IUSS Working Group WRB. 2007. World Reference Base for Soil Resources 2006, actualización 2007. World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Roma.
- Kidd, P., A. Prieto-Fernández, C. Monterroso y M. Acea. 2008. Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil*, 302: 233-247.
- Li, Y. F. 1999. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *The Science of the Total Environment*, 232: 121-158.
- Li, Y. F. y R. W. Macdonald. 2005. Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the Arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: a review. *The Science of the Total Environment*, 342: 87-106.
- Manz, M., K. D. Wenzel, U. Dietze y G. Schuurmann. 2001. Persistent organic pollutants in agricultural soils of central Germany. *The Science of the Total Environment*, 277: 187-198.
- Marschner, H. 2003. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. London.
- Martínez Cortizas, A. y A. Pérez Alberti. 1999. Atlas climático de Galicia. Xunta de Galicia. Santiago de Compostela.
- Matolcsy, G., M. Nádasy y V. Andriská. 1988. *Pesticide Chemistry*. Elsevier. Amsterdam.
- Metcalf, R. L. 1955. Benzene Hexachloride. En: Metcalf, R. L. (Ed.), *Organic insecticides: their chemistry and mode of action*. Interscience Publishers. New York. Págs. 213-231.
- Miya, R. K. y M. K. Firestone. 2001. Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *Journal of Environmental Quality*, 30: 1911-1918.
- Mordaunt, C. J., B. Gevaio, K. C. Jones y K. T. Semple. 2005. Formation of non-extractable pesticide residues:

- observations on compound differences, measurement and regulatory issues. *Environmental Pollution*, 133: 25-34.
- Muir, D. C. G., M. D. Segstro, P. M. Welbourn, D. Toom, S. J. Eisenreich, C. R. Macdonald y D. M. Whelpdale. 1993. Patterns of accumulation of airborne organochlorine contaminants in lichens from the upper Great Lakes region of Ontario. *Environmental Science and Technology*, 27: 1201-1210.
- Nisius, A. 1988. The stromacentre in avena plastids: an aggregation of  $\beta$ -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta*, 173: 474-481.
- Paterson, S., D. Mackay, E. Bacci y D. Calamari. 1991. Correlation of the equilibrium and kinetics of leaf-air exchange of hydrophobic organic chemicals. *Environmental Science and Technology*, 25: 866-871.
- Pinton, R., Z. Varanini y P. Nannipieri. 2001. *The Rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface.* Marcel Dekker, Inc. New York.
- Pivetz, B.E., 2001. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites.* EPA/540/S-01/500. United States Environmental Protection Agency, Washington.
- Prager, J. C. 1995. *Environmental Contaminant Reference Databook. Volume 1.* Van Nostrand Reinhold. New York.
- Reilley, K. A., M. K. Banks y A. P. Schwab. 1996. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality*, 25: 212-219.
- Rodríguez Garrido, B. 2003. *Isómeros HCH: Retención en suelo y deshalogenación reductiva en medio abiótico.* Tesina. Universidad de Santiago de Compostela.
- Sandermann, H. J. 2004. Bound and unextractable pesticidal plant residues: chemical characterization and consumer exposure. *Pest Management Science*, 60: 613-623.
- Schnoor, J. L., L. A. Licht, S. C. McCutcheon, N. L. Wolfe y L. H. Carreira. 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology*, 29: 318A-323A.
- Schreiber, L. y J. Schönherr. 1992. Uptake of organic chemicals in conifer needles: surface adsorption and permeability of cuticles. *Environmental Science and Technology*, 26: 153-159.
- Simonich, S. L. y R. A. Hites. 1994. Importance of vegetation in removing polycyclic aromatic hydrocarbons from the atmosphere. *Nature*, 370: 49-51.
- Simonich, S. L. y R. A. Hites. 1995a. Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environmental Science and Technology*, 29: 2905-2914.
- Simonich, S. L. y R. A. Hites. 1995b. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science*, 269: 1851-1854.
- Suntio, L. R., W. Y. Shiu, D. Mackay, J. N. Seiber y D. Glotfelty. 1988. Critical review of Henry's law constants for pesticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 103: 1-59.
- Tolls, J. y M. S. Mclachlan. 1994. Partitioning of semivolatile organic compounds between air and *Lolium multiflorum* (wheat grass). *Environmental Science and Technology*, 28: 159-166.
- Turnbull, A. 1996. Chlorinated pesticides. *Issues in Environmental Science and Technology*, 113-135.
- USC. 2003. *Evaluación y bioremediación de suelos contaminados con isómeros de HCH en el Polígono de Torneiros, Porriño (Pontevedra).* Informe Final de Proyecto. Universidad de Santiago de Compostela.
- U. S. D. H. H. S. U. S. Department of Health and Human Services. 2005. *Toxicological profile for Alpha-, Beta-, Gamma-, and Delta-hexachlorocyclohexane.* Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia.
- Vijgen, J. 2005. Obsolete pesticides: How to solve a worldwide society problem? En: Lens, P., Grotenhuis, T., Malina, G. y Tabak, H. (Eds.), *Soil and sediments remediation.* IWA Publisher. London. Págs. 331-340.
- Walker, K., D. A. Vallero y R. G. Lewis. 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environmental Science and Technology*, 33: 4373-4378.
- Walton, B. T. y T. A. Anderson. 1990. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1012-1016.
- Wang, W., J. W. Gorsuch y J. S. Hughes. 1997. *Plants for environmental studies.* CRC Press LLC. Boca Raton.
- Weber, W. J. y Q. Huang. 2003. Inclusion of persistent organic pollutants in humification processes: direct chemical incorporation of phenanthrene via oxidative coupling. *Environmental Science and Technology*, 37: 4221-4227.
- Welsch-Pausch, K., M. S. Mclachlan and G. Umlauf. 1995. Determination of the principal pathways of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to *Lolium multiflorum* (Wheat grass). *Environmental Science and Technology*, 29: 1090-1098.
- Willett, K. L., E. M. Ulrich y R. A. Hites. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science and Technology*, 32: 2197-2207.
- Wolfe, N. L. y C. F. Hoehamer. 2003. Enzymes used by plants and microorganisms to detoxify organic compounds. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L. (Eds.), *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants* Wiley-Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 159-188.



## **CAPÍTULO 4**

### **Distribución de los isómeros de hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta-aire: estudio de campo**

Este trabajo ha sido presentado, parcialmente:

Calvelo Pereira, R., Monterroso, M. C. Camps-Arbestain, M. Macías, F. Accumulation of hexachlorocyclohexane isomers in vegetal tissues of *Cynara scolymus* and *Erica* sp.: a field study of processes. International Workshop "Fate and Impact of Persistent Pollutants in Agroecosystems". IUNG, Pulawy, POLONIA. 10-12 Marzo 2005. POSTER.

Calvelo Pereira, R., C. Monterroso, F. Macías, M. Camps-Arbestain. 2007. 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 (2007), doi:10.1016/j.envpol.2007.11.009.

	<i>pág.</i>
<b>RESUMEN</b>	<b>117</b>
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>118</b>
<b>4.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>119</b>
4.2.1. Área de estudio	119
4.2.2. Diseño experimental	120
4.2.3. Toma de muestras	121
4.2.4. Análisis de los isómeros de HCH	122
4.2.5. Tratamiento estadístico de los datos	123
<b>4.3. RESULTADOS</b>	<b>123</b>
4.3.1. HCH en el suelo contaminado circundante	123
4.3.2. HCH en el suelo rizodisponible	124
4.3.3. HCH en la vegetación	126
<b>4.4. DISCUSIÓN</b>	<b>130</b>
4.4.1. Distribución del HCH en suelos	130
4.4.2. Distribución de los isómeros de HCH en el sistema suelo-planta	130
<b>4.5. CONCLUSIONES</b>	<b>133</b>
<b>4.6 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>133</b>

## **RESUMEN**

En este trabajo se estudian las rutas principales de acumulación de los distintos isómeros de hexaclorociclohexano (HCH) (principalmente  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH) en un sistema aire-suelo-planta. Se ha diseñado un experimento en condiciones de campo con dos especies de plantas de características contrastadas (*Cynara scolymus* L. y *Erica* sp.) en condiciones de crecimiento: i) directamente en suelo contaminado con HCH y ii) en macetas rellenas de suelo no contaminado colocadas en el suelo contaminado por HCH. Al final del ensayo, las dos especies vegetales acumularon HCH en sus tejidos, mostrando una tendencia a mayores concentraciones en los tejidos aéreos con respecto a la raíz. En todos los casos el isómero  $\beta$ -HCH fue el compuesto que más se acumuló en ambas especies. Los mecanismos principales de acumulación de HCH fueron: adsorción en las raíces del HCH a partir del suelo contaminado (ruta suelo  $\rightarrow$  raíz), adsorción a través de la biomasa aérea a partir del aire circundante, tras un proceso de volatilización (ruta suelo  $\rightarrow$  aire  $\rightarrow$  tallo), y/o contacto de los tejidos aéreos con partículas de la atmósfera

contaminadas con HCH (ruta partículas del suelo → tallo). Los datos indican que el uso de plantas en zonas contaminadas por HCH puede reducir la transferencia de la contaminación a través de la atmósfera.

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos orgánicos de origen antrópico constituyen una gran preocupación ambiental para la sociedad actual. Los pesticidas organoclorados son compuestos volátiles y persistentes en el medio detectados con frecuencia en elevadas concentraciones en diferentes matrices como agua, aire, suelo, sedimentos y biota, incluida la vegetación (Willet y col., 1998; Tao y col., 2005). Éste es el caso del pesticida hexaclorociclohexano (HCH; fórmula molecular: 1-,2-,3-,4-,5-,6-hexaclorociclohexano) y sus isómeros mayoritarios ( $\alpha$ , que posee dos enantiómeros,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y  $\theta$ ). El HCH está disponible en dos formulaciones principales, como HCH técnico (mezcla comercial de los isómeros principales) y lindano (mezcla comercial purificada que se constituye casi exclusivamente – al menos al 99% - del isómero  $\gamma$ -HCH) (Vijgen, 2006). El HCH se obtiene de la cloración de benceno en presencia de luz ultravioleta, que resulta en una mezcla inicial de los principales isómeros que ya desde el inicio de su producción se ha utilizado como pesticida de amplio espectro. La actividad insecticida del HCH se debe exclusivamente a la presencia del isómero  $\gamma$ -HCH (Metcalf, 1955). Aún cuando los dos tipos de formulaciones se han utilizado desde los años 1940, hoy día su uso está o muy restringido o prohibido por la legislación internacional. No obstante, existen zonas de gran contaminación, en particular en áreas cercanas a los centros de producción de este tipo de compuestos. Antiguamente los residuos de la fabricación industrial se vertían sin control de ningún tipo en zonas circundantes a las fábricas (Hernández y col., 1991; Crespo González y col., 2001). Asimismo, es posible que la contaminación se origine por otras causas, destacando: (i) aplicación directa del HCH como insecticida en el tratamiento de suelos agrícolas (Harner y col., 1999); o (ii) deposición del HCH de modo disperso debido a un proceso de transporte a larga distancia de la contaminación (Wania y Mackay, 1995; van Pul y col., 1999).

Una vez que estos compuestos son introducidos en un ambiente determinado, tienden a redistribuirse entre los diferentes compartimentos (suelo, biota del suelo, agua, plantas, aire) mediante distintos procesos, tales como adsorción sobre las partículas del suelo, adsorción sobre los tejidos vegetales, volatilización, degradación microbiana, lavado, etc. Con el tiempo, la actuación simultánea de uno o varios de estos procesos conlleva una contaminación global del ecosistema en cuestión (aguas superficiales, suelos y fauna cercana, etc.) (Simonich y Hites, 1995a, Walker y col., 1999). Los isómeros de HCH manifiestan una gran capacidad para el reparto entre los distintos compartimentos del medio. Esto, en última instancia, favorece su bioacumulación a través de las redes tróficas (acuáticas o terrestres), lo que, en última instancia, representa una amenaza para el ser humano. Los isómeros de HCH que se encuentran con mayor frecuencia en las muestras ambientales son  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -HCH;  $\alpha$ -HCH es frecuente en los ambientes acuáticos y en la atmósfera, mientras que el isómero  $\beta$ , el más hidrofóbico y estable de todos los isómeros de HCH, se asocia a menudo con los suelos y los tejidos y fluidos animales (Walker y col., 1999).

En este sentido, es prioritario estudiar el comportamiento de estos compuestos en los distintos sistemas. Tradicionalmente, este tipo de estudios se enfocaban a investigar cada compartimento por separado (Simonich y Hites, 1995b) sin tener en cuenta las múltiples relaciones que se establecen entre los mismos. Sin embargo, es necesaria una visión de conjunto para una comprensión global del transporte,

transferencia y transformación de los contaminantes en el ambiente. Desde este punto de vista, la vegetación tiene un papel clave como un sumidero de contaminación (Muir y col., 1993). Además, constituye un punto de distribución de los contaminantes orgánicos entre los ecosistemas (naturales o no) (Simonich y Hites, 1994). Las plantas resisten elevadas cargas de contaminantes y al mismo tiempo pueden utilizarse para recuperar el suelo afectado (fitocorrección; Salt y col., 1998). Los estudios sobre la fitoacumulación de contaminantes orgánicos consideran dos rutas principales de entrada de los compuestos orgánicos en las plantas: (i) la vía suelo-planta y (ii) la vía aire-planta. Por un lado, a través de la **ruta suelo-planta** los compuestos orgánicos presentes en el suelo próximo a las raíces pueden (i) ser absorbidos por las plantas y transportados hacia los tejidos aéreos vía xilema, dependiendo de las características del compuesto (Burken y Schnoor, 1998; Burken, 2003) o bien (ii) ser adsorbidos sobre los tejidos de la raíz, a través de un reparto de agua: superficie de la raíz. Este último proceso cobra gran importancia en el caso de compuestos hidrofóbicos, para los que la absorción y translocación en el interior de las plantas es muy limitada, tal y como es el caso de los isómeros de HCH. Por otro lado, la **ruta aire-planta** es una vía de entrada de la contaminación en la biomasa aérea vegetal para los compuestos lipofílicos (Schreiber y Schönherr, 1992; Welsch-Pausch y col., 1995; Rüdell, 1997; Smith y Jones, 2000). Esta ruta implica dos mecanismos principales: (i) volatilización del contaminante a partir de la superficie del suelo y posterior adsorción foliar (deposición gaseosa); y (ii) reparto de HCH entre partículas suspendidas en la atmósfera contaminada con HCH y la superficie de las plantas (deposición particulada). De modo similar a lo que ocurre en la ruta suelo-planta, la acumulación de HCH en la parte aérea de las plantas depende de las propiedades fisicoquímicas del isómero que se considere, así como de las propiedades de la superficie vegetal (cutícula) (Schwarz y Jones, 1997).

El **objetivo** de este estudio es investigar el reparto y acumulación *in situ* de los isómeros de HCH (principalmente  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) en un sistema suelo-planta-aire en una zona contaminada, considerando las dos principales rutas de entrada de HCH en la vegetación (suelo  $\rightarrow$  planta; aire  $\rightarrow$  planta). Se ha pretendido realizar una valoración cualitativa de la importancia relativa de cada una de las rutas, así como profundizar en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en ellas. Esto facilitaría el uso de las plantas en la limpieza de suelos contaminados con los isómeros de HCH a través de procesos como la fitoextracción (extracción del contaminante del suelo mediante la acumulación en la biomasa aérea de las plantas) (Pilon-Smits, 2005). Para ello se ha diseñado una experiencia de campo, en una zona previamente utilizada como vertedero de residuos de HCH, plantando dos especies vegetales de características contrastadas, alcachofa (*Cynara scolymus* L.) y brezo (*Erica* sp.), en condiciones determinadas: (i) directamente en suelo contaminado por la presencia de elevadas concentraciones de HCH y (ii) en macetas rellenas con suelo no contaminado pero enterradas en el suelo contaminado con HCH.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Área de estudio

El presente estudio se ha llevado a cabo en una parcela de 3560 m<sup>2</sup> (Foto 4.1), contaminada con residuos procedentes de la producción de lindano, localizados en O Porriño, Pontevedra. La precipitación anual media y la temperatura media de la zona son, respectivamente, 1 504 mm y 14.4°C; la variación anual es considerable, si bien las mínimas precipitaciones y máximas temperaturas se dan durante los

meses de Julio-Septiembre (Martínez Cortizas y Pérez Alberti, 1999). Los suelos de la zona (Tecnosoles Urbicos y/o Regosoles Técnicos; IUSS Working Group, 2007) derivan de sedimentos aluvio-coluviales que presentan una textura heterogénea, con abundancia de fragmentos de tamaño grueso. El perfil tipo es ABC con horizontes bien diferenciados y de profundidad variable. La heterogeneidad de los suelos es muy grande porque el lugar ha sufrido distintos episodios de relleno de materiales y movimiento de tierras. El pH del horizonte superficial de estos suelos varía entre 5.0 y 6.2 (valor medio: 5.4), mientras que el contenido de carbono orgánico varía entre 1.1 y 7.1% (media: 3.7%); la relación C:N oscila entre 14 y 37 (media: 20). La capacidad de intercambio de cationes efectiva (CICE) es muy variable en estos suelos, con tendencia a valores muy bajos (media: 6.8  $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ). En Junio de 2001 el suelo de la zona de experimentación fue mezclado (hasta una profundidad de 30 cm), luego encalado y fertilizado. Un estudio previo en esta zona ha detectado niveles elevados de los diferentes isómeros de HCH en suelos (rango de  $\alpha+\beta+\gamma+\delta\text{-HCH}$ : 2 – 19 905  $\text{mg kg}^{-1}$ ) y en diferentes especies vegetales (rango de  $\alpha+\beta+\gamma+\delta\text{-HCH}$ : 1.6 – 62.5  $\text{mg kg}^{-1}$ ), con mayores concentraciones de HCH en las partes aéreas (Calvelo Pereira y col., 2006).

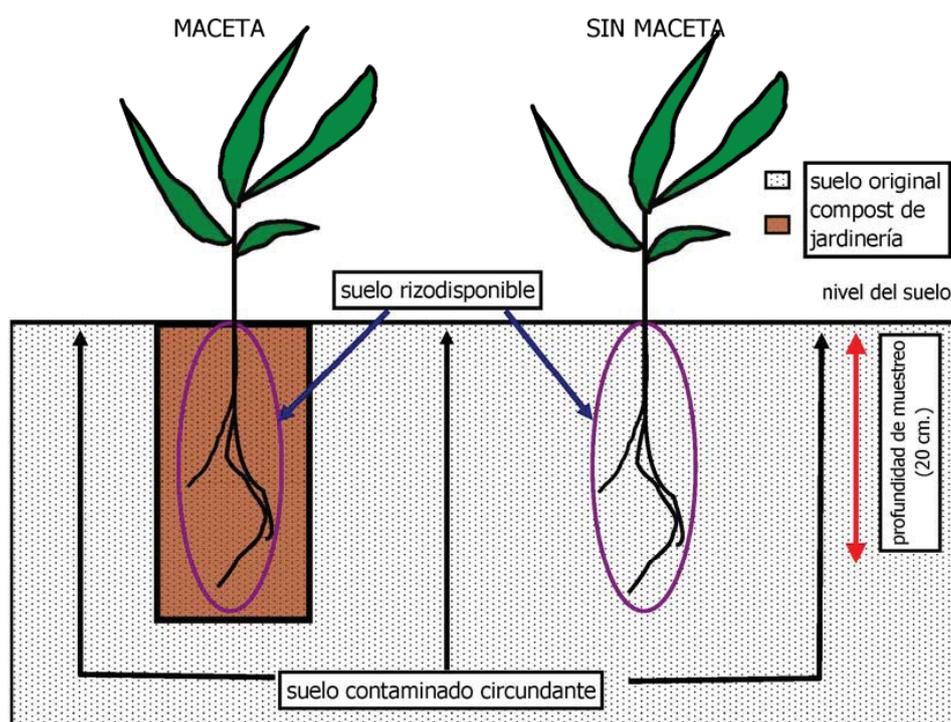


**Foto 4.1.** Aspecto de la parcela experimental tras el acondicionamiento.

### 4.2.2. Diseño experimental

Dos especies vegetales alóctonas (obtenidas en vivero) se escogieron para este estudio: (i) *Cynara scolymus* L. (alcachofa), una planta bianual – en ocasiones trianual – que tiene un bajo contenido en lignina en sus tejidos y proporciona una gran superficie para su exposición; y (ii) *Erica* sp. (brezo), un arbusto de lento crecimiento, con un tallo lignificado y hojas pequeñas y con ceras, lo que determina que esta planta presente una superficie de exposición limitada. La zona del experimento se dividió en 4 mallas de 4 x 3 metros. En cada malla se colocaron 12 plantas (seis de *Cynara scolymus* L. y seis de *Erica* sp.) al azar, con una distancia de 1 m entre cada planta (o submalla). La mitad de las plantas de cada especie se colocaron directamente en el suelo contaminado de la parcela (tratamiento sin maceta, referido como **"tratamiento SM"**), mientras que la otra mitad de las plantas se colocaron en macetas (material plástico, con drenaje facilitado) rellenas con un compost comercial libre de HCH utilizado en jardinería (tratamiento con maceta, referido como **"tratamiento M"**), que se introdujeron finalmente en el suelo contaminado en la misma malla (Figura 4.1; Foto 4.2). El compost presentaba las siguientes propiedades: pH, 6.4; contenido en carbono orgánico: >15%, N: 0.82%. Con este diseño, en teoría, todas las plantas

estaban expuestas al aire contaminado de la zona durante todo el estudio, pero sólo la mitad de ellas tenían un contacto directo con el suelo contaminado a través de las raíces (SM), mientras que este contacto estaba impedido por el confinamiento de las raíces en las macetas en la otra mitad de las plantas (M). Durante los meses de verano se aseguró un riego semanal para evitar problemas de sequía. La colocación de todas las plantas tuvo lugar en Junio de 2002; las plantas de *Cynara scolymus* L. fueron recogidas en Agosto de 2002 (evitando así daños derivados del calor), mientras que las plantas de *Erica* sp. fueron recogidas en octubre del mismo año.

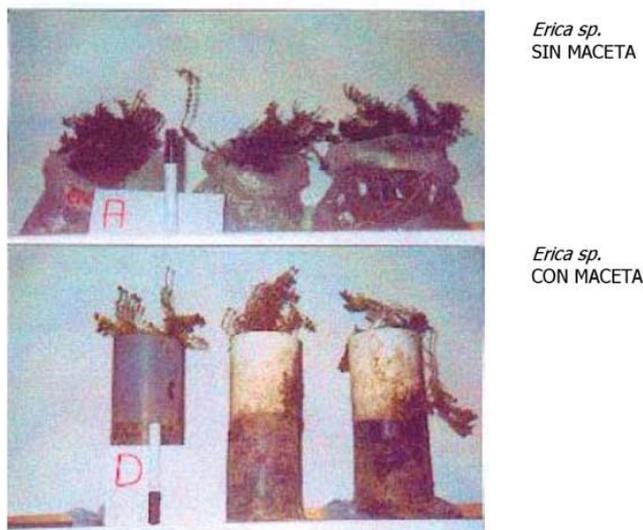


**Figura 4.1.** Descripción de los suelos considerados en este estudio.

#### 4.2.3. Toma de muestras

Antes de la colocación del ensayo, se tomaron muestras de suelo de todas las submallas que se corresponden con cada una de las plantas colocadas (muestras representativas de un área de 1 x 1 m), considerando que estos niveles de HCH constituyen la fuente potencial de HCH en el suelo capaz de contaminar la atmósfera que rodea a las plantas; el suelo así muestreado se considera como **suelo contaminado circundante/del entorno** a partir de este momento (Figura 4.1). Al final del período del experimento (44 días en el caso de *Cynara scolymus* L. y 135 días para *Erica* sp.), se recogieron todas las plantas, separando la biomasa aérea y la biomasa subterránea. Se muestreo también el suelo del cepellón de cada planta individual (considerado como **suelo rizodisponible** a partir de este momento; Figura 4.1). Todas las muestras de suelo se secaron al aire, se tamizaron (2 mm) y molieron (<50µm) para su posterior análisis. Las plantas se lavaron con agua para retirar partículas de suelo adheridas. Las raíces se separaron

cuidadosamente de la biomasa aérea. Ambos tipos de muestras vegetales se secaron al aire (minimizando de este modo la pérdida de HCH causada por volatilización) y molidas para su análisis posterior.



**Foto 4.2.** Tratamiento "sin maceta" (SM) y tratamiento "con maceta" (M). Plantas de *Erica* sp.

#### 4.2.4. Análisis de los isómeros de HCH

**Reactivos utilizados.**  $\alpha$ -HCH (98.7% de pureza) de Riedel-de-Haën AG;  $\beta$ -HCH (98.1% de pureza) de Riedel-de-Haën AG;  $\gamma$ -HCH (99% de pureza) de Sigma;  $\delta$ -HCH (98.6% de pureza) de Riedel-de-Haën AG; 2,4,5,6,-Tetracloro-*m*-xileno (TCMX) de Supelco (Bellefonte, PA, USA); Sulfato sódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (99% de pureza) de Panreac; Hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) (95% de pureza) de Fluka; Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ) (99.5% de pureza) de Fluka; Acetato de etilo ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) (99.8% de pureza) de Sigma; Cartuchos Sep Pak ® 20 cc (5 g) Florisil ®; Alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (neutra) de Sigma.

**Extracción de HCH en suelos.** La concentración de los isómeros de HCH soluble en hexano:acetona se midió en todas las muestras de suelo recogidas. 0.2 g de muestra seca y molida se extrajeron con 15 mL de una disolución de hexano:acetona (1:1, v/v) en un baño de ultrasonidos (30 minutos), se pasaron por filtros de fibra de vidrio, se enrasaron a 25 mL con hexano; el extracto se diluyó a niveles dentro del rango adecuado para la posterior determinación cromatográfica. Los extractos se conservaron en nevera a  $-4^\circ\text{C}$ .

**Extracción de HCH en matrices vegetales.** Se tomaron 0.3 g de muestra seca y molida de las distintas fracciones (biomasa aérea y raíces) y se extrajeron en 15 mL de disolvente orgánico (disolución de hexano:acetona 1:1, v/v) en horno microondas. Posteriormente se secaron con sulfato sódico anhidro, filtrándose el extracto. Se procedió posteriormente a pasos sucesivos de purificación en cartucho de Florisil

(5 g) y Alúmina (2 g), eluyendo con 35 mL de hexano:acetato de etilo (80:20). Se enrasó finalmente a 50 mL con hexano y se procedió a diluir los extractos dentro del rango lineal. Los extractos se conservaron en nevera a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Esta analítica fue realizada en el Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidade de A Coruña.

**Procedimiento de análisis cromatográfico.** Para realizar la identificación y cuantificación de los distintos isómeros de HCH se utilizó un equipo de cromatografía de gases con detector de captura electrónica (GC/ECD). El cromatógrafo de gases es un modelo GC 8532 Mega 2 series (Fisons Instruments, Milan, Italia) equipado con un detector de captura electrónica modelo ECD 850 (Thermo Quest, Milan, Italia). Se trabajó con un equipo de inyección automática (modelo AS 800, Fisons Instruments, Milan, Italia) de tipo split/splitless en modo splitless. El volumen de inyección utilizado fue de  $1\ \mu\text{L}$ . Para la separación de los distintos isómeros se usó una columna capilar Rtx®-ClPesticides (Restek Corporation, E.E.U.U. Bellefonte, PA) de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno, con una fase estacionaria adosada al capilar. La temperatura de inyección es de  $270^{\circ}\text{C}$  y la temperatura del detector, de  $300^{\circ}\text{C}$ . Como gas portador se usó helio (He), con una presión de 115 KPa, y como gas auxiliar del detector se usó nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), con una presión de 105 KPa. Se trabajó en condiciones de gradiente de temperatura, con un programa que partía de  $60^{\circ}\text{C}$  (3 min) con una rampa de temperatura de  $30^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$ , hasta  $180^{\circ}\text{C}$  (0 min), luego una segunda rampa de  $6^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$ , hasta  $230^{\circ}\text{C}$  (0 min), para finalizar con una rampa de  $30^{\circ}\text{C}\ \text{min}^{-1}$  hasta  $270^{\circ}\text{C}$  (4 min). Las curvas de calibración se obtuvieron por inyección de disoluciones patrón en hexano de la mezcla de los 4 isómeros, preparadas a partir de una disolución inicial de  $500\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$  en acetona, de concentraciones 5, 10, 25 y  $50\ \mu\text{L}^{-1}$ . El 2,4,5,6,-Tetracloro-m-xileno (TCMX) se utilizó como patrón interno en el análisis de muestras de vegetación.

#### 4.2.5. Tratamiento estadístico de los datos

Los datos fueron normalizados (transformación logarítmica,  $\text{Log}_{10}$ ) antes de la utilización de un test t de Student para evaluar las diferencias significativas en los resultados. Como los datos de concentración mostraron una gran dispersión se ha optado por utilizar el dato de mediana y no el de media.

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. HCH en el suelo contaminado circundante

La concentración de HCH total (suma de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH) en los suelos muestreados de cada uno de los 48 emplazamientos de las plantas en el área del experimento varía entre 14 y  $34\ 673\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  (Tabla 4.1; Figura 4.2). Los isómeros mayoritarios son  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH. La concentración del isómero  $\alpha$ -HCH oscila entre 4 y  $27\ 510\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  (media:  $3\ 354\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ), mientras que la del isómero  $\beta$  lo hace entre niveles de 5 y  $6\ 738\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  (media:  $987\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ). Por su parte, los isómeros minoritarios,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, se encuentran en un rango de concentraciones mucho más pequeño, entre 0.1 y  $740\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  para  $\gamma$ -HCH, y entre 0.1 y  $98\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  para  $\delta$ -HCH (valores medios, respectivamente, 40 y  $10\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ; Tabla 4.1).

En la mayoría de las muestras, el porcentaje del isómero  $\alpha$  con respecto al HCH total (calculado como  $\text{mg kg}^{-1} \alpha\text{-HCH} \times 100 / \text{mg kg}^{-1} \text{HCH total}$ ; del mismo modo se calcula para el resto de los isómeros) es mayor que el porcentaje del resto de isómeros (Figura 4.3). De hecho, la distribución en porcentaje de los isómeros de HCH del conjunto de las muestras del suelo contaminado circundante (valores medios:  $\alpha$ , 60%;  $\beta$ , 39%;  $\gamma$ , 1.2%;  $\delta$ , 0.4%) presenta un patrón similar al del residuo original que fue depositado en la zona (valores medios:  $\alpha$ , 77%;  $\beta$ , 16%;  $\gamma$ , 5%;  $\delta$ , 2%; Calvelo Pereira y col., 2006). No obstante, el porcentaje medio del isómero  $\alpha$ -HCH es inferior en el suelo contaminado del entorno con respecto al del residuo original, mientras que el porcentaje del isómero  $\beta$ -HCH aumenta.

**Tabla 4.1.** Concentración mínima, máxima, media y mediana ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) del HCH total (suma de  $\alpha+\beta+\gamma+\delta$ -HCH) y de los isómeros individuales en el suelo del entorno.

	n	mínimo	máximo	media	d. s. <sup>1</sup>	mediana
<b>HCH total</b>	48	13.8	34 672.8	4 391.7	8 452.9	358.1
$\alpha$	48	4.1	27 510.0	3 354.5	6 806.0	151.0
$\beta$	48	4.7	6 738.0	986.6	1 678.5	169.1
$\gamma$	48	0.1	740.0	40.4	117.0	2.3
$\delta$	48	0.1	97.8	10.2	19.1	1.7

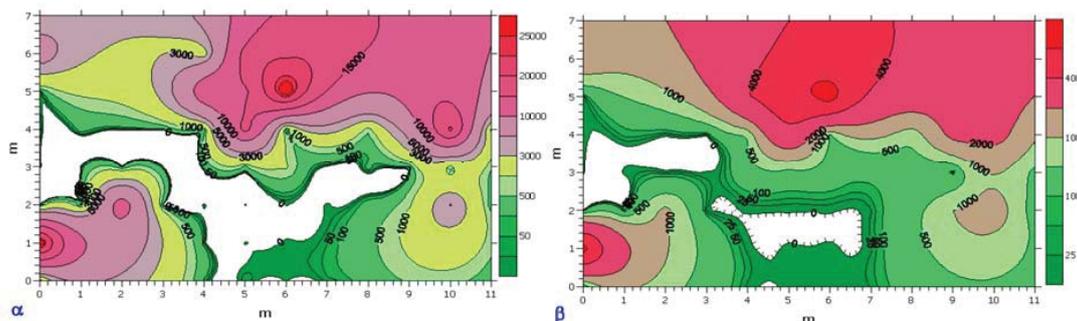
<sup>1</sup>d. s. desviación estándar

#### 4.3.2. HCH en el suelo rizodisponible

Al finalizar el experimento, la concentración de HCH total en el suelo rizodisponible de *Cynara scolymus* L. varía entre 2 y 10 411  $\text{mg kg}^{-1}$  (media: 1 808  $\text{mg kg}^{-1}$ ) en los lugares de tratamiento sin maceta (suelo rizodisponible SM); por su parte, en las zonas de tratamiento con maceta (suelo rizodisponible M), la concentración de HCH total oscila entre valores de 0.6 y 113  $\text{mg kg}^{-1}$  (media: 12  $\text{mg kg}^{-1}$ ) (Tabla 4.2). En todo caso, al final de experimento, la concentración de HCH cercana a las raíces de las plantas de *Cynara scolymus* L., tanto en el tratamiento SM como en el tratamiento M, es inferior al menos en un orden de magnitud a los niveles detectados en las muestras del suelo contaminado del entorno (Tabla 4.1). Hay que destacar el hecho de que los suelos rizodisponibles M (inicialmente macetas rellenas con un compost comercial de uso en jardinería) contienen HCH, si bien al principio del experimento eran suelos limpios. De todos modos, la concentración media del HCH total en los suelos rizodisponibles M es mas de 100 veces inferior que la concentración media correspondiente en el suelo contaminado del entorno (Tabla 4.1; Tabla 4.2).

Al comparar el suelo rizodisponible con el suelo contaminado del entorno, se observa un cambio en la distribución del porcentaje de los diferentes isómeros de HCH. El suelo rizodisponible SM tiene un porcentaje medio significativamente mayor de  $\beta$ -HCH que el correspondiente porcentaje en el suelo circundante (69% comparado con 27%;  $P < 0.05$ ). Por otro lado, el porcentaje medio de  $\alpha$ -HCH es significativamente inferior (28% frente a 72%;  $P < 0.05$ ) (Figura 4.3). Este patrón se puede observar, aunque no tan claramente, en el suelo rizodisponible M. El porcentaje medio del isómero  $\alpha$ -HCH en el suelo rizodisponible M es mayor que en el suelo rizodisponible SM (37 y 28%, respectivamente), mientras que el porcentaje medio de  $\beta$ -HCH es significativamente más bajo ( $P < 0.05$ ) en el suelo rizodisponible SM (50 frente a 69%, respectivamente). En relación con los isómeros minoritarios, cabe decir que el isómero

$\gamma$ -HCH presenta una distribución muy heterogénea, mientras que se aprecia un incremento del porcentaje del isómero  $\delta$ -HCH en todos los suelos al final de experimento; dicho aumento es mas evidente en los suelos rizodisponibles M (Figura 4.3).



**Figura 4.2.** Distribución espacial de la concentración de los isómeros mayoritarios ( $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH;  $\text{mg kg}^{-1}$ ) en el suelo contaminado del entorno.

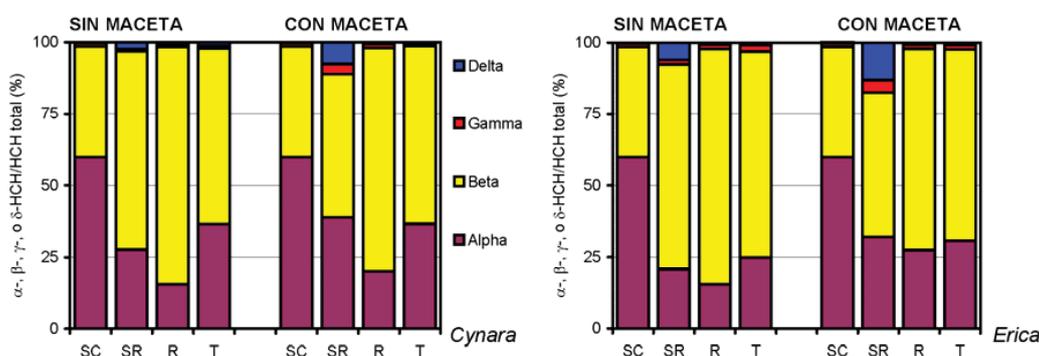
Al finalizar el experimento, la concentración de HCH total de los suelos rizodisponibles SM bajo las plantas de *Erica* sp. varía entre 3 y 3 379  $\text{mg kg}^{-1}$  (media: 798  $\text{mg kg}^{-1}$ ), mientras que en el caso de los suelos rizodisponibles M, este rango oscila entre 0.6 y 3 252  $\text{mg kg}^{-1}$  (media: 278  $\text{mg kg}^{-1}$ ) (Tabla 4.2). El nivel de contaminación en los suelos rizodisponibles (tanto M como SM) es al menos un orden de magnitud inferior al nivel de contaminación descrito para el suelo circundante. Además, tal y como sucedía en *Cynara*, los suelos rizodisponibles M presentan concentraciones apreciables de todos los isómeros de HCH, aún cuando en origen estaban libres de cualquier contaminación. En este caso, la contaminación observada al final del período experimental para *Erica* (135 días) es un orden de magnitud mayor que la contaminación observada al final del período experimental para *Cynara* (44 días) (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Concentración mínima, máxima, media y mediana ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) del HCH total (suma de  $\alpha+\beta+\gamma+\delta$ -HCH) y de los isómeros individuales en el suelo rizodisponible.

	SIN MACETA					MACETA					
	mínimo	máximo	media	d. s. <sup>1</sup>	mediana	mínimo	máximo	media	d. s.	mediana	
<i>Cynara</i>	<b>HCH total</b>	2.3	10 410.6	1 808.3	3 120.5	322.5	06	113.2	12.3	31.9	2.3
	$\alpha$	0.2	4 711.7	807.7	1 435.0	93.2	0.1	73.5	7.2	21.0	0.7
	$\beta$	2.0	5 137.1	929.2	1 533.9	226.4	0.2	37.2	4.7	10.4	0.9
	$\gamma$	<l. d. <sup>2</sup>	154.1	23.5	47.5	3.4	<l. d.	1.0	0.3	0.4	0.1
	$\delta$	0.1	407.7	51.8	120.4	2.1	0.1	1.6	0.3	0.5	0.2
<i>Erica</i>	<b>HCH total</b>	3.2	3 379.2	798.3	1190.5	19.4	0.6	3 252.3	278.1	936.7	3.8
	$\alpha$	0.2	1 604.0	346.2	592.3	2.1	0.2	2 676.8	224.4	772.3	0.8
	$\beta$	2.2	1 962.7	426.6	633.6	16.7	0.1	559.4	51.8	160.0	2.3
	$\gamma$	0.1	52.3	9.9	16.8	0.1	0.1	13.9	1.8	4.6	0.3
	$\delta$	0.2	80.4	15.5	24.8	1.3	<l. d.	2.2	0.6	0.6	0.5

n=12; <sup>1</sup> d. s. desviación estándar; <sup>2</sup> < l. d. inferior al límite de detección (0.1  $\text{mg kg}^{-1}$ ).

De nuevo, la comparación de la distribución en porcentaje de los diferentes isómeros de HCH en el suelo rizodisponible con respecto a dicha distribución en el suelo circundante muestra diferencias. El porcentaje medio de  $\beta$ -HCH aumenta (39% en suelo circundante frente a 72% en suelo SM); por su parte, el porcentaje medio del isómero  $\alpha$ -HCH es inferior en el suelo SM (21%) frente al suelo circundante (59%) (Figura 4.3). Las variaciones en el suelo rizodisponible M son menos evidentes, pero la tendencia es similar. Por otro lado, el porcentaje medio de  $\beta$ -HCH en el suelo rizodisponible SM es significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que el correspondiente porcentaje en el suelo rizodisponible M (72% frente a 50%, respectivamente). Por su parte, el porcentaje medio del isómero  $\alpha$ -HCH en el suelo rizodisponible SM es inferior al correspondiente porcentaje en el suelo rizodisponible M (21% frente a 32%, respectivamente) (Figura 4.3). Finalmente, el porcentaje de los isómeros minoritarios era muy heterogéneo, pero similar a lo descrito en el caso de *Cynara* (Tabla 4.2).



**Figura 4.3.** Distribución de los isómeros de HCH en los suelos y plantas para cada especie vegetal y tratamiento considerados en este estudio. Valores medios para  $n=12$ . SC=suelo circundante; SR=Suelo rizodisponible; R=tejido radicular; T=tejidos aéreos.

### 4.3.3. HCH en la vegetación

#### Raíces

La concentración de HCH total en los tejidos de la raíz de las plantas de *Cynara scolymus* L. oscila entre 8 y 25  $\text{mg kg}^{-1}$  (media: 16  $\text{mg kg}^{-1}$ ), en las plantas SM y entre 2 y 8  $\text{mg kg}^{-1}$  (media: 4  $\text{mg kg}^{-1}$ ) en las plantas M, siendo las diferencias entre los dos tratamientos significativas ( $P < 0.05$ ) (Tabla 4.3). El isómero  $\beta$  es el isómero dominante en la mayoría de las muestras de raíz; representando entre un 78 y un 83% del HCH total en valores medios para plantas SM y M, respectivamente. Por otro lado, el porcentaje del isómero  $\alpha$ -HCH se encuentra siempre por debajo del 30% (Figura 4.3).

La concentración de HCH total en las raíces de las plantas de *Erica* sp. varía entre unos niveles muy amplios; el rango de concentraciones encontrado oscila entre 11 y 338  $\text{mg kg}^{-1}$  (media: 89  $\text{mg kg}^{-1}$ ) en las plantas SM y entre 4 y 86  $\text{mg kg}^{-1}$  (media: 23  $\text{mg kg}^{-1}$ ) en las plantas M (diferencia significativa entre

### Distribución de hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta-aire

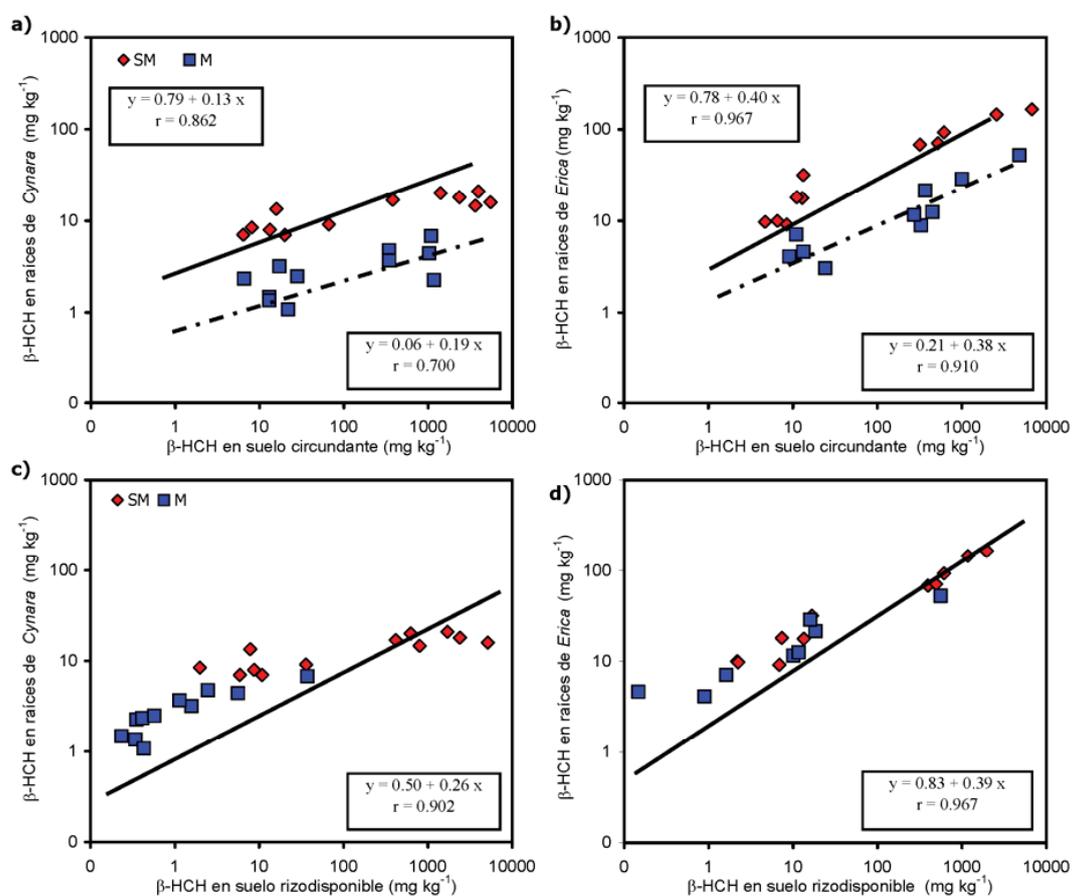
ambas medias;  $P < 0.05$ ; Tabla 4.3). De nuevo destaca la elevada contribución del isómero  $\beta$ -HCH al HCH total en los tejidos radicales, resultando en un porcentaje medio superior 70% en ambos tratamientos.

**Tabla 4.3.** Concentración mínima, máxima, media y mediana ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) del HCH total (suma de  $\alpha + \beta + \gamma + \delta$ -HCH) y de los isómeros individuales en las muestras de vegetación al final del experimento.

<i>Cynara</i>		SIN		MACETA			MACETA				
		mínimo	máximo	Media	d. s. <sup>1</sup>	mediana	mínimo	máximo	media	d. s.	mediana
Raíces	HCH total	8.4	24.5	16.1	6.4	16.5	1.6	8.0	3.9	1.9	3.7
	$\alpha$	1.3	5.7	2.5	1.5	1.9	0.3	1.1	0.7	0.3	0.8
	$\beta$	7.0	20.9	13.3	5.2	14.1	1.1	6.8	3.1	1.7	2.5
	$\gamma$	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	<l.d. <sup>2</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1
	$\delta$	0.1	0.4	0.2	0.1	0.2	<l.d.	0.1	0.1	0.1	0.1
Biomasa aérea	HCH total	11.0	116.7	64.3	44.9	54.3	10.2	199.1	68.5	72.3	17.6
	$\alpha$	4.8	45.1	22.4	15.1	20.0	3.3	78.6	25.0	27.9	6.9
	$\beta$	5.8	83.1	40.3	29.4	33.3	4.6	117.8	42.6	43.9	11.6
	$\gamma$	0.1	1.5	0.8	0.6	0.7	0.1	1.5	0.5	0.6	0.2
	$\delta$	0.1	2.7	0.9	0.9	0.4	0.1	1.4	0.4	0.5	0.1
<i>Erica</i>											
Raíces	HCH total	11.1	338.0	88.7	111.7	33.7	4.3	86.0	22.6	24.2	15.3
	$\alpha$	1.0	182.0	28.1	57.9	1.8	1.0	31.5	6.6	9.1	4.4
	$\beta$	9.1	165.0	58.0	56.1	31.7	3.0	52.4	15.5	15.3	10.2
	$\gamma$	0.1	4.8	1.5	1.7	0.7	<l.d.	1.6	0.4	0.5	0.3
	$\delta$	<d.l.	6.2	1.1	2.0	0.2	<l.d.	0.5	0.2	0.1	0.1
Biomasa aérea	HCH total	10.9	503.4	150.9	157.2	82.8	3.1	386.9	70.8	109.9	34.9
	$\alpha$	2.9	104.0	31.4	33.3	21.6	1.7	106.0	20.1	30.7	8.4
	$\beta$	7.8	463.0	114.3	136.3	63.4	1.4	272.0	49.0	76.9	28.2
	$\gamma$	0.2	17.7	3.8	5.0	2.2	0.1	5.0	1.0	1.4	0.5
	$\delta$	0.1	4.3	1.3	1.5	0.8	<l.d.	4.0	0.7	1.1	0.3

<sup>1</sup> d. s., desviación estándar; <sup>2</sup> < l. d. inferior al límite de detección (0.1  $\text{mg kg}^{-1}$ ).

La Figura 4.4 muestra la relación entre la concentración de  $\beta$ -HCH en la raíz frente a la concentración de  $\beta$ -HCH en el suelo. Al representar la concentración en el suelo circundante frente a la concentración en la raíz, se muestran dos grupos de muestras diferenciados (SM y M) en cada una de las especies estudiadas, cada grupo con su correlación particular ( $r > 0.700$ ; Figura 4.4a,b). No obstante, al representar la concentración de  $\beta$ -HCH en raíces frente a la concentración de  $\beta$ -HCH en el suelo rizodisponible al final del experimento, esta distinción desaparece, ajustándose todas las muestras de una misma especie a una única recta de regresión, independientemente del tratamiento ( $r > 0.900$ ; Figura 4.4c,d). Los valores de la pendiente del ajuste de estas rectas son diferentes para las distintas especies e isómeros. Así la pendientes e 0.26 y 0.39 para  $\beta$ -HCH y 0.17 y 0.39 para  $\alpha$ -HCH. La pendiente se interpreta como un factor de bioconcentración en raíces ( $FBC_{raíces}$ ) (Tabla 4.4). Además, los valores de corte con el eje Y se pueden interpretar como un valor de **fondo** o concentración de HCH en la biomasa subterránea cuando la concentración de HCH en el suelo rizodisponible es cero; rango entre 1 y 7  $\text{mg kg}^{-1}$ .



**Figura 4.4.** Concentración de  $\beta$ -HCH (mg kg<sup>-1</sup>) en los suelos y raíces de las especies vegetales empleadas en este estudio. Las concentraciones están representadas en escala logarítmica (Log<sub>10</sub>). n=12.

**Tabla 4.4.** Factores de Biocentración (FBC) de los isómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH en los tejidos vegetales. Valores del fondo en mg kg<sup>-1</sup>.

FBC <sub>raíces</sub>	calculado	observado	Fondo	r	n	planta
$\alpha$	0.19	0.17	1	0.740	23	<i>Cynara</i>
$\beta$	0.18	0.26	3	0.902		
$\alpha$	0.19	0.39	2	0.847	21	<i>Erica</i>
$\beta$	0.18	0.39	7	0.967		

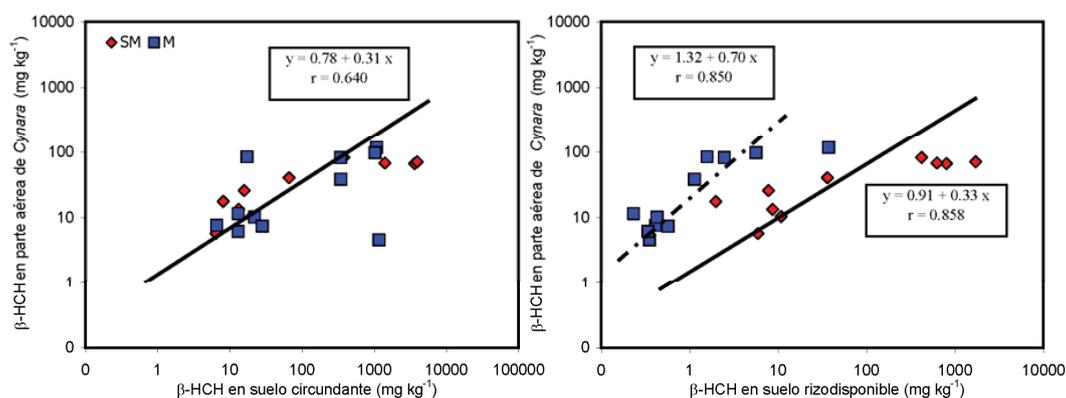
FBC <sub>tallos</sub>	calculado	observado	Fondo	r	n	planta
$\alpha$	0.25	0.24	4	0.539	21	<i>Cynara</i>
$\beta$	0.25	0.31	6	0.640		
$\alpha$	0.25	0.35	2	0.775	22	<i>Erica</i>
$\beta$	0.25	0.35	7	0.596		

### Biomasa aérea

La concentración de HCH total en la biomasa aérea (tallos+hojas) de las plantas de *Cynara* varía entre valores de 11 y 117 mg kg<sup>-1</sup> en las plantas SM y entre 10 y 199 mg kg<sup>-1</sup> en las plantas M (Tabla 4.3).

La diferencia entre los valores de concentración medios (plantas SM, media 64 mg kg<sup>-1</sup>; plantas M, media 69 mg kg<sup>-1</sup>) no es significativa (P<0.05). La concentración media de β-HCH en estos tejidos (40.3 mg kg<sup>-1</sup> en SM y 43 mg kg<sup>-1</sup> en M) es significativamente mayor que la concentración de α-HCH (22 mg kg<sup>-1</sup> en SM y 25 mg kg<sup>-1</sup> en M) (P<0.05; tratamiento SM), si bien la diferencia entre tratamientos no lo es. El isómero β-HCH representa el 61% del HCH total en las plantas SM, mientras que el isómero α-HCH tan solo contribuye al 37% del HCH total (Figura 4.3). Los tejidos aéreos de *Cynara scolymus* L. presentan una gran contaminación, si bien las concentraciones descritas son al menos dos órdenes de magnitud inferiores a las descritas para el suelo circundante (Tabla 4.1; Tabla 4.3).

En el caso de las plantas de *Erica* sp., la concentración de HCH total en los tejidos aéreos oscila en un rango amplio (11 - 503 mg kg<sup>-1</sup>, plantas SM; 3 - 387 mg kg<sup>-1</sup>, plantas M; Tabla 4.3), si bien no existen diferencias significativas entre los valores medios de ambos tipos de muestras (P<0.05). Los isómeros principales en los tejidos aéreos de *Erica* sp. son α- y β-HCH, que constituyen el 95% del HCH total (α-HCH, 25%, β-HCH, 72%; Figura 4.3). La concentración media de β-HCH (114 mg kg<sup>-1</sup>) era mayor que la concentración media de α-HCH (31 mg kg<sup>-1</sup>) (valores medios para las plantas SM; diferencia significativa a P<0.05).



**Figura 4.5.** Concentración de β-HCH (mg kg<sup>-1</sup>) en los suelos y tallos de *Cynara*. Las concentraciones están expresadas en escala logarítmica (Log<sub>10</sub>). n=12.

Al representar la concentración de β-HCH en el suelo rizodisponible frente a la concentración de este isómero en la biomasa aérea, se aprecia la separación en dos grupos de muestra (SM y M), cada grupo con un ajuste a una recta de regresión particular (Figura 4.5; similar para el resto de isómeros, así como para *Erica*). Al representar el suelo circundante, el ajuste es a un solo grupo de muestras; la pendiente de la recta de regresión puede interpretarse como un factor de bioconcentración en tallos (FBC<sub>tallos</sub>) basado en la concentración en el suelo circundante (Tabla 4.4). Los valores de las pendientes del ajuste de las curvas oscilan entre 0.31 y 0.35 para β-HCH y entre 0.24 y 0.35 en el caso de α-HCH. Además, los valores de corte con el eje Y se pueden interpretar como un valor de **fondo** o concentración mínima de HCH en la biomasa aérea cuando la concentración de HCH en el suelo circundante es cero; rango, entre 2 y 7 mg kg<sup>-1</sup>; Tabla 4.4).

#### 4.4. DISCUSIÓN

##### 4.4.1. Distribución del HCH en suelos

Todos los suelos analizados en este experimento presentan elevados niveles de contaminación debido a la presencia de los isómeros de HCH, de distribución variable y heterogénea. La concentración del HCH total en los suelos rizodisponibles al final del experimento es inferior que la concentración en los suelos circundantes. Esto se atribuye a un "efecto de dilución" causado por el suelo no contaminado adherido a las raíces de las plantas en el momento del transplante a la zona de experimentación. Por otro lado, el suelo rizodisponible M también presenta contaminación por HCH al finalizar el experimento, a pesar del hecho de que estos suelos estaban limpios al principio del ensayo (ya que las macetas se rellenaron originalmente de un compost comercial de uso en jardinería). Esto puede atribuirse a diversos procesos: (i) movilización de los restos particulados de residuos de HCH o bien suelo contaminado con HCH, transportados por el viento o por el flujo de agua en superficie hacia las macetas, introduciéndose así en el suelo no contaminado; (ii) volatilización de HCH a partir de las zonas de gran contaminación y posterior deposición sobre los suelos limpios; (iii) lavado del HCH acumulado en la superficie de las plantas (hojas, tallo), previamente movilizado a través de una ruta aire → planta. La contaminación de HCH en los suelos rizodisponibles M, en todo caso, es muy heterogénea y tiende a incrementarse con el tiempo, tal y como se aprecia al comparar los suelos rizodisponibles de *Cynara* y *Erica* (44 y 136 días, duración del experimento, respectivamente).

El isómero  $\alpha$ -HCH es el isómero dominante en el suelo circundante, mientras que el isómero  $\beta$ -HCH es el isómero que predomina claramente en las muestras de suelo rizodisponible. Asimismo, la presencia del isómero  $\delta$ -HCH es destacable en el suelo rizodisponible con respecto al suelo circundante. Hay un cambio en el predominio de isómeros de menor hidrofobicidad ( $\alpha$ -HCH) a isómeros más hidrofóbicos ( $\delta$ -HCH) (Tabla 4.5), que puede ser debido a la presencia de más materia orgánica en el entorno de las raíces en el momento de la recogida de las muestras. Este incremento de materia orgánica en los suelos rizodisponibles SM puede atribuirse a: (i) efecto de la raíz; y (ii) la presencia de sustrato rico en materia orgánica todavía pegado a los tejidos radiculares de las plantas provenientes del vivero. El mayor contenido de la materia orgánica podría resultar en una retención preferente de isómeros de HCH, tales como  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH (Figura 4.3; Tabla 4.5). Otros estudios han encontrado también la tendencia a la concentración de estos compuestos en los horizontes superficiales de los suelos debido a la presencia de arcillas (Miglioranza y col., 1999).

##### 4.4.2. Distribución de los isómeros de HCH en el sistema suelo-planta

###### Acumulación de HCH en las raíces

Generalmente hay una clara asociación entre los contenidos de HCH en el suelo rizodisponible y el contenido de los diferentes isómeros (especialmente  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH) en las raíces (Tabla 4.4). Esto indica que la concentración en el suelo cercano a las raíces tiene un efecto directo sobre la retención de los isómeros de HCH, sobre todo en el caso de  $\beta$ -HCH. Asimismo, el reparto de este isómero entre el suelo rizodisponible y el tejido radicular es relativamente constante (regresión log-lineal) tanto para las planta de

## Distribución de hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta-aire

*Cynara* como para las de *Erica* (Figura 4.4; Tabla 4.4). Las pendientes distintas de las líneas de ajuste ( $FBC_{raíces}$  observado) puede ser un indicio de una afinidad diferente en la acumulación de HCH entre las dos especies o bien puede estar reflejando el tiempo de exposición diferente para cada especie vegetal. Esto se aprecia de un modo especial en *Erica* sp. ( $t=135$  días), cuyos valores de FCB observado tienden a igualarse. En todo caso, los valores observados son mayores que los factores de bioconcentración que pueden calcularse a partir de los datos fisicoquímicos de los isómeros de HCH a partir del método, muy utilizado, de Trapp (2002) ( $FBC_{raíces}$ ; Tabla 4.5); esto indica que los isómeros de HCH tienen una afinidad por los tejidos de las raíces mayor de lo que se asumía en otros estudios.

**Tabla 4.5.** Selección de las principales propiedades físico-químicas y parámetros derivados de los isómeros de HCH ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ).

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	Referencia
Presión de Vapor (Pa, 20°C)	$5.3 \cdot 10^{-3}$	$4.3 \cdot 10^{-5}$	$2.9 \cdot 10^{-3}$	$2.3 \cdot 10^{-3}$	Manz y col., 2001.
Solubilidad en agua (mg l <sup>-1</sup> )	10	5	7.3	10	Prager, 1995
Constante de la ley de Henry (H, Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	1.6	0.32	6.2	9.0	Manz y col., 2001.
Log $K_{ow}$ <sup>1</sup>	0.87	0.12	0.13	0.073	Suntio y col., 1988.
Log $K_{oc}$ <sup>2</sup>	3-3.57	3.57	3.57	3.8	US Department of Health and Human Services, (2005)
Log $K_{oa}$ <sup>3</sup>	7.25	8.09	7.88-7.99	8.66	
FCR <sup>4</sup>	26.1	25.2	18.9-22.8	47.1	
FCCT-Cynara <sup>5</sup>	0.15	0.15	0.16-0.20	0.08	
FCCT-Erica	0.39	0.40	0.42-0.48	0.27	
$FBC_{Raíces}$ <sup>6</sup>	0.19	0.18	0.14	0.20	
$FBC_{Tallos}$ <sup>7</sup>	0.25	0.25	0.27-0.32	0.16	

<sup>1</sup> coeficientes de reparto octanol-agua; <sup>2</sup> coeficiente de reparto octanol-carbono orgánico; <sup>3</sup> coeficiente de reparto octanol-aire, calculado a partir de Suntio y col., (1988), Bacci y col., (1990) y Paterson y col., (1991); <sup>4</sup> Factor de Concentración Radicular, calculado según la ecuación de Briggs y col., (1982); <sup>5</sup> Factor de Concentración de la Corriente de transpiración. FCCT-Cynara, calculado según la ecuación de Briggs y col., (1982); FCCT-Erica, calculado según la ecuación de Burken y Schnoor, (1998); <sup>6</sup> Factor de BioConcentración en raíces, cálculo basado en Trapp, (2002); <sup>7</sup> Factor de BioConcentración en tallos, cálculo basado en Travis y Arms (1988).

Los contaminantes orgánicos se acumulan en las raíces vegetales como resultado de diversos procesos, principalmente: (i) absorción y translocación (Briggs y col., 1982; Burken y Schnoor, 1998), para aquellos compuestos que tienen una baja hidrofobicidad (valores de  $\text{Log}K_{ow}$  entre 0.5 y 3; Schnoor y col., 1995); y (ii) adsorción sobre los tejidos radiculares (reparto agua:superficie raíz) (Dietz y Schnoor, 2001). Dado que los isómeros de HCH presentan elevados valores del  $\text{Log}K_{ow}$  ( $>3.5$ ; Tabla 4.5), el proceso (i) es muy poco probable para estos compuestos. El isómero  $\beta$ -HCH (y de modo parecido el isómero  $\delta$ -HCH) se acumula de modo preferencial en las raíces, y la adsorción sobre la superficie de las raíces (reparto hidrofóbico) es una vía de entrada en la vegetación muy importante para este compuesto. La adsorción ocurre a través de un reparto preferencial del contaminante hacia las superficies hidrofóbicas (compuestos lipídicos de las paredes celulares) (Pivetz, 2001). Este reparto se ve afectado por la cantidad de superficie hidrofóbica disponible y por la fracción de lípidos presente en los tejidos. El llamado Factor de Concentración Radicular (FCR: cociente entre la cantidad del contaminante adsorbido sobre la raíz y la concentración del contaminante en una disolución hidropónica; Tabla 4.5) es un concepto empírico que se puede relacionar con el coeficiente de reparto octanol-agua ( $\text{Log}K_{ow}$ ). En base a los valores de  $\text{Log}K_{ow}$ , para

los diferentes isómeros de HCH y el FCR calculado a partir de dicho valores (basado el método de Briggs y col., 1982; Tabla 4.5), el orden creciente de adsorción sobre la superficie de las raíces sería el siguiente:  $\gamma < \beta \approx \alpha < \delta$ . En este estudio, el reparto preferente sobre las raíces ha sido  $\beta > \alpha$ , para los isómeros principales, confirmado por los  $FBC_{raíces}$  observados (Tabla 4.4). Esta diferencia puede ser explicada por el hecho de que los estudios hidropónicos no reflejan las condiciones complejas de los suelos en condiciones naturales, como sería el caso del presente trabajo. Asimismo, otros compuestos de los suelos como arcillas y materia orgánica pueden ejercer una gran competencia con la superficie hidrofóbica de las raíces en la retención de compuestos orgánicos (Riederer, 2005).

#### Acumulación de HCH en la biomasa aérea

En general, se acumula más HCH en los tejidos aéreos de las dos plantas estudiadas que en las raíces. Asimismo, de modo similar a lo visto en las raíces, se observa una clara relación entre la concentración de  $\beta$ -HCH (escala logarítmica) en los suelos y la correspondiente en los tejidos aéreos (Figura 4.5). De hecho, es el suelo circundante el que se relaciona con la acumulación de los isómeros de HCH en las partes aéreas. Las pendientes de las rectas de ajuste para cada una de las especies vegetales ( $FBC_{tallos}$ ; Tabla 4.4) se pueden relacionar con un  $FBC_{tallos}$  calculado a partir de las propiedades físico-químicas (método de Travis y Arms, 1988; Tabla 4.5), revelando las diferencias entre los distintos isómeros de HCH y entre las especies vegetales utilizadas. El valor de fondo calculado, por otro lado, incide en la importancia de la concentración del HCH en el suelo circundante como origen de la contaminación en la parte aérea de las plantas (Tabla 4.5). En conjunto, estos datos indican que la ruta suelo  $\rightarrow$  aire  $\rightarrow$  planta es de gran importancia para explicar los elevados niveles de HCH detectados en la biomasa aérea. La fuente principal de contaminación es el suelo circundante, lo que destaca la importancia que se debe atribuir al ambiente cercano que rodea a toda la planta en crecimiento. Esta ruta de contaminación puede incluir tanto una deposición a partir de la fase gaseosa como una deposición asociada a partículas (Welsch-Pausch y col., 1995; McLachlan, 1999; Smith y Jones, 2000).

La ruta de adsorción aire  $\rightarrow$  planta ha sido reconocida y estudiada para los isómeros de HCH y otros compuestos orgánicos desde el principio de la década de 1980 (Buckley, 1982; Bacci y col., 1990; Trapp y Matthies, 1995; Trapp y Mathies, 1997; Bakker, 2000). El coeficiente de reparto octanol-aire ( $\text{Log}K_{oa}$ ; se calcula a partir de las propiedades físico-químicas de los isómeros de HCH; Tabla 4.5) es considerado como una herramienta básica en la evaluación del comportamiento de los compuestos orgánicos en los dos medios. De acuerdo con los valores conocidos de  $\text{Log}K_{oa}$  para los distintos isómeros de HCH, la afinidad por los compuestos lipídicos (superficie vegetal) seguiría el siguiente orden:  $\delta > \beta > \gamma > \alpha$ . Este orden es consistente con el hecho de la preponderancia que el isómero  $\beta$ -HCH muestra en los tejidos aéreos (Figura 4.2). La tendencia se confirma al comparar los valores del  $FBC_{tallos}$  de los isómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH en cada una de las especies vegetales (Tabla 4.4). No obstante, hay que considerar que con un único parámetro como el  $\text{Log}K_{oa}$  no es posible explicar completamente el complejo proceso de retención de HCH sobre las superficies de las hojas y tallo. De acuerdo con trabajos previos, la adsorción tendría lugar entre la superficie de la cutícula vegetal o bien en los estomas (en este caso sería absorción), si bien el papel que desempeñan los estomas es muy debatido (Barber y col., 2002).

#### 4.5. CONCLUSIONES

Las dos especies de plantas utilizadas (*Cynara scolymus* L. y *Erica* sp.) han sido capaces de acumular todos los isómeros de HCH, especialmente en la biomasa aérea ( $HCH_{\text{tallos}}/HCH_{\text{raíz}} > 1$ ). Los datos obtenidos en este estudio indican que el mecanismo de acumulación del HCH en los tejidos vegetales es un proceso isómero-selectivo, favoreciendo la acumulación de  $\beta$ -HCH. El reparto hidrofóbico de este isómero es relativamente más importante en las raíces que en la parte aérea. La volatilización del HCH a partir de un suelo con gran contaminación y la posterior deposición del compuesto sobre la biomasa aérea de las plantas es probablemente el principal mecanismo que explica la presencia y comportamiento de los isómeros de HCH (especialmente,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -HCH) en tallos y hojas. No obstante, la ruta partícula  $\rightarrow$  planta no puede ser descartada. En todo caso, ambas rutas son independientes de la vía de acumulación suelo  $\rightarrow$  raíz.

Los resultados ayudan a comprender la importancia de las plantas en la distribución de estos compuestos orgánicos en el sistema suelo-planta y permiten contemplar la utilización de técnicas como la fitoextracción (acumulación de un contaminante en los tejidos vegetales y la subsiguiente retirada del contaminante del suelo) en la limpieza de suelos con un nivel leve de contaminación. Dado que las plantas actúan como un filtro de aire que las rodea, su presencia ayudaría igualmente a reducir la transferencia a la atmósfera de estos contaminantes. Esta posibilidad debe ser estudiada en detalle, para lo que será necesario continuar con ensayos similares.

#### Agradecimientos

Los autores desean dar las gracias a Carmen Pérez Llaguno por la inestimable colaboración en el muestreo y al personal del Departamento de Química Analítica, Universidade de A Coruña, por el análisis de los isómeros de HCH en los tejidos vegetales. Este estudio ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia (Consellería de Medio Ambiente), el Ministerio de Ciencia y Tecnología del Gobierno de España (Proyecto: REN2002-04507-C02-01) y por la Diputación de A Coruña.

#### 4.6 BIBLIOGRAFÍA

- Bacci, E., D. Calamari, C. Gaggi y M. Vighi. 1990. Bioconcentration of organic chemical vapors in plant leaves: experimental measurements and correlation. *Environmental Science and Technology*, 24: 885-889.
- Bakker, M. I. 2000. Atmospheric deposition of semivolatile organic compounds to plants. Tesis Doctoral. Universidad de Utrecht
- Barber, J. L., P. B. Kurt, G. O. Thomas, G. Kerstiens y K. C. Jones. 2002. Investigation into the importance of the stomatal pathway in the exchange of PCBs between air and plants. *Environmental Science and Technology*, 36: 4282-4287.
- Briggs, G. G., R. H. Bromilow y A. A. Evans. 1982. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. *Pesticide Science*, 13: 495-504.
- Buckley, E. H. 1982. Accumulation of airborne polychlorinated biphenyls in foliage. *Science*, 216: 520-522.
- Burken, J. G. 2003. Uptake and metabolism of organic compounds. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L. (Eds.), *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants*. Wiley Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 59-84.
- Burken, J. G. y J. L. Schnoor. 1998. Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology*, 32: 3379-3385.
- Calvelo Pereira, R., M. Camps-Arbestain, B. Rodríguez Garrido, F. Macías y C. Monterroso. 2006. Behaviour of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environmental*

- Pollution, 144: 210-217.
- Crespo González, N., F. Pan-Montojo González, J. Rega Piñeiro y J. L. Casas. 2001. HCH-polluted soils in highly contaminated areas in "O Porriño" (Galicia, Northwest Spain). En: Vijgen, J., Pruszyński, S., Sobiecki, S., Sliwinski, W., (Eds.), 6<sup>th</sup> International HCH and Pesticides Forum Book. Plant Protection Institute. Poznan, Polonia. Págs. 175-180.
- Dietz, A. C. y J. L. Schnoor. 2001. Advances in phytoremediation. *Environmental Health Perspectives*, 109: 163-168.
- Harner, T., J. L. Wideman, L. M. M. Jantunen, T. F. Bidleman y W. J. Parkhurst. 1999. Residues of organochlorine pesticides in Alabama soils. *Environmental Pollution*, 106: 323-332.
- Hernández, L. M., M. A. Fernández y M. J. González. 1991. Lindane pollution near an industrial source in northeast Spain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46: 9-13.
- IUSS Working Group WRB. 2007. World Reference Base for Soil Resources 2006, actualización 2007. World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Roma.
- Manz, M., K. D. Wenzel, U. Dietze y G. Schuurmann. 2001. Persistent organic pollutants in agricultural soils of central Germany. *The Science of the Total Environment*, 277: 187-198.
- Martínez Cortizas, A. y A. Pérez Alberti. 1999. Atlas climático de Galicia. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela.
- Mclachlan, M. S. 1999. Framework for the interpretation of measurements of SOCs in plants. *Environmental Science and Technology*, 33: 1799-1804.
- Metcalfe, R. L. 1955. Benzene Hexachloride. En: Metcalfe, R. L. (Eds.), *Organic insecticides: Their chemistry and mode of action*. Interscience Publishers. New York. Págs. 213-231.
- Miglioranza, K. S. B., J. E. Aizpún De Moreno, V. J. Moreno, M. L. Osterrieth y A. H. Escalante. 1999. Fate of organochlorine pesticides in soils and terrestrial biota of "Los padres" Pond watershed, Argentina. *Environmental Pollution*, 105: 91-99.
- Muir, D. C. G., M. D. Segstro, P. M. Welbourn, D. Toom, S. J. Eisenreich, C. R. Macdonald y D. M. Whelpdale. 1993. Patterns of accumulation of airborne organochlorine contaminants in lichens from the upper Great Lakes region of Ontario. *Environmental Science and Technology*, 27: 1201-1210.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 15-39.
- Pivetz, B.E., 2001. Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites. EPA/540/S-01/500. United States Environmental Protection Agency, Washington.
- Prager, J. C. 1995. Environmental Contaminant Reference Databook. Volume 1. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Riederer, M. 2005. Uptake and transport of xenobiotics. En: Hock, B., Elstner, E. F., (Eds.), *Plant Toxicology*. Marcel Dekker New York. Págs. 131-150.
- Rüdel, H. 1997. Volatilisation of pesticides from soil and plant surfaces. *Chemosphere*, 35: 143-152.
- Salt, D. E., R. D. Smith y I. Raskin. 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 643-668.
- Schnoor, J. L., L. A. Licht, S. C. McCutcheon, N. L. Wolfe y L. H. Carreira. 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology*, 29: 318A-323A.
- Schreiber, L. y J. Schönherr. 1992. Uptake of organic chemicals in conifer needles: surface adsorption and permeability of cuticles. *Environmental Science and Technology*, 26: 153-159.
- Schwarz, O. J. y L. W. Jones. 1997. Bioaccumulation of xenobiotic organic chemicals by terrestrial plants. En: Wang, W., Gorsuch, J. W. y Hughes, J. S. (Eds.), *Plants for environmental studies*. CRC Press LLC. Boca Raton. Págs. 417-449.
- Simonich, S. L. y R. A. Hites. 1994. Importance of vegetation in removing polycyclic aromatic hydrocarbons from the atmosphere. *Nature*, 370: 49-51.
- Simonich, S. L. y R. A. Hites. 1995a. Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environmental Science and Technology*, 29: 2905-2914.
- Simonich, S. L. y R. A. Hites. 1995b. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science*, 269: 1851-1854.
- Smith, K. E. C. y K. C. Jones. 2000. Particles and vegetation: implications for the transfer of particle-bound organic contaminants to vegetation. *The Science of the Total Environment*, 246: 207-236.
- Suntio, L. R., W. Y. Shiu, D. Mackay, J. N. Seiber y D. Glotfelty. 1988. Critical review of Henry's law constants for pesticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 103: 1-59.
- Tao, S., F. L. Xu, X. J. Wang, W. X. Liu, Z. M. Gong, J. Y. Fang, L. Z. Zhu y Y. M. Luo. 2005. Organochlorine pesticides in agricultural soil and vegetables from Tianjin, China. *Environmental Science and Technology*, 39: 2494-2499.
- Trapp, S. 2002. Dynamic root uptake model for neutral lipophilic organics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 203-206.
- Trapp, S. y M. Matthies. 1995. Generic one-compartment model for uptake of organic chemicals by foliar vegetation. *Environmental Science and Technology*, 29: 2333-2338.
- Trapp, S. y M. Matthies. 1997. Modeling volatilization of PCDD/F from soil and uptake into vegetation. *Environmental Science and Technology*, 31: 71-74.
- Travis, C. C. y A. D. Arms. 1988. Bioconcentration of organics in beef, milk, and vegetation. *Environmental*

- Science and Technology, 22: 271-274.
- U. S. Department of Health and Human Services. 2005. Toxicological profile for Alpha-, Beta-, Gamma-, and Delta-hexachlorocyclohexane. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia.
- van Pul, W. A. J., T. F. Bidleman, E. Brorström-Lundén, P. J. H. Builtjes, S. Dutchak, J. H. Duyzer, S.-E. Gryning, K. C. Jones, H. F. G. Van Dijk y J. A. Van Jaarsveld. 1999. Atmospheric transport and deposition of pesticides: An assessment of current knowledge. *Water, Air, & Soil Pollution*, 115: 245-256.
- Vijgen, J., IHPA. 2006. The legacy of lindane HCH isomer production. International and HCH and Pesticides Association. URL: <http://www.ihpa.info/docs/library/Lindane%20Main%20Report%20DEF20JAN06.pdf>.
- Walker, K., D. A. Vallerio y R. G. Lewis. 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environmental Science and Technology*, 33: 4373-4378.
- Wania, F. y D. Mackay. 1995. A global distribution model for persistent organic chemicals. *The Science of the Total Environment*, 160-161: 211-232.
- Welsch-Pausch, K., M. S. McLachlan and G. Umlauf. 1995. Determination of the principal pathways of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to *Lolium multiflorum* (Welsh ray grass). *Environmental Science and Technology*, 29: 1090-1098.
- Willett, K. L., E. M. Ulrich y R. A. Hites. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science and Technology*, 32: 2197-2207.



## **CAPÍTULO 5**

### **Evaluación inicial de la toxicidad del hexaclorociclohexano en plantas: crecimiento en disolución nutriente contaminada**

Este trabajo ha sido presentado, parcialmente:

Calvelo Pereira, R., F. Macías, y C. Monterroso. Toxicity of hexachlorocyclohexane isomers and plant uptake: experiments in hydroponic cultures. COST ACTION 859. Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety. First Scientific Meeting of Working Group 1: Root to shoot translocation of pollutants and nutrients. Santiago de Compostela, ESPAÑA. 22-24 Junio 2006. COMUNICACIÓN ORAL.

	<i>pág.</i>
RESUMEN	139
5.1. INTRODUCCIÓN	140
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	141
5.2.1. Especies vegetales	141
5.2.2. Germinación y desarrollo inicial	142
5.2.3. Ensayo de crecimiento en condiciones de contaminación	143
5.2.4. Toma de muestras; medidas	145
5.2.5. Estadística	146
5.3. RESULTADOS	146
5.3.1. Aspectos cualitativos de la toxicidad del HCH	146
5.3.2. Transpiración absoluta y transpiración relativa	147
5.3.3. Elongación	149
5.3.4. Biomasa: producción y reparto	150
5.3.5. Uso eficiente del agua transpirada	152
5.4. DISCUSIÓN	153
5.4.1. Evaluación inicial de la toxicidad	153
5.4.2. Alteraciones del crecimiento de las plantas	155
5.4.3. Especies tolerantes y especies sensibles	156
5.5. CONCLUSIONES	157
5.6. BIBLIOGRAFÍA	157

## RESUMEN

Este trabajo se centra en la descripción de un experimento, en condiciones controladas, de crecimiento en disolución nutriente contaminada con una mezcla heterogénea de los isómeros principales de HCH ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH). 13 especies vegetales de interés económico y/o agrícola se han utilizado para efectuar la selección inicial de plantas candidatas a ser empleadas en ensayos de fitocorrección. Se han puesto de manifiesto diferencias entre el tratamiento CONTROL y el tratamiento HCH: modificaciones de la arquitectura de la planta, alteraciones de la fisiología (transpiración), reducción de la productividad (biomasa seca). Si bien todas las plantas se ven afectadas (muestran estrés), existen distintas respuestas según las especies. El descenso de la Transpiración Relativa Normalizada y en la Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua es especialmente destacado en las especies más sensibles (*Secale cereale* L., *Lactuca sp.*, y *Daucus carota* L.). Por otro lado, algunas de las plantas utilizadas en este experimento son capaces de mitigar los efectos negativos del HCH, adquiriendo cierta resistencia (*Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., *Avena sativa* L., *Brassica sp.*, y *Phaseolus vulgaris* L.). Estas plantas (tolerantes), serían *a priori* las idóneas para continuar con ensayos de toxicidad de HCH.

### 5.1. INTRODUCCIÓN

Desde los años 1930, la producción de compuestos orgánicos de origen antrópico ha revolucionado las técnicas agrícolas, favoreciendo el aumento de la productividad de los cultivos (Turnbull, 1996). Durante las primeras décadas de uso generalizado de pesticidas e insecticidas no se consideró que el control de plagas supusiese algún tipo de amenaza para el ambiente. No obstante, la naturaleza química de estos compuestos implica que muchos de ellos tiendan a acumularse en los diferentes ecosistemas, constituyendo un problema ambiental (Rose y Kraybill, 1966). De todos estos compuestos, destacan los pesticidas organoclorados, muy utilizados por su carácter biocida y selectivo (Turnbull, 1996). Los pesticidas se encuentran en cantidades detectables en todos los ambientes del planeta, incluyendo áreas no habitadas. Los pesticidas son depositados en los diferentes ecosistemas de modos muy diversos: aplicación directa (agricultura), control de plagas en bosques o seres humanos, depósito incontrolado de residuos de producción, manejo inadecuado del stock de producto comercial almacenado, etc. Estos compuestos, una vez introducidos en el medio, es factible que se distribuyan entre los distintos ecosistemas a través del agua y el aire, interaccionando asimismo con los suelos. El principal problema de muchos pesticidas es su persistencia en el ambiente y su toxicidad en plantas, animales y ser humano, lo que ha determinado su regulación y prohibición desde los años 70 del siglo pasado (Breivik y col., 1999). Los organismos internacionales han clasificado varios pesticidas como Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs), desarrollando una legislación muy restrictiva sobre su utilización y, a menudo, su retirada del mercado (Reglamento CE, 850/2004<sup>1</sup>).

El hexaclorociclohexano (HCH) (1-,2-,3-,4-,5-,6-hexaclorociclohexano) es un COP, ampliamente utilizado en todo el mundo hasta los años 70 (Vijgen, 2006). Entre los pesticidas organoclorados, es uno de los más preocupantes dado su carácter tóxico para el ser humano (Willet y col., 1998). El HCH se sintetiza en el laboratorio a través de la adición de moléculas de cloro a una molécula de benceno en presencia de luz. Este compuesto se comercializó inicialmente como una mezcla de los diferentes isómeros del HCH obtenidos en la cloración, conocida como HCH técnico (isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en proporciones variables; Vijgen, 2006), utilizado como pesticida en diferentes formulaciones. El isómero  $\gamma$ -HCH es el responsable de las propiedades insecticidas de este compuesto. Al enriquecer el HCH técnico en  $\gamma$ -HCH, se obtiene el lindano (aprox. 99%  $\gamma$ -HCH) (WHO, 1991). El lindano se ha utilizado en todo el mundo durante los últimos 50 años para el control de plagas, tratamiento de la madera e incluso aplicaciones médicas, lo que ha causado una entrada reiterada de estos compuestos en el ambiente, llegando a contaminar aguas, suelos, vegetación y animales, pudiendo introducirse en la cadena alimenticia humana (Orchard y col., 2000).

Una vez que el HCH llega a los suelos, su comportamiento está influenciado por factores ambientales como el pH, la temperatura, el potencial redox, que afectan a las plantas y a los microorganismos capaces de degradar estos compuestos (Siddique y col., 2002; Courdouan y col., 2004). El HCH se acumula en los suelos y sedimentos de modo preferente, adsorbiéndose. Por otro lado, también interactúa con la vegetación, que es capaz de acumularlo a través del sistema radicular y las hojas por mecanismos diferentes (Calvelo Pereira y col., 2007). La interacción con las raíces tiene lugar a través de la

---

<sup>1</sup> Reglamento 850/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CE.

solución del suelo, que actúa de medio de transporte para el contaminante. No obstante, la presencia del HCH en medio acuoso puede causar problemas de toxicidad sobre la biota del suelo, dado que los lixiviados de los residuos de la fabricación de estos compuestos han sido caracterizados como inhibidores del crecimiento bacteriano (USC, 2003). Una aproximación para conocer la toxicidad del HCH es caracterizar el grado de estrés que produce en las plantas, lo que es dependiente de la especie vegetal, del estado de crecimiento, de la cantidad de biomasa o bien de la densidad de individuos (Lichtenthaler, 1998; Lambers y col., 1998). En esto también influye el potencial de absorción del contaminante, la reactividad bioquímica y la dosis (Campanella y Perrin, 1997; Medina y col., 2003).

Se sabe que el HCH puede causar toxicidad en diferentes especies vegetales, alterando la tasa de germinación, la fisiología de la plántula, e, incluso, provocando daños a nivel molecular (ADN) (Hopkins, 1952; Selim y col., 1970; Bidlan y col., 2004). Existen estudios en cultivo hidropónico (disolución nutriente), pero son escasos, y se han diseñado fundamentalmente para la evaluación de la bioacumulación y retención del HCH en unas pocas especies vegetales (Li y col., 2002; Marcacci, 2004). Por otro lado, no se conocen estudios que se centren en la toxicidad del HCH sobre plantas de importancia económica. La fitotoxicidad puede afectar a la producción vegetal y a la calidad del cultivo en cuanto a producción, al alterar parámetros como la transpiración, la producción de biomasa seca y el reparto de la misma (Trapp y col., 2000; Fitter y Hay, 2002;).

En la actualidad el desarrollo de técnicas de fitocorrección para proceder a la retirada efectiva de HCH de los suelos contaminados ha cobrado gran relevancia (Mackova y col., 2006). La presencia de las plantas y su aprovechamiento, no solo como sumidero de contaminación sino como estimuladora de actividad de la rizosfera, es un factor muy importante para la fitocorrección del HCH (Kidd y col., 2008). Los posibles candidatos para ser empleados en fitocorrección deben ser primero escogidos en base a su resistencia a la presencia de HCH en las más diversas condiciones ambientales (Marcacci y col., 2006). Los estudios en cultivos hidropónicos facilitan el uso de ambientes simplificados para proyectar la toxicidad de diferentes compuestos, proporcionando alta sensibilidad (Gong y col., 2006; Li y col., 2002).

El **objetivo** de este estudio es evaluar los posibles efectos tóxicos del HCH en 13 especies vegetales de interés agronómico en condiciones controladas en una cámara de crecimiento diseñada al efecto. Dado que una ruta de entrada del HCH en la vegetación es a través de la disolución acuosa del suelo y su interacción con las raíces (biodisponibilidad), se ha elaborado un experimento en disolución nutriente para simular la interacción HCH:planta. Se considera el impacto del contaminante en la fisiología y el crecimiento de cada una de las especies vegetales. Este es el paso inicial del proceso de evaluación de diferentes especies vegetales para utilizar las más tolerantes en una experiencia de fitocorrección de los suelos del entorno del Polígono Industrial de Torneiros, en O Porriño, Pontevedra.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1. Especies vegetales

Se escogieron 13 especies de plantas superiores de características diferentes para llevar a cabo el experimento (Tabla 5.1). Cuatro de estas especies son plantas monocotiledóneas de la familia Poaceae:

trigo común (*Triticum aestivum* L.), avena común (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y centeno (*Secale cereale* L.). Estas especies representan un grupo de vegetales importante desde el punto de vista económico, al constituir cultivos de gran repercusión a nivel mundial (Fletcher y col., 1988). Por otro lado, se han escogido un mayor número de plantas dicotiledóneas, representando la mayor presencia de este grupo en condiciones naturales. De la familia Leguminosae (Fabaceae) se seleccionaron representantes muy utilizados en numerosos estudios como la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) y el guisante (*Pisum sativum* L.). Asimismo, otras plantas de interés que se incluyen en el ensayo son: una variedad de zanahoria (*Daucus carota* L.) y dos de lechuga (*Lactuca sativa* L.), así como cebolla (*Allium cepa* L.), todas ellas especies muy empleadas en estudios ambientales. Finalmente, este estudio ha incorporado tres especies adicionales: dos variedades locales de nabicol, *Brassica* sp., por su abundancia en Galicia y una solanácea, *Solanum nigrum* L., por su buena adaptación local a las condiciones de contaminación por presencia de HCH (Calvelo Pereira y col., 2006). Todas las semillas de estas especies son de origen comercial excepto las de *Solanum nigrum* L., recogidas en el área contaminada de O Porriño. Esta zona está contaminada por el vertido incontrolado de residuos de la fabricación y formulación de lindano durante décadas (aprox., 1948-1964), compuestos principalmente por una mezcla heterogénea de los isómeros principales de HCH ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH) en concentraciones variables.

### 5.2.2. Germinación y desarrollo inicial

Las semillas se germinaron en papel de filtro humedecido con agua destilada en placas Petri de vidrio adecuadas al tamaño de la semilla. Todas las semillas recibieron un tratamiento previo de limpieza y estimulación de la germinación con base fuerte y etanol (dilución 1:10 con agua ultrapura). Posteriormente se lavaron con abundante agua ultrapura para eliminar los restos de base y alcohol. En cada placa Petri se colocaron entre 5 y 10 semillas, utilizando entre 10 y 15 placas por especie. La germinación fue muy variable en función de la especie que se considere (Tabla 5.1). Las semillas se mantuvieron en las placas Petri durante 1-2 semanas en función del tiempo de germinación de cada una de las especies.

**Tabla 5.1.** Condiciones iniciales de germinación en placa y desarrollo posterior del ensayo en disolución nutriente contaminada para todas las especies utilizadas.

Especie	Código	Germinación (%) <sup>1</sup>		Permanencia en disolución nutriente (días)	Supervivencia final (%)	
		media	d.s. <sup>2</sup>		CONTROL <sup>3</sup>	HCH <sup>4</sup>
<i>Triticum aestivum</i> L.	<b>TRI</b>	92	4	41	100	87
<i>Avena sativa</i> L.	<b>AVE</b>	68	10	35	82	65
<i>Hordeum vulgare</i> L.	<b>HOR</b>	76	18	28	100	88
<i>Secale cereale</i> L.	<b>SEC</b>	79	9	30	89	90
<i>Brassica</i> sp.	<b>BRA1</b>	88	10	37	86	92
<i>Brassica</i> sp.	<b>BRA2</b>	82	14	42	67	82
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	<b>PHA</b>	87	13	31	55	78
<i>Lactuca sativa</i> L.	<b>LAB1</b>	90	7	28	66	68
<i>Daucus carota</i> L.	<b>DAU</b>	77	14	42	29	14
<i>Pisum sativum</i> L. <sup>5</sup>	<b>PIS</b>	58	27	< 21	-	-
<i>Solanum nigrum</i> L. <sup>5</sup>	<b>SOL</b>	71	11	< 21	-	-
<i>Allium cepa</i> L. <sup>5</sup>	<b>ALL</b>	< 50	-	-	-	-
<i>Lactuca sativa</i> L. <sup>5</sup>	<b>LAB2</b>	< 25	-	-	-	-

<sup>1</sup> máxima germinación en placa; n=10; t=14 días; <sup>2</sup> d.s.: desviación estándar. <sup>3</sup> n variable entre 3 y 6; <sup>4</sup> n variable entre 2 y 6; <sup>5</sup> especies finalmente no utilizadas en el ensayo de crecimiento en contaminación.

La germinación de las diferentes especies vegetales utilizadas en este estudio fue variable y generalmente superior al 60% (Tabla 5.1). El período máximo de germinación aceptable se estableció en 14 días. Algunas especies de crecimiento muy rápido, como *Triticum*, *Secale* o *Lactuca* sp., pudieron ser utilizadas inmediatamente, pues la germinación y el desarrollo de las plántulas, rápido y vigoroso, lo permitió. En el caso de *Avena sativa* L., el traslado al cultivo hidropónico tuvo que retrasarse unos días debido a un desarrollo escaso de las plántulas. En lo que respecta a *Allium* y *Lactuca* sp (variedad II) la germinación inicial, muy baja (<50%; Tabla 5.1), no permitió su utilización en fases posteriores del estudio.

En el estado inicial del desarrollo (plántula), se retiraron los individuos de las placas Petri y se colocaron en láminas de poliestireno perforadas para el traslado y acomodo en **macetas** (vasos de vidrio de un volumen de 500 ml.) rellenos con **disolución nutriente**. Las plantas de un tamaño y desarrollo similares fueron cuidadosamente separadas, colocadas en grupos al azar y asignadas, nuevamente al azar a cada uno de las macetas; un mínimo de tres grupos de plantas se reservaron en este momento para la toma de medidas del momento inicial. Todos los grupos considerados estaban compuestos por el mismo número de plantas, dependiendo de cada especie vegetal. Las macetas se colocaron de tal modo que se evitaba el contacto en la disolución nutriente y la parte aérea de las plantas. Cada vaso de vidrio individual fue recubierto por papel de aluminio para evitar el paso de la luz y la contaminación por presencia de algas. Las disoluciones se agitaron de modo continuo para facilitar la aireación, mediante el uso de bombas. Todas las plantas se dejaron crecer en estas condiciones durante al menos dos semanas.

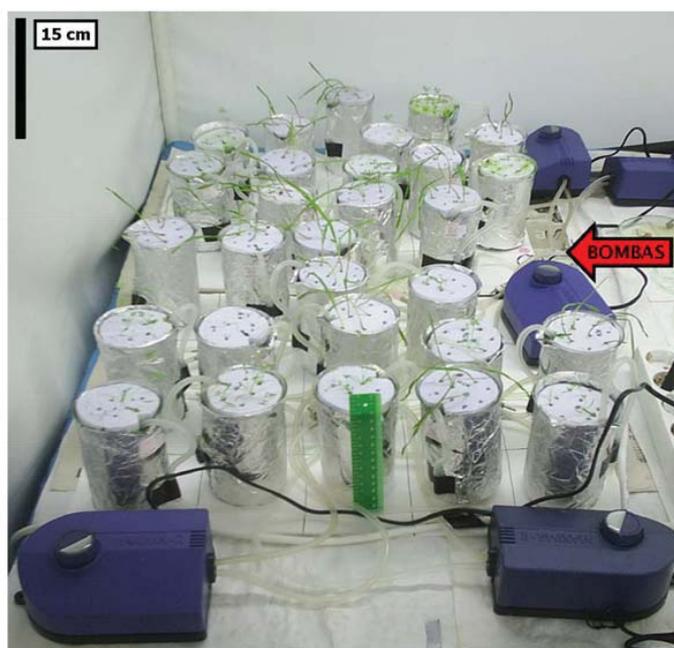
La **disolución nutriente** se obtuvo a partir de disoluciones de reserva de macro y micronutrientes, cuya composición esencial fue ( $\mu\text{M}$ ): 2000  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1000  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 250  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 50  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200  $\text{NaOH}$ , 150  $\text{KCl}$ , 25  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 20  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 15  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 15  $\text{FeEDTA}$ , 10  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.0143  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Inicialmente se prepararon disoluciones madre de mayor concentración (100 veces en el caso de los macronutrientes; 1000 veces en el caso de los micronutrientes), que luego se diluyeron para alcanzar los valores indicados (Kidd y col., 2004).

### 5.2.3. Ensayo de crecimiento en condiciones de contaminación

Después de un período que oscilaba entre 14 y 29 días creciendo en disolución nutriente, las plántulas de tamaño y aspecto similares se colocaron en nuevas **macetas** de vidrio (en cada una, entre 2 y 6 individuos; distribución nuevamente al azar): la mitad de las macetas con **disolución nutriente normal** (tratamiento **CONTROL**) y la mitad con **disolución nutriente contaminada** (tratamiento **HCH**). Durante todo el período del crecimiento de las plantas en macetas con disolución nutriente se reservaron varios vasos de vidrio con disolución nutriente (sin HCH y con HCH) que actuaron como control sin planta en la evaluación de la transpiración (tratamiento **BLANCO**).

En el **tratamiento HCH**, la disolución nutriente empleada se contaminó con una mezcla de los isómeros principales de HCH ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH), obtenida a partir del residuo de la fabricación del lindano recogido en la zona contaminada del Polígono Industrial de Torneiros (O Porriño). Esta mezcla heterogénea de HCH presentaba una distribución porcentual de cada uno de los isómeros particular:  $\alpha$ , 77%,  $\beta$ , 16%,  $\gamma$ , 5%, y  $\delta$ , 2% (USC, 2003). Al llevar a cabo la disolución del HCH se tuvo en cuenta la solubilidad acuosa de cada isómero (solubilidad,  $\text{mg L}^{-1}$ :  $\alpha$ , 1.6;  $\beta$ , 0.32;  $\gamma$ , 6.20;  $\delta$ , 9; Manz y col., 2001).

Las soluciones contaminadas se agitaron durante dos días en periodos de ocho horas con intervalos de reposo de la misma duración, para favorecer la total disolución del residuo en polvo. Finalmente, esta disolución saturada se hizo pasar a través de un filtro de fibra de vidrio para evitar la presencia de restos sólidos asociados al residuo. En función de la distribución porcentual de cada isómero en el residuo original y la solubilidad acuosa, la **concentración final** de cada isómero en la disolución contaminada fue ( $\text{mg L}^{-1}$ ):  $\alpha$ , 1.6;  $\beta$ , 0.32,  $\gamma$ , 1.8;  $\delta$ , 0.7. Todo el material de vidrio utilizado en la manipulación de disoluciones acuosas de HCH se lavó previamente con metanol para minimizar la pérdida del contaminante por adsorción (Concha Graña, 2004).



**Foto 5.1.** Aspecto general de las macetas de vidrio del tratamiento CONTROL y el tratamiento HCH en la cámara de cultivo. La flecha indica la colocación de las bombas que mantenían el flujo de oxígeno en las macetas.

En todos los casos (tratamiento HCH y tratamiento CONTROL), las disoluciones en las macetas de vidrio se agitaron de modo continuo para facilitar la aireación y evitar toxicidad por ausencia de oxígeno (flujo continuo y bajo proporcionado por pequeñas bombas de acuario). La agitación se mantuvo en un nivel bajo para reducir la posible pérdida de HCH por evaporación. La disolución se cambiaba de modo regular en ambos tratamientos durante todo el período de estudio, evitando así oscilaciones en la concentración del contaminante en disolución. La parte aérea y la raíz se encontraban separadas por una lámina de poliestireno. Las macetas se colocaron en una cámara de crecimiento, manteniendo la temperatura en un rango de 17-24 °C, con un fotoperíodo de 16 horas de iluminación y 8 horas de oscuridad. Inicialmente, se utilizaron 6 réplicas de cada especie y tratamiento, distribuidos de modo aleatorio en la mesa de la cámara de crecimiento (Foto 5.1). El ensayo duró 14 días y la mayoría de especies vegetales mostraron unos resultados aceptables de aclimatación a este medio en ambos

tratamientos. No obstante, dos especies, *Pisum* y *Solanum*, presentaron una adaptación a la disolución nutriente muy negativa (datos no mostrados), por lo que no fué posible la continuación del ensayo con estas dos plantas.

El **pH** de la disolución se monitorizó al inicio y al final de cada uno de los ensayos. Al inicio del experimento la disolución nutriente no contaminada presentaba un pH ligeramente inferior al de la disolución con tratamiento HCH (CONTROL, pH  $6.3 \pm 0.1$ ; HCH, pH  $7.1 \pm 0.1$ ). Al finalizar el período de contaminación, los valores de pH descendieron ligeramente en ambos tratamientos (CONTROL, pH final  $5.9 \pm 0.2$ ; HCH, pH final  $6.8 \pm 0.1$ ). Las especies vegetales que inicialmente se escogieron respondieron de modo muy diferente a las condiciones de crecimiento. Esto podría estar relacionado con las condiciones de pH de la disolución nutriente (6.3) que podría actuar como factor limitante al crecimiento de algunas especies. En la preparación de la disolución, se optó por mantener constante el pH y no modificarlo, ya que un valor alto favorece mucho la destrucción del HCH a causa de hidrólisis, reduciendo considerablemente la vida media de los diferentes isómeros de HCH en disolución acuosa por encima de pH 9 (Siddique y col., 2002; Ngabe y col, 1993; Mackenzie y col., 2005)

#### 5.2.4. Toma de muestras; medidas

Durante todo el período de crecimiento en cultivo hidropónico se tomaron medidas de **transpiración**, por diferencia de peso de los reactores cada 4-7 días (**T**, g de disolución perdida hora<sup>-1</sup> planta<sup>-1</sup>; se ha calculado restando los valores del tratamiento BLANCO; Vose y col., 2003). Estas medidas se utilizaron también para el cálculo de variables relacionadas con la fitotoxicidad en las macetas: la Transpiración Relativa Normalizada (TRN) y la Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua (EPUA). En todos los casos se utilizaron las macetas del tratamiento BLANCO para tener en cuenta la pérdida de agua por evaporación en la cámara de crecimiento no relacionada con el crecimiento vegetal. Para una correcta evaluación del efecto tóxico del HCH es necesario normalizar los datos de transpiración: con respecto a la transpiración inicial dentro cada tratamiento, por un lado, y un tratamiento con respecto al otro, por otro lado. Para ello se utiliza la **Transpiración Relativa Normalizada** (Ucisik y col., 2007), calculada como:

$$TRN = \left( \frac{1/n \left( \frac{T_1(HCH, t_1)}{T_1(HCH, t_0)} + \frac{T_2(HCH, t_2)}{T_2(HCH, t_0)} + \dots + \frac{T_x(HCH, t_x)}{T_x(HCH, t_0)} \right)}{1/m \left( \frac{T_1(CONTROL, t_1)}{T_1(CONTROL, t_0)} + \frac{T_2(CONTROL, t_2)}{T_2(CONTROL, t_0)} + \dots + \frac{T_x(CONTROL, t_x)}{T_x(CONTROL, t_0)} \right)} \right)$$

siendo: T la transpiración (g hora<sup>-1</sup> planta<sup>-1</sup>), HCH tratamiento contaminado, CONTROL tratamiento sin contaminación, t<sub>0</sub> el inicio del experimento, t<sub>x</sub> el tiempo en el momento x, n y m el número de réplicas para plantas contaminadas y no contaminadas respectivamente. La TRN de los controles es siempre del 1. Valores inferiores a 1 se consideran como una indicación de la inhibición de la transpiración. Por otro lado, la **Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua** (el cociente entre la materia seca producida y el agua transpirada durante el período de crecimiento; mg g<sup>-1</sup>) se puede utilizar como indicativo de estrés químico y medida de efectos subletales en plantas afectadas (Trapp y col., 2000).

Una vez finalizado el ensayo (14 días; tratamiento CONTROL y tratamiento HCH; Tabla 5.1), las plantas fueron cosechadas. Se llevó a cabo una inspección visual cualitativa para evaluar el crecimiento óptimo de las plantas (aspecto de tallo, hojas y raíces, presencia o ausencia de tejidos decolorados o necróticos, etc.). Se midió la longitud del tallo más largo y de la raíz más larga. Se tomaron medidas adicionales (número de hojas, longitud de ramas) en función de la especie considerada. El material vegetal se separó (raíces, tallos y hojas), lavó con agua destilada y se determinó el peso fresco y el peso seco (al aire). Estas medidas se tomaron, asimismo, en el momento del traslado inicial a las macetas (paso a la disolución nutriente, sin contaminante). Tres réplicas adicionales se utilizaron para tomar medidas de peso fresco y peso seco (al aire) y ver la variación de biomasa durante el periodo de cultivo en solución nutritiva.

### 5.2.5. Estadística

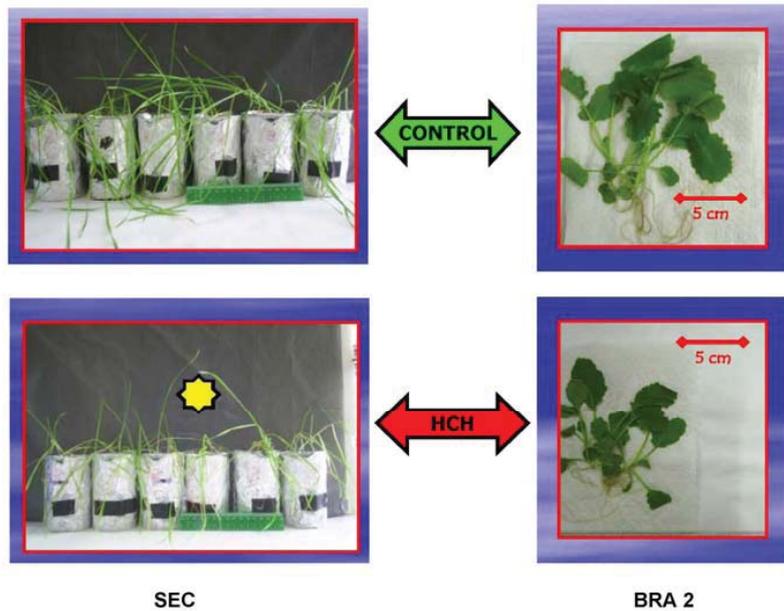
En el estudio de las variables relacionadas con la transpiración, se ha realizado un contraste de medias, test t de Student, entre el tratamiento CONTROL y HCH. Se han calculado también las correlaciones entre las variables relacionadas con el crecimiento, así como el ajuste lineal.

## 5.3. RESULTADOS

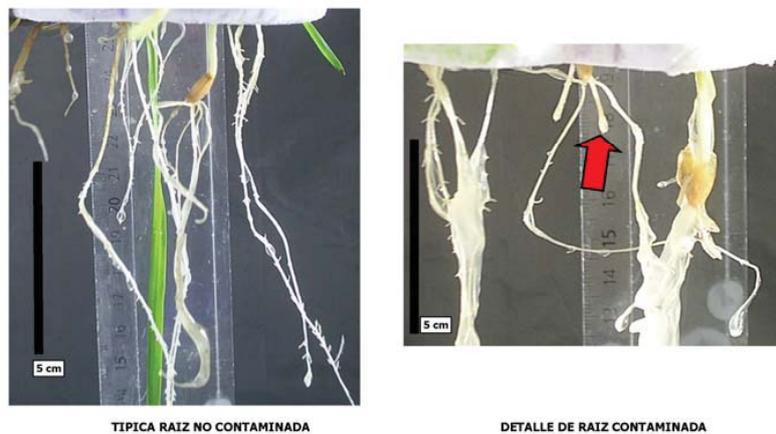
### 5.3.1. Aspectos cualitativos de la toxicidad del HCH

El desarrollo en disolución hidropónica fue relativamente óptimo en el tratamiento CONTROL al inicio del experimento, si bien la aclimatación a la disolución nutriente fue empeorando con el tiempo en ambos tratamientos (supervivencia final <90% en la mayoría de las especies). Hay que destacar que en el caso de *Lactuca sp.* y *Daucus caota L.*, el número de plantas que finalmente pudieron ser utilizadas en el ensayo de contaminación fue bajo, mostrando además un impacto relativamente negativo del crecimiento en la disolución nutriente utilizada en este ensayo (Tabla 5.1).

En general, el aspecto de las plantas sometidas al tratamiento CONTROL es más vigoroso que el de las plantas con tratamiento HCH (Foto 5.2). En las macetas contaminadas con HCH el número de hojas y/o ramas presenta una clara tendencia a ser inferior (datos no mostrados). Por otra parte, la proporción de hojas que mostraban signos de necrosis aumentaba en el tratamiento HCH. Hay que destacar el hecho de que en algunos casos, las raíces de las diferentes especies (sobre todo en el caso de *Triticum* y *Avena*) presentaban una arquitectura muy alterada en presencia de HCH. Las raíces de las plantas sumergidas durante un período de 14 días en disolución contaminada con HCH son generalmente más cortas y gruesas, aunque no necesariamente en un número menor (Foto 5.3; indicado por una flecha). Todos estos efectos, por regla general, son más evidentes en las plantas monocotiledóneas estudiadas (*Triticum*, *Avena*, *Hordeum* y *Secale*).



**Foto 5.2.** Aspecto general de dos especies al finalizar el tratamiento sin contaminar (CONTROL) y el tratamiento contaminado (HCH). SEC es *Secale cereale* L.; BRA2 es *Brassica* sp.

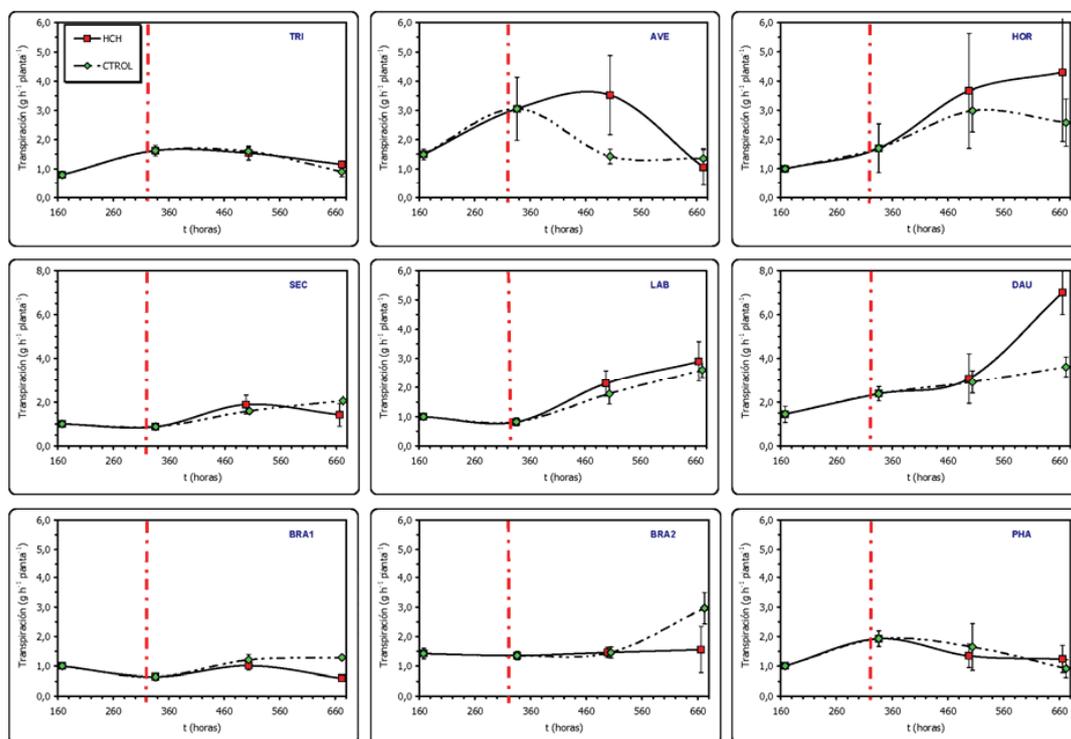


**Foto 5.3.** Detalle de raíz no contaminada y raíz contaminada de la misma especie (*Avena sativa* L.). La flecha señala una zona de raíces de morfología alterada.

### 5.3.2. Transpiración y transpiración relativa

La Figura 5.1 resume los resultados más relevantes obtenidos al analizar la tendencia que muestra la transpiración absoluta (T) durante el desarrollo del experimento. Se asume que justo en el momento de proceder al cambio de disolución nutriente limpia por disolución contaminada con HCH, las plantas están perfectamente adaptadas al cultivo hidropónico. En términos generales, los valores de transpiración inicial

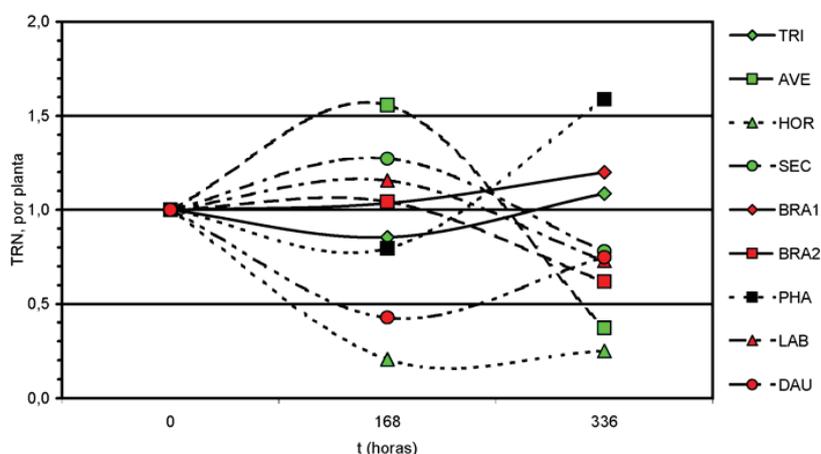
son diferentes para cada una de las plantas utilizadas, pero en el entorno de 1 - 3 g h<sup>-1</sup> planta<sup>-1</sup> (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Transpiración absoluta ( $T$ , g hora<sup>-1</sup> planta<sup>-1</sup>) de las especies vegetales (HCH: tratamiento HCH; CTROL: tratamiento CONTROL). TRI es *Triticum aestivum* L.; AVE es *Avena sativa* L.; HOR es *Hordeum vulgare* L.; SEC es *Secale cereale* L.; LAB es *Lactuca sativa* L.; DAU es *Daucus carota* L.; BRA1 y BRA2 son dos variedades de *Brassica sp.*; PHA es *Phaseolus vulgaris* L. Se representa el valor medio±error estándar. El inicio del experimento se indica por una barra vertical discontinua. La escala de tiempo se ha recalculado a partir del fin del experimento.

Cada especie vegetal muestra un patrón de desarrollo de la transpiración variable a medida que el ensayo avanza. Al finalizar el experimento, *Lactuca* y *Daucus* aumentaron el consumo de agua en el tratamiento CONTROL (> 3 g h<sup>-1</sup> planta<sup>-1</sup>; Figura 5.1). *Phaseolus*, no supera en ningún caso un consumo de 1.5 g h<sup>-1</sup> planta<sup>-1</sup>; el resto de especies presentan valores intermedios. Al comparar, los resultados entre tratamientos (HCH vs CONTROL) *Triticum*, *Secale*, *Lactuca*, *Brassica sp* (variedad 1) y *Phaseolus* no muestran una diferencia significativa a  $P < 0.05$ , siguiendo en la mayoría de casos una evolución similar (generalmente de leve ascenso de la transpiración conforme avanza el estudio). Por otro lado, en *Hordeum* y *Daucus* el tratamiento HCH provoca un aumento de la transpiración media (no significativo a  $P < 0.05$ ). Por su parte, en el caso de la variedad 2 de *Brassica sp.*, las macetas CONTROL son las que muestran una transpiración mayor que las macetas HCH (aprox. 3 g h<sup>-1</sup> planta<sup>-1</sup> frente a 1.5 g h<sup>-1</sup> planta<sup>-1</sup>). *Avena* presenta un comportamiento muy particular: la transpiración en el tratamiento HCH inicialmente aumenta, si bien al finalizar el experimento ha descendido a los valores del tratamiento CONTROL (Figura 5.1).

La Transpiración Relativa Normalizada, TRN, al finalizar el ensayo, es muy variable. Se puede constatar, nuevamente, que cada especie vegetal tiene un comportamiento particular con respecto a la TRN. Cada una de las plantas muestra un valor diferente (entre 0.2 y 1.6; Figura 5.2). En todo caso, las tendencias observadas respecto a la TRN son relativamente homogéneas. Por un lado, *Triticum*, la variedad 1 de *Brassica* y *Phaseolus* presentan valores de TRN >1 al final del ensayo, con tendencia claramente al ascenso. El resto de especies vegetales muestran un valor de TRN <1 (Figura 5.2). No obstante, en el caso de *Avena*, *Secale*, la variedad 2 de *Brassica* y *Lactuca*, la tendencia general es al descenso de la transpiración relativa con el tiempo, mientras que para *Hordeum* y *Daucus*, TRN muestra una curva ligeramente ascendente (Figura 5.2).

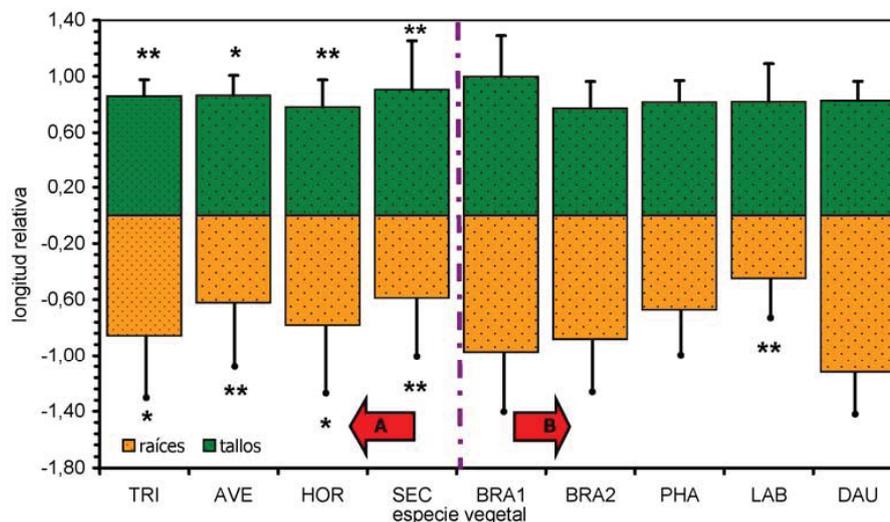


**Figura 5.2.** Transpiración Relativa Normalizada (TRN, adimensional, planta<sup>-1</sup>) de las especies vegetales. Se representan los valores medios a lo largo del período del experimento (14 días). TRI es *Triticum aestivum* L.; AVE es *Avena sativa* L.; HOR es *Hordeum vulgare* L.; SEC es *Secale cereale* L.; BRA1 y BRA2 son dos variedades de *Brassica* sp.; PHA es *Phaseolus vulgaris* L.; LAB es *Lactuca sativa* L.; DAU es *Daucus carota* L.

### 5.3.3. Elongación

En términos de elongación de la radícula/coleóptilo (en el caso de plantas monocotiledóneas) se observó una gran variación entre las diferentes especies y aún entre las distintas plantas de la misma especie (Figura 5.3). El descenso relativo de la longitud de la raíz más larga en el tratamiento HCH es grande, llegando incluso hasta un 40% del valor con respecto a las plantas CONTROL. En cuanto a la longitud del tallo más largo, las especies vegetales presentan una disminución en el tamaño del tallo, si bien no parece una tendencia tan clara como la vista al analizar la respuesta de la elongación de la raíz (máximo descenso de aprox. un 20% del valor del control en *Hordeum*). En todo caso, se diferencian dos grupos de plantas claramente en función de la respuesta de la elongación de los tejidos vegetales. Por un lado, *Triticum*, *Avena*, *Hordeum* y *Secale* presentan un comportamiento uniforme, mostrando un descenso moderado (significativo a P<0.05) de la longitud del tallo y un descenso ligeramente más acusado (significativo a P<0.05) de la longitud de las raíces (Grupo A). El resto de especies vegetales (*Brassica* sp.,

*Phaseolus*, *Lactuca*, *Daucus*) muestran una tendencia menos acusada, pues la diferencia entre HCH y CONTROL no es, en general, significativa a  $P < 0.05$  ni en el tallo ni en la raíz (Grupo B).



**Figura 5.3.** Variación de la longitud relativa de tallo y raíz con respecto al tratamiento CONTROL (longitud tallo o raíz HCH / longitud tallo o raíz CONTROL; adimensional) en las especies vegetales. Las barras se corresponden con la desviación estándar. \* diferencia significativa a  $P < 0,05$ ; \*\* diferencia significativa a  $P < 0,001$ . TRI es *Triticum aestivum* L.; AVE es *Avena sativa* L.; HOR es *Hordeum vulgare* L.; SEC es *Secale cereale* L.; BRA1 y BRA2 son las dos variedades de *Brassica* sp.; PHA es *Phaseolus vulgaris* L.; LAB es *Lactuca sativa* L.; DAU es *Daucus carota* L.

#### 5.3.4. Biomasa: producción y reparto

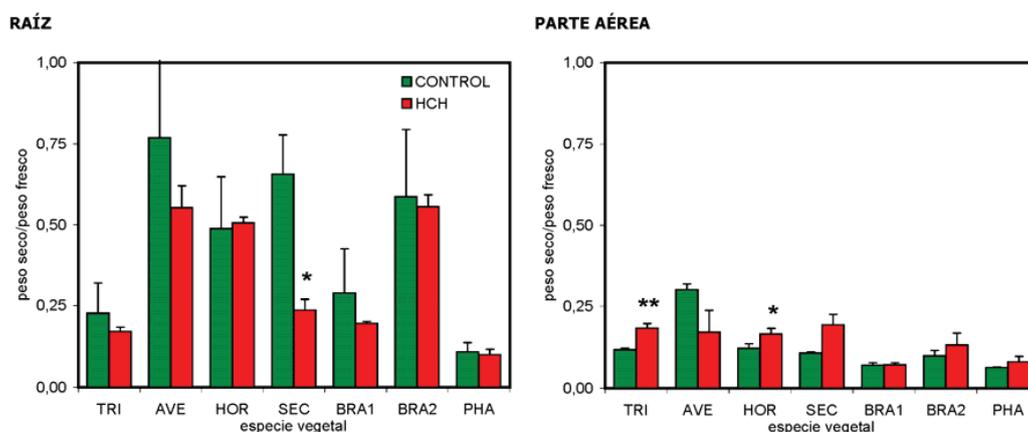
La Tabla 5.2 resume los resultados del incremento total de biomasa ( $\text{mg planta}^{-1}$ , peso seco) producido en los tratamientos CONTROL y HCH (biomasa total, raíces y parte aérea) Salvo *Lactuca*, en general, las macetas CONTROL muestran valores medios de biomasa total más elevados que las macetas HCH. En *Phaseolus* hay incluso un descenso de producción en las plantas sometidas a la presencia de HCH (descenso del crecimiento – crecimiento negativo). No obstante, dada la gran variabilidad, las diferencias no son estadísticamente significativas, salvo en el caso de *Secale* (CONTROL, valor medio  $24 \text{ mg planta}^{-1}$ ; HCH, valor medio  $17 \text{ mg planta}^{-1}$ ; diferencia significativa a  $P < 0.05$ ). En cuanto a los diferentes tejidos vegetales, cabe decir que la parte aérea muestra mayores diferencias entre los tratamientos aplicados que las raíces. De hecho, las raíces de *Brassica*, *Lactuca*, y *Daucus* muestran un aumento de producción de biomasa en las macetas HCH (p. ej., *Lactuca*: CONTROL, valor medio  $0.5 \text{ mg planta}^{-1}$ ; HCH, valor medio  $0.8 \text{ mg planta}^{-1}$ ; diferencia no significativa a  $P < 0.05$ ; Tabla 5.2). Con respecto a la parte aérea, la tendencia general es que las plantas del tratamiento HCH muestren un descenso generalizado en la acumulación de biomasa seca. La única especie en la que las diferencias encontradas son significativas es *Secale*, que siempre presenta un valor de biomasa seca significativamente mayor (a  $P < 0.05$ ) en CONTROL (media:  $20 \text{ mg planta}^{-1}$ ) respecto a HCH (media:  $16 \text{ mg planta}^{-1}$ ) (Tabla 5.2).

## Evaluación inicial de la toxicidad del hexaclorociclohexano en plantas

**Tabla 5.2.** Incremento total de biomasa ( $\text{mg planta}^{-1}$ , peso seco; valor medio, n varía entre 2 y 6) durante el experimento, teniendo en cuenta toda la planta (Total), y los tejidos considerados (Raíz y Parte aérea), en función del tratamiento aplicado (CONTROL y HCH). TRI es *Triticum aestivum* L.; AVE es *Avena sativa* L.; HOR es *Hordeum vulgare* L.; SEC es *Secale cereale* L.; BRA1 y BRA2 son las dos variedades de *Brassica sp.*; PHA es *Phaseolus vulgaris* L.; LAB es *Lactuca sativa* L.; DAU es *Daucus carota* L.

	Total		Raíz				Parte aérea					
	CONTROL		HCH		CONTROL		HCH		CONTROL		HCH	
Especie	media	d.s. <sup>1</sup>	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
TRI	48.9 ± 19.6		33.3 ± 5.3		7.4 ± 5.7		5.0 ± 1.7		41.5 ± 14.1		28.3 ± 3.7	
AVE	16.4 ± 6.5		13.6 ± 1.9		3.0 ± 1.2		2.6 ± 0.8		13.4 ± 5.7		11.0 ± 1.3	
HOR	18.4 ± 5.2		14.0 ± 3.6		1.4 ± 1.0		0.5 ± 0.6		17.0 ± 4.6		13.5 ± 3.2	
SEC	23.6 ± 4.2		17.5 ± 3.8	*	3.4 ± 1.1		1.8 ± 0.6	*	20.2 ± 3.4		15.7 ± 3.4	*
BRA1	14.0 ± 4.3		13.6 ± 4.0		1.3 ± 0.2		1.6 ± 0.6		12.6 ± 4.1		12.0 ± 3.4	
BRA2	32.1 ± 9.6		24.1 ± 7.2		4.4 ± 1.4		3.4 ± 0.5		27.6 ± 8.3		20.7 ± 6.8	
PHA	6.2 ± 17.3		-3.5 ± 23.5		-4.0 ± 1.5		-3.2 ± 4.5		10.2 ± 16.1		-0.3 ± 19.0	
LAB	1.8 ± 0.9		3.0 ± 0.4		0.5 ± 0.2		0.8 ± 0.1	*	1.4 ± 0.9		2.2 ± 0.3	
DAU	4.4 ± 0.8		4.0 ± -		0.5 ± 0.2		0.9 ± -		3.9 ± 0.5		3.1 ± -	

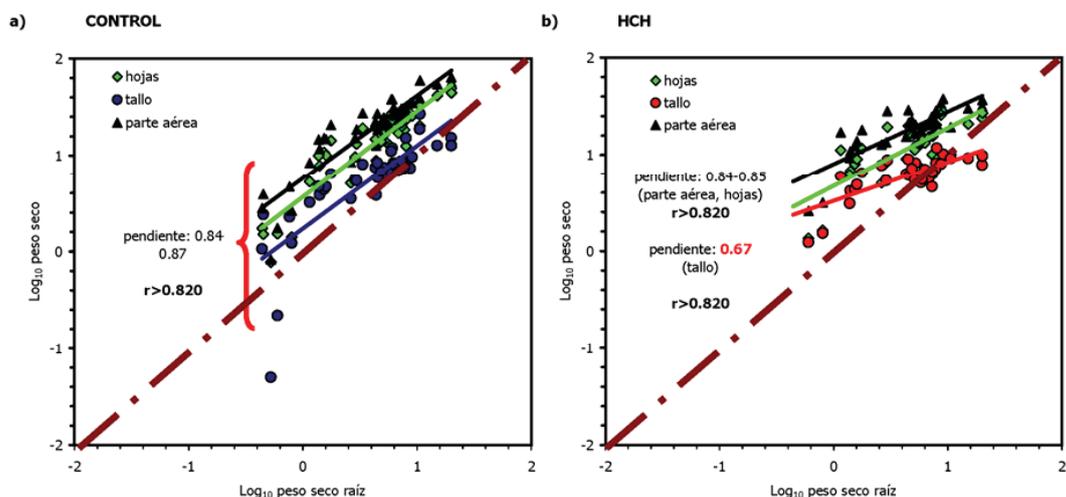
<sup>1</sup> desviación estándar; \* diferencia CONTROL-HCH significativa a  $P < 0.05$ .



**Figura 5.4.** Variación del cociente peso seco/peso fresco en las especies vegetales consideradas. \* diferencia significativa a  $P < 0.05$ ; \*\* diferencia significativa a  $P < 0.001$ . TRI es *Triticum aestivum* L.; AVE es *Avena sativa* L.; HOR es *Hordeum vulgare* L.; SEC es *Secale cereale* L.; BRA1 y BRA2 son las dos variedades de *Brassica sp.*; PHA es *Phaseolus vulgaris* L.

Por otro lado, los distintos tejidos vegetales muestran tendencias particulares en el cociente biomasa seca/biomasa fresca. Por un lado, las raíces presentan valores del cociente peso seco/peso fresco altos. La tendencia general es al descenso del cociente en el tratamiento HCH (diferencia significativa a

$P < 0.001$  en *Secale cereale* L.; Figura 5.4). Por otro lado, en el caso de la parte aérea, este cociente es pequeño y tiende a aumentar ligeramente en el tratamiento CONTROL (Figura 5.4).



**Figura 5.5.** Relación entre biomasa seca raíz y los diferentes tejidos aéreos (hojas, tallos y parte aérea como hojas+tallos) para el conjunto de plantas utilizadas. a) tratamiento CONTROL; b) tratamiento HCH. Unidades:  $\text{mg planta}^{-1}$  ( $\text{Log}_{10}$ ).

En lo que respecta al **reparto relativo** de la biomasa seca entre los diferentes tejidos de las especies consideradas (raíz vs. tejidos aéreos), al representar el peso seco de la raíz frente al peso seco de los diferentes tejidos aéreos ( $\text{mg planta}^{-1}$ , escala logarítmica,  $\text{Log}_{10}$ ), se ven diferencias entre los tratamientos (Figura 5.5). En el tratamiento CONTROL, la relación raíz-hojas, raíz-tallo, y raíz-parte aérea es muy parecida (pendiente: 0.84-0.87;  $r > 0.820$ ; Figura 5.5a). No obstante, en el tratamiento HCH, existen diferencias. Por un lado, la reparto raíz-hojas es similar a la relación raíz-parte aérea y ambas son del mismo orden que lo observado en el tratamiento CONTROL (pendiente: 0.84-0.85;  $r > 0.820$ ; Figura 5.5b). Por otro lado, la relación raíz-tallo es claramente diferente, ya que el ajuste de la recta es distinto (pendiente: 0.67;  $r > 0.820$ ; Figura 5.5b).

### 5.3.5. Uso eficiente del agua transpirada

En la Tabla 5.3 se resumen los resultados obtenidos en este ensayo con respecto a la Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua (EPUA;  $\text{mg peso fresco g agua}^{-1}$ ). Las especies vegetales tienen unos valores medios de EPUA que oscilan entre 10.5 y 0.6  $\text{mg peso fresco g agua}^{-1}$ , en función de la especie considerada. En general, la EPUA desciende en el tratamiento HCH. En el caso de *Avena*, y las dos especies de *Brassica*, no hay diferencia de los valores de EPUA entre CONTROL y HCH. En los casos de *Triticum* ( $\text{EPUA}_{\text{CONTROL}}$ : 10.6;  $\text{EPUA}_{\text{HCH}}$ : 5  $\text{mg peso fresco g agua}^{-1}$ ; valores medios), *Hordeum* ( $\text{EPUA}_{\text{CONTROL}}$ : 6;  $\text{EPUA}_{\text{HCH}}$ : 2.7  $\text{mg peso fresco g agua}^{-1}$ ; valores medios) y *Lactuca*, ( $\text{EPUA}_{\text{CONTROL}}$ : 0.9;  $\text{EPUA}_{\text{HCH}}$ : 0.3  $\text{mg peso fresco g agua}^{-1}$ ; valores medios) la diferencia de los valores medios entre los dos tratamientos es significativa a  $P < 0.05$  (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3.** Valores de la Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua (EPUA; mg peso fresco g agua<sup>-1</sup>; media±desviación estándar) para cada una de las especies utilizadas en este experimento, comparando ambos tratamientos. TRI es *Triticum aestivum* L.; AVE es *Avena sativa* L.; HOR es *Hordeum vulgare* L.; SEC es *Secale cereale* L.; BRA1 y BRA2 son las dos variedades de *Brassica sp.*; PHA es *Phaseolus vulgaris* L.; LAB es *Lactuca sativa* L.; DAU es *Daucus carota* L.

Especie	CONTROL		HCH	
	media	d. s. <sup>1</sup>	media	d. s.
<b>TRI</b>	10,55 ±	1,29	5,05 ±	0,62 **
<b>AVE</b>	2,12 ±	1,08	2,26 ±	0,86
<b>HOR</b>	6,34 ±	1,63	2,73 ±	0,80 *
<b>SEC</b>	3,90 ±	0,64	1,56 ±	0,14
<b>BRA1</b>	6,19 ±	1,74	6,31 ±	2,04
<b>BRA2</b>	5,37 ±	1,61	5,42 ±	0,28
<b>PHA</b>	7,60 ±	3,08	5,09 ±	3,88
<b>LAB</b>	0,92 ±	0,10	0,32 ±	0,08 **
<b>DAU</b>	0,63 ±	0,41	0,21 ±	0,09

<sup>1</sup> d. s. desviación estándar; \* diferencia CONTROL-HCH significativa a P<0.05; \*\* diferencia CONTROL-HCH significativa a P<0.001

## 5.4. DISCUSIÓN

### 5.4.1. Evaluación inicial de la toxicidad

Todas las especies vegetales utilizadas en este experimento han mostrado algún signo de **estrés**, que generalmente se puede relacionar con la presencia del HCH en la disolución acuosa. No obstante, al contaminar la disolución, el pH se modificó ligeramente. En todo caso, la tendencia de las plantas parece ser a acidificar ligeramente las soluciones nutritivas en ambos tipos de reactores, como resultado de su actividad fisiológica; la exudación de ácidos orgánicos es habitual en las plantas, sobre todo en situaciones de estrés provocadas por déficit de nutrientes esenciales (Ramírez-Rodríguez y col., 2005). En este caso, la respuesta sería similar. Las diferencias encontradas en este estudio no se pueden explicar únicamente por la influencia del HCH en el pH de la disolución nutriente ya que éste no sube de un valor de 7.

La inspección visual de los reactores indicaba que, en general, la presencia de HCH provoca un desarrollo anormal de las plántulas, aumentando la proporción de tejidos necróticos y reduciendo el número medio de hojas, ramas y raíces por planta en los reactores contaminados. Por otro lado, el aspecto externo de las raíces denota un desarrollo anormal en presencia de HCH, indicando que la actividad fisiológica de los tejidos ha sido alterada. La disposición (“**arquitectura**”) de las raíces se ha visto afectada, lo que puede tener consecuencias en la nutrición futura del vegetal completo y depende, además, del tipo de planta que se considere (monocotiledónea o dicotiledónea). En este sentido, las raíces de las plantas monocotiledóneas, *a priori*, parecen ser las más afectadas por el HCH en este experimento (Foto 5.2; Foto 5.3). Alteraciones morfológicas similares han sido descritas en disolución hidropónica contaminada con otros pesticidas en diversas especies incluyendo *Gossypium hirsutum* L. y *Allium cepa* L. (Bayer y col,

1967). La plasticidad de la arquitectura del sistema radical es muy grande, dependiendo de las condiciones del medio y de la presencia o no de contaminantes; puede estar relacionada con un desequilibrio en la regulación de las fitohormonas (Osmont y col., 2007). Cabe decir que el aspecto externo de algunas raíces recuerda al de las raíces proteoides ("cluster") de algunas plantas (Skene, 1998). Esta modificación de la morfología podría ser considerada como una adaptación, en respuesta a un ambiente tóxico, cuya finalidad es proporcionar tanto una mayor superficie de absorción como una actividad bioquímica diferente, facilitando de este modo la adquisición de nutrientes (Watt y Evans, 1999, Skene, 2000).

En este experimento, la transpiración de las plantas en situación de contaminación no parece seguir un patrón común, dependiendo en gran medida de la especie vegetal que se considere. La **transpiración absoluta** denota dos tipos de respuestas: por un lado un descenso de la transpiración causado por el estrés que supone la presencia del HCH (*Brassica sp.*); por otro lado, algunas plantas han visto como dicha transpiración aumentaba de modo notable (*Hordeum* y *Daucus*). Otros estudios han encontrado que un descenso de la transpiración se relaciona con la toxicidad de numerosos contaminantes en disolución acuosa (MTBE, TNT, nitrobenzeno, PAHs), tanto para plantas herbáceas (*Glycine max* L., *Hordeum vulgare* L., *Lactuca sativa* L.) como para árboles (*Populus* sp., *Salix* sp.) (Mc Farlane y col., 1990; Thompson y col., 1998; Rubin y Ramaswami, 2001; Thygesen y Trapp, 2002). La respuesta general de las plantas analizadas en estos trabajos es una reducción significativa de la transpiración absoluta tanto en condiciones de laboratorio como de campo. Por otro lado, la tendencia al aumento de la transpiración se puede relacionar con la necesidad de satisfacer la demanda de disponibilidad de agua durante el período de crecimiento de las plántulas, para acompañar la construcción de nuevos tejidos vegetales (Larcher, 2003).

El uso de la **Transpiración Relativa Normalizada** (TRN) en estudios ambientales es muy reciente. Trapp y sus colaboradores han desarrollado este método de evaluación de la toxicidad en una serie de publicaciones (Trapp y col., 2000, 2001; Trapp y Christiansen, 2003; Ucisik y col., 2007). Estos trabajos investigan el efecto de contaminantes orgánicos (diclorofenol, derivados de la gasolina) en árboles del género *Salix*, tanto en suelos como en condiciones de cultivo en disoluciones nutritivas. En todos los casos, la variable TRN se ha demostrado como eficaz a la hora de evaluar la toxicidad de la contaminación en las plantas creciendo en sustratos (sólidos o líquidos) contaminados. En lo que respecta a este experimento, si se considera la Transpiración Relativa, se pueden distinguir dos grupos de plantas en función de su respuesta ante la presencia del HCH. Por una parte, hay especies **tolerantes**, que no ven reducida la transpiración relativa por causa del HCH (*Triticum*, *Brassica* variedad 1, *Phaseolus*). El resto de plantas, en especial el resto de monocotiledóneas (*Avena*, *Hordeum*, *Secale*), ve reducida la transpiración relativa con el paso del tiempo de contaminación, siendo por ello especies más **sensibles** a la contaminación por HCH. Es destacable el hecho de que *Daucus* presenta la peor respuesta, en general, en todos los parámetros analizados, descartándose como planta adecuada para llevar a cabo descontaminación de suelos afectados por HCH.

En la actualidad no se conocen estudios que consideren la toxicidad del HCH utilizando la transpiración y la transpiración relativa como herramientas para evaluar la respuesta de las especies vegetales a este contaminante ni en disolución ni en otro tipo de sustrato. Los trabajos que consideran la posible toxicidad del HCH en disolución son escasos y poco concluyentes al utilizar un número bajo de especies vegetales (Hulzebos y col., 1993; Marcacci, 2004). Generalmente el efecto tóxico se relaciona con

el isómero  $\gamma$ -HCH. No obstante, este experimento permite diferenciar el grado de tolerancia/toxicidad de diferentes especies sometidas a condiciones de contaminación iguales, detectando asimismo efectos negativos derivados de la presencia del HCH en varias de las plantas utilizadas. No obstante, no conviene utilizar únicamente estas variables para estudiar la tolerancia/toxicidad del HCH en la vegetación. Es conveniente no olvidar que la fotosíntesis y la transpiración, y con ello la transpiración y el crecimiento, están estrechamente relacionados (Fitter y Hay, 2002). Otros síntomas de **toxicidad** encontrados en la mayoría de las especies vegetales son síntomas como clorosis, necrosis, o marchitamiento de las hojas, que indican interferencias en la fotosíntesis y el transporte de agua (Medina y col., 2003).

#### 5.4.2. Alteraciones del crecimiento de las plantas

El **tamaño** de las raíces y los tallos de las plantas utilizadas en este estudio se vieron afectados en gran medida por la presencia del HCH. Este parámetro ha sido utilizado para la evaluación de la fitotoxicidad tanto en condiciones de crecimiento en suelo como de crecimiento en disolución nutriente (Dalvi y col., 1972; Gadallah, 1996). El hecho de que los dos grupos que se pueden establecer se correspondan con las plantas monocotiledóneas, por un lado, y las dicotiledóneas, por el otro, incide en que el tipo de planta tiene influencia a la hora de considerar la respuesta en situaciones de toxicidad. Las dicotiledóneas muestran una tolerancia relativa mayor dado que su crecimiento inicial no se ve impedido, como ocurre en el caso de las monocotiledóneas. La longitud de las raíces es fundamental a la hora de considerar las posibilidades de nutrición de las plantas, pues facilitan la exploración del sustrato, así como el sostén de todo el vegetal en los suelos. Estas características, además, son especialmente adecuadas para la fitocorrección, al maximizar la capacidad de explotación del sustrato.

La **acumulación** de biomasa seca total al finalizar el experimento no se ve reducida de un modo significativo. Esto indica que las plantas son capaces de crecer y desarrollarse en la disolución contaminada, si bien la tasa de crecimiento se ve ralentizada (es decir, las plantas poseen cierto grado de **tolerancia**). Las diferencias, no obstante, se aprecian en la acumulación de biomasa seca frente a biomasa fresca. Los distintos tejidos muestran tendencias opuestas. En condiciones de estrés las plantas necesitan mantener su contenido hídrico, de lo que nos informa el cociente peso seco/peso fresco (Huang y col., 2004). Las plantas monocotiledóneas utilizadas en este estudio tienden a presentar un incremento de dicho cociente en los tejidos aéreos, reduciéndose la capacidad fotosintética. En las plantas dicotiledóneas, generalmente más resistentes, el aumento de la proporción de biomasa estructural es más moderado. En las raíces, la tendencia es la contraria, primando la acumulación de biomasa fresca para facilitar la adquisición de nutrientes (nuevas raíces, pero más pequeñas y gruesas).

En lo que respecta al **reparto** de biomasa seca entre los diferentes tejidos vegetales, se han establecido ecuaciones que resumen las interrelaciones entre los tejidos vegetales (Figura 5). La pendiente, en este tipo de ajustes, se interpreta como el cociente entre las tasas de crecimiento de los tejidos implicados (Fitter y Hay, 2002). Un valor teórico de 1 indica que el cociente de las tasas de crecimiento es constante; en caso contrario (pendiente  $\neq 1$ ) el cociente de peso de la raíz (root weight ratio, RWR=peso raíz:peso planta;  $g\ g^{-1}$ ) cambiará con el tiempo a medida que la planta crezca (Evans, 1972; Farrar y Gunn, 1998). Si la pendiente es inferior a 1, la tendencia será que el cociente RWR aumente con el tiempo, facilitando la acumulación progresiva de biomasa seca en la raíz. En este estudio, esta es la tendencia que

se ha encontrado en el tratamiento CONTROL (pendiente: 0.84-0.87). No obstante, esto es más acusado en el tratamiento HCH, que acentúa la tendencia a la acumulación de biomasa seca en la raíz (pendiente: 0.67), descompensando así el crecimiento de la parte aérea, especialmente, el tallo. Esto implica un descenso de la calidad de los tejidos de sostén para la parte aérea de la planta, lo que con el tiempo afecta a la fotosíntesis y al desarrollo normal del vegetal. No obstante, en este estudio no se han podido detectar diferencias entre las especies analizadas.

La Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua, **EPUA**, finalmente, incide en todo esto. Los resultados obtenidos en este estudio indican que el HCH genera un estrés a las plantas de *Triticum*, *Hordeum* y *Lactuca*. Las plantas más **sensibles** reducen la EPUA en presencia del HCH, primando el transporte de agua frente a la fijación de carbono. El descenso en este parámetro puede ser debido al marchitamiento de las hojas. La EPUA permite examinar como se mantiene la regulación de la transpiración (apertura de estomas) y la adquisición del CO<sub>2</sub> (intercambio de gases), necesario para la fotosíntesis, es decir, el compromiso de optimización de recursos en las plantas entre el uso del agua y la fijación de carbono, integrando la aumento acumulativo de materia seca y el consumo de agua durante largos períodos. La cantidad de C fijado puede disminuir en función de las necesidades hídricas de la planta. Este parámetro se reduce en situaciones de estrés, pudiendo ser utilizado como un indicador de estrés químico (Larcher, 2003; Trapp y col., 2000).

### 5.4.3. Especies tolerantes y especies sensibles

Las especies utilizadas en este experimento están sometidas a un **estrés** de tipo químico provocado por la presencia del HCH, que se puede considerar como fitotóxica (**respuesta sensible**). En general la supervivencia no se ve afectada, si bien la toxicidad es acumulativa, actuando en una escala de tiempo mayor (efectos subletales, Newman y Unger, 2003). El crecimiento se ve alterado, reduciendo la elongación de tallos y raíces y retrasando el desarrollo óptimo al disminuir la distribución de la biomasa seca producida durante las primeras semanas, así como el uso eficaz del agua. Las plantas más sensibles encontradas en este estudio son *Secale cereale* L., *Lactuca* sp., y *Daucus carota* L. En este sentido, es necesario tener en cuenta que este experimento no considera la posible toxicidad del contaminante sobre la germinación, para lo cual son necesarios estudios en sustrato natural (suelos) o artificial. No obstante, efectos negativos a diferentes niveles han sido descritos en estudios que analizan la contaminación del HCH en suelos y su impacto sobre las plantas (Selim y col., 1970; Bidlan y col., 2004). Estos trabajos demuestran que el HCH (fundamentalmente el isómero gamma) puede tener un impacto negativo en las plantas, claramente tóxico, inhibiendo el crecimiento. Se han detectado problemas a nivel fisiológico (desajuste de la respiración y fotosíntesis) e incluso molecular (alteraciones del ADN). Si bien los resultados obtenidos en suelos no se pueden extrapolar a condiciones de cultivo hidropónico, es factible que el HCH afecte de modo similar a las plantas estudiadas, si bien el nivel de contaminación es bajo, el tiempo de ensayo es corto y el crecimiento de las plantas se ve favorecido por la solución nutritiva. Asimismo, a pesar del aislamiento de la parte aérea y de las raíces, es posible que hubiese una leve pérdida de HCH por hidrólisis, evaporación, y adsorción sobre las superficies celulares de las raíces, disminuyendo de este modo la concentración del contaminante (Marcacci, 2004).

Por otro lado, hay que destacar que algunas de estas especies, presentan cierta "resistencia" al HCH (**respuesta tolerante**). Ésta se caracteriza por una menor acumulación de biomasa seca, una transpiración relativa superior a 1 favoreciendo el crecimiento, lo que se traduce en una fotosíntesis, en definitiva, no tan afectada. Son especies vegetales capaces de soportar las condiciones negativas que el HCH provoca al modificar la respuesta fisiológica de las plantas. Y con el tiempo, es posible que puedan recuperar las condiciones óptimas, adquiriendo **resistencia** (Larcher, 2003; Medina y col., 2003). En esta situación se encuentran, fundamentalmente, *Avena sativa* L., *Brassica* sp., y *Phaseolus vulgaris* L.

## 5.5. CONCLUSIONES

Este estudio ha encontrado que, en general, el crecimiento de las plantas en condiciones de crecimiento en disolución nutriente se ve afectado por la presencia de HCH (especialmente  $\gamma$ -HCH), a pesar de las relativamente bajas concentraciones utilizadas ( $\alpha$ , 1.6,  $\beta$ , 0.32,  $\gamma$ , 1.8 y  $\delta$ , 0.7 mg L<sup>-1</sup>). El vigor de todas las especies se ha visto reducido, llevando a una menor supervivencia y a un descenso de productividad en muchas de las plantas. Dos variables clave a la hora de evaluar la toxicidad y el estrés producido por el HCH han sido la Transpiración Relativa Normalizada y la Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua. Asimismo, si bien la producción neta de biomasa no parece muy afectada, el reparto de la misma se ve alterado por la presencia del HCH. La respuesta común de todas las plantas es favorecer la acumulación de biomasa seca en las raíces para superar la situación de estrés, con lo que los tejidos aéreos se ven afectados, disminuyendo a largo plazo la fotosíntesis.

En conjunto, este experimento ha permitido una selección provisional de especies vegetales aptas para futuros ensayos de fitocorrección de suelos contaminados con HCH. Si bien todas las plantas se ven estresadas de alguna manera, en el caso de *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., *Avena sativa* L., *Brassica* sp., y *Phaseolus vulgaris* L. este efecto es menos aparente. Asimismo, estas plantas son generalmente muy productivas, de elevada tasa de germinación y muy extendidas. Son necesarios nuevos ensayos en suelo contaminado para completar la selección de especies, dado que las condiciones en hidropónico son muy diferentes a situaciones reales de campo. Asimismo, habría que saber si el HCH es absorbido por las plantas.

## 5.5. BIBLIOGRAFÍA

- Bayer, D. E, C. L. Foy, T. E. Mallory y E. G. Cutter. 1967. Morphological and histological effects of trifluralin on root development. *American Journal of Botany*, 54: 945-952.
- Bidlan, R., M. Afsar y H. K. Manonmani. 2004. Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere*, 56: 803-811.
- Breivik, K., J. M. Pacyna y J. Munch. 1999. Use of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996. *The Science of the Total Environment*, 239: 151-163.
- Calvelo Pereira, R., M. Camps-Arbestain, B. Rodríguez Garrido, F. Macías y C. Monterroso. 2006. Behaviour of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environmental Pollution*, 144: 210-217.
- Calvelo Pereira, R., C. Monterroso, F. Macías y M. Camps-Arbestain. 2007. 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*, (2007), doi:10.1016/j.envpol.2007.11.009
- Campanella, B. y D. Pertin. 1997. Évaluation de la toxicité de l'anthracène sur les végétaux. mise au point de deux tests biologiques visant à mesurer l'absorption de l'anthracène par des racines transformées de *Calystegia sepium* (L.) Brown et *Medicago sativa* L. *Biotechnologie, Agronomie, Société et*

- Environnement, 1: 257-263.
- Concha-Graña, E. 2004. Desarrollo de métodos de análisis de pesticidas organoclorados en matrices ambientales. Tesis Doctoral. Universidad de A Coruña
- Courdouan, A., S. Marcacci, S. Gupta y J. P. Schwitzguébel. 2004. Lindane and technical HCH residues in Indian soils and sediments: a critical appraisal. *Journal of Soils and Sediments*, 4: 192-196.
- Dalvi, R. R., B. Singh y D. K. Salunkhe. 1972. Influence of selected pesticides on germination and associated metabolic changes in wheat and mung bean seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20: 1000-1003.
- Evans, G. C. 1972. *The Quantitative Analysis of Plant Growth*. Blackwell Scientific. Oxford.
- Farrar, J. y S. Gunn. 1998. Allocation: allometry, acclimation and alchemy? En: Lambers, H., Poorter, H. y Van Vuren, M. M. I. (Eds.), *Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences*. Backhuys Publishers. Leiden. Págs. 183-198.
- Fitter, A. H. y R. Hay. 2002. *Environmental physiology of plants*. Academic Press. San Diego.
- Fletcher, J. S., F. L. Johnson y J. C. McFarlane. 1988. Database assessment of phytotoxicity data published on terrestrial vascular plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7: 615-622.
- Gadallah, M. A. A. 1996. Phytotoxic effects of industrial and sewage waste waters on growth, chlorophyll content, transpiration rate and relative water content of potted sunflower plants. *Water, Air, & Soil Pollution*, 89: 33-47.
- Gong, J., K. C. Chan y S. W. Chiu. 2006. Toxicities of DDE on wheat and bioremediation of DDE by fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Human and Ecological Risk Assessment*, 12: 221 - 235.
- Hopkins, H. T. 1952. Inhibition of growth by Benzene Hexachloride isomers and protective effect of glucose as measured by cell counting technique. *Plant Physiology*, 27: 526-540.
- Huang, X.-D., Y. El-Alawi, D. M. Penrose, B. R. Glick y B. M. Greenberg. 2004. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution*, 130: 453-463.
- Hulzebos, E. M., D. M. M. Adema, E. M. Dirven-Van Breemen, L. Henzen, W. A. Van Dis, H. A. Herbold, J. A. Hoekstra, R. Baerselman y C. A. M. Van Gestel. 1993. Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 1079-1094.
- Kidd, P. S., J. Díez y C. Monterroso Martínez. 2004. Tolerance and bioaccumulation of heavy metals in five populations of *Cistus ladanifer* L. subsp. *ladanifer*. *Plant and Soil*, 258: 189-205.
- Kidd, P., A. Prieto-Fernández, C. Monterroso y M. Acea. 2008. Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil*, 302: 233-247.
- Lambers, H., H. Poorter y M. M. I. Van Vuren. 1998. *Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences*. Backhuys Publishers. Leiden.
- Larcher, W. 2003. *Physiological plant ecology*. Springer. Berlin.
- Li, H., G. Sheng, W. Sheng y O. Xu. 2002. Uptake of trifluralin and lindane from water by ryegrass. *Chemosphere*, 48: 335-341.
- Lichtenthaler, H. K. 1998. The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851: 187-198.
- Mackenzie, K., J. Battke y F. D. Kopinke. 2005. Catalytic effects of activated carbon on hydrolysis reactions of chlorinated organic compounds: Part 1.  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *Catalysis Today*, 102-103: 148-153.
- Mackova, M., D. N. Dowling y T. Macek. 2006. *Phytoremediation and rhizoremediation: Theoretical background*. Springer. Doordrecht.
- Manz, M., K. D. Wenzel, U. Dietze y G. Schuurmann. 2001. Persistent organic pollutants in agricultural soils of central Germany. *The Science of the Total Environment*, 277: 187-198.
- Marcacci, S. 2004. A phytoremediation approach to remove pesticides (atrazine and lindane) from contaminated environment. Tesis Doctoral. École Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- Marcacci, S., M. Raveton, P. Ravanel y J.-P. Schwitzguébel. 2006. Conjugation of atrazine in vetiver (*Chrysopogon zizanioides* Nash) grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany*, 56: 205-215.
- Mc Farlane, C., T. Pflieger y J. Fletcher. 1990. Effect, uptake and disposition of nitrobenzene in several terrestrial plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9: 513-520.
- Medina, V. F., M. Marmiroli, E. Maestri, A. C. Dietz y S. C. McCutcheon. 2003. Plant tolerances to contaminants. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L., (Eds.), *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants*. Wiley Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 189-232.
- Newman, M. C. y M. A. Unger. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. CRC Press. Boca Raton.
- Ngabe, B., T. F. Bidleman y R. L. Falconer. 1993. Base hydrolysis of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexanes. *Environmental Science and Technology*, 27: 1930-1933.
- Orchard, B. J., W. J. Doucette, J. K. Chard y B. Bugbee. 2000. A novel laboratory system for determining fate of volatile organic compounds in planted systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 888-894.
- Osmont, K. S., R. Sibout y C. S. Hardtke. 2007. Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 93-113.
- Ramírez-Rodríguez, V., J. López Bucio y L. Herrera Estrella. 2005. Adaptive responses in plants to nonoptimal soil pH. En: Jenks, M. A. y Hasegawa, P. M. (Eds.), *Plant abiotic stress*. Blackwell Publishing. Oxford. Págs. 145-170.

- Rosen, A. A. y H. F. Kraybill. 1966. Organic pesticide in the environment. American Chemical Society. Washington, D.C.
- Rubin, E. y A. Ramaswami. 2001. The potential for phytoremediation of MTBE. *Water Research*, 35: 1348-1353.
- Selim, K., S. Mahmoud y M. El-Mokadem. 1970. Effect of dieldrin and lindane on the growth and nodulation of *Vicia faba*. *Plant and Soil*, 33: 325-329.
- Siddique, T., B. C. Okeke, M. Arshad y W. T. Frankenberger. 2002. Temperature and pH effects on biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in water and a soil slurry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5070-5076.
- Skene, K. R. 1998. Cluster roots: some ecological considerations. *Journal of Ecology*, 86: 1060-1064.
- Skene, K. R. 2000. Pattern formation in cluster roots: some developmental and evolutionary considerations. *Annals of Botany*, 85: 901-908.
- Thompson, P. L., L. A. Ramer, A. P. Guffey y J. L. Schnoor. 1998. Decreased transpiration in poplar trees exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 902-906.
- Thygesen, R. S. y S. Trapp. 2002. Phytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to willow trees. *Journal of Soils and Sediments*, 2: 77-82.
- Trapp, S. y H. Christiansen. 2003. Phytoremediation of cyanide-polluted soils. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L. (Eds.), *Phytoremediation: Transformation and control of contaminants*. Wiley-Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 829-862.
- Trapp, S., K. C. Zambrano, K. O. Kusk y U. Karlson. 2000. A phytotoxicity test using transpiration of willows. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39: 154-160.
- Trapp, S., A. Köhler, L. C. Larsen, K. C. Zambrano y U. Karlson. 2001. Phytotoxicity of fresh and weathered diesel and gasoline to willow and poplar trees. *Journal of Soils and Sediments*, 1: 71-76.
- Turnbull, A. 1996. Chlorinated pesticides. *Issues in Environmental Science and Technology*, 113-135.
- Ucisik, A. S., S. Trapp y K. O. Kusk. 2007. Uptake, accumulation, phytotoxicity, and removal of 2,4-dichlorophenol in willow trees. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 1165-1171.
- USC. 2003. Evaluación y bioremediación de suelos contaminados con isómeros de HCH en el Polígono de Torneiros, Porriño (Pontevedra). Informe Final de Proyecto. Universidad de Santiago de Compostela.
- Vijgen, J. 2006. The legacy of lindane HCH isomer production. International HCH and Pesticides Association. URL: <http://www.ihpa.info/docs/library/Lindane%20Main%20Report%20DEF20JAN06.pdf>.
- Vose, J. M., G. J. Harvey, K. J. Elliott y B. D. Clinton. 2003. Measuring and modelling tree and stand level transpiration. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L. (Eds.), *Phytoremediation: Transformation and control of contaminants*. Wiley-Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 263-282.
- Watt, M. y J. R. Evans. 1999. Proteoid roots. *Physiology and development*. *Plant Physiology*, 121: 317-323.
- WHO, World Health Organization. 1991. Lindane. *Environmental Health Criteria* 124. Ginebra.
- Willett, K. L., E. M. Ulrich y R. A. Hites. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science and Technology*, 32: 2197-2207.



## **CAPÍTULO 6**

**Efecto de un suelo contaminado con hexaclorociclohexano en la germinación y el desarrollo inicial de diferentes especies vegetales**

Este trabajo ha sido presentado, parcialmente:

Calvelo Pereira, R., Macías, F, Monterroso, M. C. Soil-based phytotoxicity of hexachlorocyclohexane isomers to terrestrial higher plants. International Workshop "Fate and Impact of Persistent Pollutants in Agroecosystems" IUNG, Pulawy, POLONIA. 10-12 Marzo 2005. POSTER.

RESUMEN	pág. 163
6.1. INTRODUCCIÓN	164
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	166
6.2.1. Suelo experimental; contaminación	166
6.2.2. Especies vegetales	166
6.2.3. Condiciones experimentales	167
6.2.4. Toma de muestras	167
6.2.5. Análisis de datos	168
6.2.6. Estadística	168
6.3. RESULTADOS	170
6.3.1. Germinación acumulada	170
6.3.2. Tasa de germinación	172
6.3.3. Supervivencia	174
6.3.4. Crecimiento y desarrollo inicial	175
6.3.5. Producción y reparto de biomasa	178
6.3.6. Análisis de ecotoxicidad: regresión	179
6.4. DISCUSIÓN	181
6.4.1. Efectos sobre la germinación y supervivencia	181
6.4.2. Efectos sobre el crecimiento y desarrollo tempranos: morfología	182
6.4.3. Efectos subletales del HCH: biomasa	182
6.4.4. Toxicidad del HCH	183
6.5. CONCLUSIONES	186
6.6. BIBLIOGRAFÍA	186

## RESUMEN

Este trabajo se centra en la descripción de un experimento en condiciones controladas de germinación y crecimiento en un suelo contaminado con una mezcla heterogénea (hasta 8 niveles de contaminación creciente) de los isómeros principales de HCH ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH). 9 especies vegetales de interés económico y/o agrícola se han utilizado para continuar con la evaluación de plantas candidatas a ser empleadas en ensayos de fitocorrección. Los resultados de este experimento han puesto de manifiesto diferencias entre el tratamiento CONTROL y los diversos tratamientos con HCH. La germinación no se ve tan afectada como otros parámetros como la tasa de germinación o el vigor de las plántulas. En general, todas las especies vegetales muestran signos de estrés, si bien en grados diferentes. Por otro lado, el HCH es fitotóxico para algunas plantas (*Triticum aestivum* L. y *Solanum nigrum* L.). Algunas especies utilizadas en este experimento (*Hordeum vulgare* L., *Brassica* sp., *Phaseolus vulgaris* L.) son capaces de mitigar los efectos negativos del HCH, adquiriendo cierta resistencia, ya que la producción de biomasa no se ve muy

afectada. Estas plantas (tolerantes), serían, *a priori*, idóneas para su utilización en fitocorrección. Los resultados de este experimento en suelo son complementarios con los obtenidos en el ensayo de crecimiento en disolución nutriente contaminada (Capítulo 5).

### 6.1. INTRODUCCIÓN

La preocupación de los organismos internacionales sobre los problemas derivados de los compuestos orgánicos ha llevado a establecer una lista de Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs), susceptibles de ser regulados estrictamente según el Protocolo de Aarhus sobre contaminación, así como por la normativa de la Unión Europea (UNECE, 1998<sup>1</sup>; Reglamento 850/2004<sup>2</sup>). Los riesgos principales de estas sustancias son su notable bioacumulación en los organismos vivos - entrada en las redes tróficas - y su persistencia. Entre estos compuestos destaca el hexaclorociclohexano (1-,2-,3-,4-,5-,6-hexaclorociclohexano, HCH), un compuesto sintetizado en el laboratorio gracias a la cloración de moléculas de benceno en presencia de luz (Metcalf, 1955). Inicialmente se obtiene una mezcla heterogénea de los isómeros principales (especialmente  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, en cantidades variables), comercializada con el nombre de HCH técnico, rentable gracias a sus propiedades insecticidas (Amadori, 1993). En la década de 1940 se descubrió las propiedades insecticidas que presenta el  $\gamma$ -HCH, iniciándose su producción como insecticida de amplio espectro conocido como lindano (Vijgen, 2006). Tanto el lindano (99% de  $\gamma$ -HCH) como el HCH técnico se han utilizado durante décadas como insecticida en cultivos. El lindano, además, se ha comercializado como producto antiparásito e incluso se ha empleado para el tratamiento de la piel y/o en lucha contra piojos.

La naturaleza química del HCH lo convierte en un compuesto especialmente resistente a la degradación microbiana. Esto se debe a las propiedades fisicoquímicas de estas sustancias, pues poseen una baja solubilidad acuosa, así como una alta hidrofobicidad (Suntio y col., 1988). La utilización reiterada de estos compuestos a lo largo de más de cincuenta años ha producido una entrada incontrolada de sustancias de carácter xenobiótico en el medio, bien en forma de restos de productos comerciales o bien como residuos de la producción de éstos. El manejo y almacenamiento inadecuados de estos productos, así como el vertido de los residuos de modo incontrolado en lugares cercanos a los centros de producción, han supuesto una gran carga de contaminación para los diversos ambientes (suelos, aguas, vegetación) (Miglioranza y col., 1999; Vijgen, 2006).

La toxicidad del HCH sobre diversos organismos del suelo (insectos en especial) es conocida desde los primeros años de su utilización (tanto el HCH técnico como el lindano; Kostoff, 1948; Hoskins y col., 1952). Por otro lado, el HCH puede ser tóxico para los organismos del suelo, causando mortalidad, afectando el crecimiento y la actividad enzimática de la biota (en *Eisenia foetida*; Shi y col., 2007). Se han descrito efectos tóxicos del HCH (o, mas comúnmente, del  $\gamma$ -HCH) sobre la germinación y el desarrollo inicial de diferentes especies vegetales (Litchenstein y col., 1962; Salazar y Paulsen, 1971; Verma y Pillai, 1991). La toxicidad de los compuestos orgánicos puede causar que las plantas modifiquen la tasa de los

---

<sup>1</sup> UNECE, 1998. Protocolo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs). United Nations Economic Commission for Europe. Aarhus.

<sup>2</sup> Reglamento 850/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CE.

procesos vitales, desestabilizando a los individuos, afectando al desarrollo normal y a la fisiología (alterando los procesos celulares, la fotosíntesis, la distribución de biomasa, etc; (Audus, 1976; Wicczorek y Wicczorek, 2007).

La respuesta de las plantas depende de la duración e intensidad del factor negativo que provoca el daño, aunque también de la especie vegetal y el estado de desarrollo (Newman y Unger, 2003). Durante las fases iniciales de crecimiento, la respuesta al estrés implica una gran actividad de procesos de reparación. En plantas de mayor edad, dichos procesos se ralentizan, la eficiencia es menor y los daños post-estrés pueden ser irreversibles; la planta no tiene tanta capacidad para tender a la recuperación de su actividad normal (Potters y col., 2007). Las respuestas morfogénéticas de las plantas son parte de una estrategia general de aclimatación. En este sentido, la **tolerancia** a un contaminante orgánico puede relacionarse con un conjunto de respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que disminuyen la exposición al estrés, limitan el daño o facilitan la reparación de los sistemas afectados (Medina y col., 2003). Las respuestas de las plantas no son siempre las mismas, dependiendo del estado de desarrollo, del tiempo de exposición al contaminante, las concentraciones ensayadas y de la variabilidad de los factores fisicoquímicos del medio.

La correcta comprensión de la tolerancia y/o sensibilidad, así como el estrés que la vegetación puede manifestar en las zonas contaminadas, es importante al utilizar plantas en el control o tratamiento de residuos peligrosos: **fitocorrección** (Salt y col., 1998; Alkorta y Garbisu, 2001). Esta técnica puede ser utilizada para retirar, degradar o inmovilizar (retener) los residuos de HCH en los suelos contaminados a través de la actividad de plantas adecuadas (Mackova y col., 2006). La fitocorrección es favorecida por la actividad fisiológica de la planta, una vez que esta es capaz de resistir la situación de estrés y/o toxicidad provocada por la contaminación (White, 2000). La adición de nutrientes y enmiendas que corrigen deficiencias en los suelos contaminados son una ayuda para la fitocorrección. Asimismo, se requiere que las plantas utilizadas se desarrollen en condiciones óptimas en la zona contaminada; la viabilidad de las diferentes especies que se empleen es esencial. En el estudio de la viabilidad de las especies vegetales candidatas para ser utilizadas en fitocorrección, hay que considerar tanto parámetros cuantitativos (biomasa) como características cualitativas (desarrollo favorable o no de las raíces) (Merkl y col., 2005; Kechavarzi y col., 2007).

Actualmente no se conocen estudios que apliquen las técnicas de fitocorrección a la descontaminación de suelos afectados por el HCH; no obstante, recientemente, el estudio de las relaciones HCH-vegetación se ha desarrollado enormemente. Si bien el HCH afecta a la vegetación de las zonas contaminadas, las plantas no sólo sobreviven, sino que también son capaces de acumular los diferentes isómeros de HCH en sus tejidos (especialmente  $\beta$ -HCH en parte aérea y raíz) y favorecer su degradación en la rizosfera (Calvelo Pereira y col., 2006; Calvelo Pereira y col., 2007; Kidd y col., 2008). Estos y otros estudios (Barriada Pereira y col., 2005; Sainz y col., 2006) se han desarrollado debido a la existencia de una zona de gran contaminación por vertidos de residuos procedentes de la producción de lindano en O Porriño (Pontevedra).

El **objetivo** del presente estudio es la evaluación de la respuesta de germinación y crecimiento en las fases iniciales del desarrollo de diferentes especies vegetales en condiciones controladas (cámara de

crecimiento) en un suelo experimental contaminado con HCH. Para ello se ha diseñado un experimento en maceta, sometiendo a 9 especies vegetales de interés comercial a concentraciones crecientes de HCH total (suma de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH). El objetivo final es seleccionar las plantas más recomendables para la experimentación en futuros ensayos de fitocorrección en una zona de contaminación heterogénea.

### 6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 6.2.1. Suelo experimental; contaminación

En este ensayo se ha utilizado un suelo natural contaminado artificialmente en el laboratorio. El suelo procede del horizonte A de un Umbrisol Cámbico (IUSS Working Group WRB, 2006), recogido en el entorno de O Porriño (Pontevedra). Es un suelo ácido (pH: 4.8), con baja CIC y relativamente rico en materia orgánica (C: 6.3%; N: 0.21%; C/N: 30.3); la textura es franco arenosa. Para corregir la acidez se realizó un encalado previo al ensayo, equivalente a 5 t/ha., dosis frecuentemente utilizada en los suelos de cultivo de la zona. Este es el sustrato o **suelo experimental** que se ha utilizado para el resto de fases del ensayo en invernadero. Para la contaminación de este suelo, se ha utilizado el residuo de la fabricación del lindano recogido en la zona contaminada de O Porriño, cuya composición es:  $\alpha$ -HCH, 77%,  $\beta$ -HCH, 16%,  $\gamma$ -HCH, 5%, y  $\delta$ -HCH, 2% (Calvelo Pereira y col, 2006). Se procedió a diluir la cantidad correspondiente de HCH total (residuo finamente molido) en una mezcla 1:1 de agua destilada:acetona para que tras su aplicación en 1 kg de suelo experimental, los niveles de contaminación de este fuesen aproximadamente 0 (CONTROL), 300, 600, 1 250, 2 500, y 5 000 mg kg<sup>-1</sup>. Adicionalmente, dado que la solubilidad del residuo resulta limitante a concentraciones superiores, se prepararon 3 niveles de contaminación por incorporación directa del residuo finamente molido, hasta obtener 7 500, 10 000 y 12 500 mg kg<sup>-1</sup> de HCH total. Se considera que este amplio rango de concentraciones reproduce el ambiente heterogéneo y fuertemente contaminado de la parcela experimental. Todas las mezclas se guardaron en recipientes individuales y durante un periodo de 3 semanas se dejaron secar al aire libre en invernadero para facilitar la evaporación de los residuos de acetona (que pueden ser tóxicos) y al mismo tiempo minimizar las pérdidas de HCH por volatilización. Periódicamente se mezclaban cuidadosamente los suelos contaminados para facilitar la incorporación del HCH.

#### 6.2.2. Especies vegetales

Para este ensayo se han escogido 9 especies vegetales ampliamente representadas en Galicia (3 monocotiledóneas y 6 dicotiledóneas). Dentro de las monocotiledóneas se seleccionaron 3 gramíneas (trigo, *Triticum aestivum* L., avena, *Avena sativa* L., y cebada, *Hordeum vulgare* L.), mientras que dentro de las dicotiledóneas se seleccionaron 4 leguminosas (dos tréboles, trébol violeta, *Trifolium pratense* L., y trébol blanco, *Trifolium repens* L.; guisante, *Pisum sativum* L. y judía, *Phaseolus vulgaris* L.) y una variedad autóctona de nabicol (*Brassica* sp.), todas ellas de interés agrícola. Las gramíneas son representativas de una extensa familia de plantas de distribución mundial y de gran importancia económica (Fletcher y col., 1988). Además, al ser plantas herbáceas, forman fibrosos sistemas radiculares, muy extensos, que proporcionan condiciones ideales para la fitocorrección. Por su parte, las leguminosas son muy importantes en situaciones de campo en las que el nitrógeno puede ser un elemento limitante en el crecimiento vegetal (Adam y Duncan, 2002). El empleo de cultivos comerciales posee la ventaja de una germinación

homogénea y gran disponibilidad. El interés de la variedad autóctona de *Brassica sp.* radica en que pertenece a una género de plantas utilizado en ensayos de toxicidad, además de representar un cultivo de amplia repercusión en la región. Por último, se ha utilizado *Solanum nigrum*, generalmente considerada como mala hierba en la agricultura, debido a que se presentaba de modo espontáneo en la zona de contaminación de O Porriño (USC, 2003).

### 6.2.3. Condiciones experimentales

Se prepararon macetas de plástico rellenas con aprox. 100 g de suelo de cada uno de los niveles de contaminación considerados: 0 (CONTROL), 300, 600, 1 250, 2 500, 5 000, 7 500, 10 000 y 12 500 mg kg<sup>-1</sup>. En las macetas se sembraron las semillas de las especies escogidas. Las semillas se sometieron a un tratamiento de limpieza y estimulación con base fuerte y etanol en agua ultrapura (dilución 1:10). Finalmente se lavaron con abundante agua ultrapura para eliminar los restos de base y alcohol. Se distribuyeron entre 2 y 10 semillas por maceta, dependiendo de la especie y de las limitaciones de espacio que las macetas podrían causar a las plántulas. Una vez preparadas, las macetas fueron introducidas en una cámara de germinación-crecimiento y colocadas siguiendo un diseño experimental completamente al azar. Para cada especie se incluyeron macetas con semillas pero sin contaminación (CONTROL con Planta), así como macetas con todos los niveles de contaminación pero sin semillas presentes (CONTROL sin Planta). Esto se ha realizado para cada especie y tratamiento. El ensayo se ha realizado por triplicado para cada una de las especies vegetales consideradas en este estudio. La cámara de crecimiento mantenía la temperatura en un rango de 17-24 °C, con un fotoperíodo de 16 horas de iluminación y 8 horas de oscuridad. El contenido en agua de las macetas se verificó diariamente, ajustando cuando era necesario a capacidad de campo. Esto se realizó con el máximo cuidado, pues las macetas no presentaban una salida para el exceso de agua, impidiendo el lavado del contaminante. Adicionalmente, cada 5-6 días todas las macetas fueron regadas con una cantidad mínima (5 ml) de disolución nutritiva comercial, para evitar de este modo estrés por falta de elementos esenciales para el desarrollo de la planta.

Este bioensayo se ha enfocado como un experimento de duración intermedia, para conocer no solo la respuesta de germinación de las especies vegetales sino también la respuesta del desarrollo inicial y el crecimiento de las plántulas. La duración del ensayo ha sido ajustada al ciclo vital de cada una de las plantas empleadas, procurando que la retirada coincidiese con el momento posterior al establecimiento de las plantas en el sustrato. La duración final de los ensayos osciló entre 21 y 35 días, en función de la especie vegetal.

### 6.2.4. Toma de muestras

En este experimento se han considerado una serie de variables características que permiten tener una visión global de cómo la presencia de HCH en el suelo puede afectar a las diferentes especies vegetales. El momento en el que se procede a la siembra se considera el tiempo cero del ensayo. Para realizar la observación de la **germinación** se ha definido, por convenio, que la semilla ha germinado cuando el brote es visible sobre la superficie del suelo. Los sucesivos recuentos se realizaron, generalmente, cada 2/3 días. En principio se tomaron dos puntos de referencia para investigar la germinación, t=5 días (ensayo de germinación de corta duración) y t=14 días (ensayo de germinación de

duración intermedia), para adecuar este estudio a la metodología más utilizada (Bewley y Black, 1994). No obstante, como enseguida se comprobó que el parámetro germinación no era muy sensible en el caso de este estudio, y que además los datos a t=5 días y t=14 días mostraban una enorme heterogeneidad, finalmente se ha optado por presentar tan sólo la germinación acumulada (GA) y la supervivencia-mortalidad (S-M), a la finalización de cada uno de los ensayos para las especies individuales (Tabla 6.1). A la hora de analizar el comportamiento de la germinación frente al tiempo, para entender como el contaminante afecta a la **velocidad o tasa de germinación**, se han calculado dos índices de germinación. Por un lado, el Coeficiente de la Tasa de Germinación (CTG), y por otro, el Índice de la Tasa de Germinación (ITG). El modo de cálculo de este y otros parámetros se describen con detalle más adelante (análisis de datos). En el momento de la finalización de cada uno de los ensayos, se ha realizado un recuento para verificar la supervivencia, descartando las plántulas deterioradas.

En el momento de la **retirada** de cada una de las especies se procedió a la cosecha de las partes aérea y subterránea. A continuación las muestras se lavaron, midieron y pesaron (dato de peso fresco, mg planta<sup>-1</sup>). Las muestras se dejaron secar a continuación a temperatura ambiente para minimizar la pérdida de HCH por volatilización. Finalmente, las muestras vegetales volvieron a pesarse una vez que se consideraron secas (peso constante), obteniendo así el dato de peso o biomasa seca (expresado en mg peso seco planta<sup>-1</sup>). Los datos de germinación acumulada, supervivencia, longitud (tallo y raíz) y biomasa (peso seco), así como variables derivadas, se han utilizado para el análisis de la toxicidad.

#### 6.2.5. Análisis de datos

##### *Cálculo de Variables para la evaluación de la germinación y el desarrollo temprano*

Se han calculado (Tabla 6.1):

-Germinación acumulada (GA): porcentaje de semillas germinadas con respecto al número total de semillas sembradas en cada maceta.

-Coeficiente de la Tasa de Germinación (Bewley y Black, 1994; Chiapusio y col, 1997).

-La supervivencia-mortalidad (S-M) número de plántulas sanas que se han recogido en cada una de las macetas al final del experimento.

-Índice de la Tasa de Germinación (Roselló y Mayol, 2002).

-El Índice de Vigor de la Plántula (IVP; Bidlan y col, 2004) y la Longitud Radicular Específica (LRE; Merkl y col., 2005) se utilizan en la valoración del desarrollo inicial de las plántulas. Al ser una combinación de varios parámetros, estos índices proporcionan una información integrada del estado de la planta en el momento de la retirada del ensayo. No se trata, específicamente, de índices relacionados con la germinación.

Efectos sobre la germinación y desarrollo inicial en suelo

**Tabla 6.1** Definición y métodos de cálculo de las principales variables relacionadas con la germinación y crecimiento vegetal que se han utilizado en este estudio.

Variable	Denominación	Cálculo	Notas	Referencia
<b>GA</b>	Germinación acumulada	$GA = N_g / N_s * 100$	$N_g$ : número de semillas germinadas al final del experimento $N_s$ : número de semillas al inicio del experimento	-
<b>S-M</b>	Supervivencia-Mortalidad	$S-M = N_o / N_s * 100$	$N_o$ : número de semillas con desarrollo óptimo al final del experimento $N_s$ : número de semillas al inicio del experimento	-
<b>CTG</b>	Coefficiente de la Tasa de Germinación	$CTG = (N_1 + N_2 + N_3 + \dots + N_n) / (N_1 * T_1) + (N_2 * T_2) + (N_3 * T_3) + \dots + (N_n * T_n)$	$N_1$ : número de semillas germinadas en el tiempo $T_1$ $N_2$ : número de semillas germinadas en el tiempo $T_2$ $N_n$ : número de semillas germinadas en el tiempo $T_n$	Bewley y Black, 1994. Chiapusio y col., 1997.
<b>ITG</b>	Índice de la Tasa de Germinación	$ITG = (100/n) \sum g_i / T_i$	$n$ : número de semillas al inicio del experimento $g_i$ : número de semillas germinadas en el tiempo $T_i$	Roselló y Mayol, 2002.
<b>IVP</b>	Índice de Vigor de la Plántula	$IVP = (\text{longitud media raíz} + \text{longitud media tallo}) / \text{porcentaje de germinación} / 10$	-	Bidlan y col., 2004.
<b>LRE</b>	Longitud Radicular Específica	$LRE = \text{longitud raíz} / \text{peso seco raíz}$	$m \text{ g}^{-1}$	Merkl y col., 2005.

### *Toxicidad del HCH total*

Generalmente existen dos procedimientos para el análisis de la toxicidad de los contaminantes en ensayos de ecotoxicidad: (i) contraste estadístico de hipótesis (se detecta un Nivel Sin Efecto Observado – **NSEO** -, la mayor concentración de las empleadas en el bioensayo para la cual no hay una diferencia significativa con respecto a la respuesta del tratamiento control, o bien, se habla del Nivel mas Bajo con Efecto Observado – **NBEO** - o la concentración más pequeña de las empleadas en el bioensayo que muestra una diferencia significativa con respecto a la respuesta del tratamiento control); o bien (ii) aproximación basada en un Análisis de Regresión (ajuste no lineal a una ecuación modelo de regresión - probit, logístico, Weibull - de los resultados de los ensayos de toxicidad; aquí se interpolan o extrapolan los efectos de un nivel de contaminación de interés a través del **EC<sub>50</sub>** o Concentración Efectiva que causa un 50% de reducción de la variable medida) (Moore y Caux, 1997; Newman y Unger, 2003). En este trabajo se ha optado por utilizar ambos tipos de técnicas, dando preferencia al Análisis de Regresión. Las variables que se han utilizado son la germinación acumulada (GA), la supervivencia-mortalidad S-M), los índices combinados IVP y LRE, el descenso relativo de la longitud de raíz y tallo y el descenso relativo de la biomasa seca (peso seco de raíz, tallo y total). Los modelos de regresión utilizados son el probit para la supervivencia y el logístico para el resto de variables.

#### **6.2.6. Estadística**

El ajuste de las curvas con la variable supervivencia-mortalidad se ha realizado con análisis probit del paquete estadístico SPSS 14.0. En el análisis logístico se ha utilizado el paquete estadístico Graph Pad Prism 4.0. En ambos casos es posible conocer el parámetro EC<sub>50</sub>. En cuanto al estudio de las variables relacionadas con la germinación, se ha realizado un test ANOVA. En el caso de algunas variables (germinación, supervivencia-mortalidad), ha sido necesario utilizar estadística no paramétrica: test U de Mann-Whitney, dado que los datos incumplen el supuesto de normalidad.

### **6.3. RESULTADOS**

#### **6.3.1. Germinación acumulada**

Las plantas utilizadas en este experimento presentan una respuesta variable en cuanto a la Germinación Acumulada (GA; Tabla 6.2). Los tréboles son las especies que más problemas han tenido para brotar y desarrollarse; *Trifolium repens* L. no llegó a germinar adecuadamente en ninguno de los tratamientos considerados (se ha excluido de cualquier análisis posterior). Por su parte, *Trifolium pratense* L. muestra generalmente una germinación constante en todos los tratamientos (aprox. 50%). *Triticum aestivum* L., *Pisum sativum* L., *Solanum nigrum* L. presentan un paulatino descenso de la germinación con la concentración de HCH total, por debajo del 50 %. La germinación acumulada de *Triticum aestivum* L se ve afectada de modo significativo (a P<0.05) a partir del nivel de contaminación 5 000 mg kg<sup>-1</sup> de HCH total (Tabla 6.2). *Avena sativa* L., *Hordeum vulgare* L., *Brassica* sp. y *Phaseolus vulgaris* L. muestran un descenso moderado de GA, GA<50%, incluso en los niveles de contaminación más elevados.

Efectos sobre la germinación y desarrollo inicial en suelo

**Tabla 6.2.** Germinación acumulada (**GA**), expresada en porcentaje, de las diferentes especies vegetales. TRI, *Triticum aestivum* L.; AVE, *Avena sativa* L., HOR, *Hordeum vulgare* L.; TRP, *Trifolium pratense* L.; PIS, *Pisum sativum* L.; SOL, *Solanum nigrum* L.; BRA, *Brassica sp.*, PHA, *Phaseolus vulgaris* L. NSEO, Nivel Sin Efecto Observado; NBEO, Nivel mas Bajo con Efecto Observado; h, hormesis.

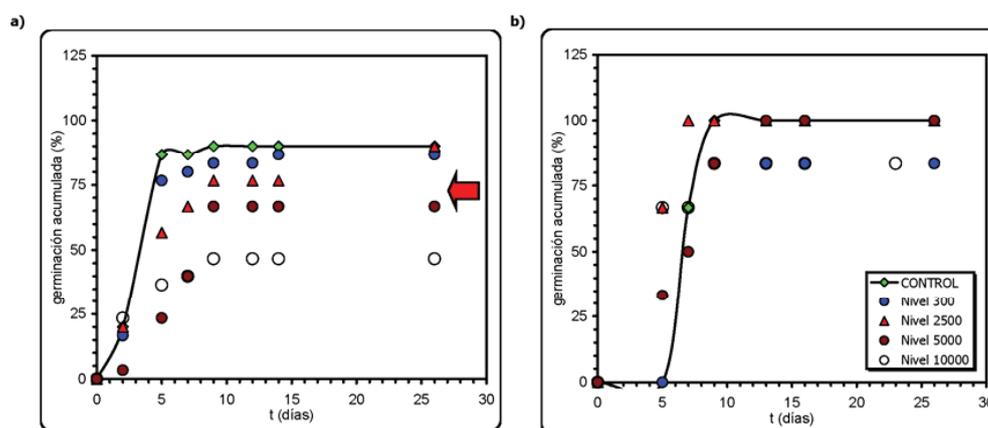
Nivel	TRI		AVE		HOR		TRP		PIS		SOL		BRA		PHA									
	media	d.s. <sup>1</sup>	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.								
CTRL	90	± 10	89	± 11	100	± 0	40	± 10	67	± 33	41	± 28	100	± 0	100	± 0								
300	87	± 15	n.s. <sup>2</sup>	100	± 0	h*	78	± 11	n.s.	50	± 0	h*	78	± 19	n.s.	81	± 6	h*	100	± 0	n.s.	83	± 29	n.s.
600	83	± 15	n.s.	93	± 6	n.s.	81	± 6	n.s.	47	± 12	n.s.	56	± 19	n.s.	33	± 11	n.s.	94	± 10	n.s.	83	± 29	n.s.
1 250	77	± 12	n.s.	93	± 6	n.s.	81	± 17	n.s.	47	± 35	n.s.	67	± 33	n.s.	48	± 28	n.s.	72	± 35	n.s.	83	± 29	n.s.
2 500	90	± 10	NSEO	96	± 6	n.s.	89	± 19	n.s.	43	± 6	n.s.	100	± 0	n.s.	22	± 19	n.s.	83	± 17	n.s.	100	± 0	n.s.
5 000	67	± 15	NBEO	85	± 13	n.s.	93	± 13	n.s.	60	± 10	n.s.	78	± 19	n.s.	22	± 19	n.s.	67	± 17	n.s.	100	± 0	n.s.
7 500	47	± 6	*	89	± 11	n.s.	93	± 13	NSEO	33	± 15	n.s.	67	± 33	n.s.	26	± 23	n.s.	89	± 10	n.s.	100	± 0	n.s.
10000	47	± 15	*	85	± 17	n.s.	70	± 13	NBEO	60	± 20	n.s.	56	± 19	n.s.	33	± 22	n.s.	89	± 10	n.s.	83	± 29	n.s.
12500	43	± 15	*	85	± 13	n.s.	78	± 0	*	40	± 10	n.s.	44	± 38	n.s.	22	± 0	n.s.	78	± 38	n.s.	83	± 29	n.s.

<sup>1</sup> d.s, desviación estándar; <sup>2</sup> n.s., diferencia no significativa a P<0,05; \* diferencia significativa a P<0,05.

Para el resto de especies vegetales, si bien existe un descenso del parámetro germinación acumulada, las diferencias encontradas no son significativas. En el caso de *Hordeum vulgare* L., el nivel de contaminación a partir del cual el descenso de la germinación acumulada con respecto al control es significativo (a  $P < 0.05$ ) es ya de  $10\ 000\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  de HCH total. Por otro lado, algunas especies vegetales como *Trifolium pratense* L., *Avena sativa* L. y *Solanum nigrum* L. presentan un incremento de la germinación acumulada en niveles bajos de contaminación que es significativo a  $P < 0,05$  en el nivel de contaminación de  $300\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  (Tabla 6.2). No ha sido posible efectuar un análisis de regresión adecuado para los datos disponibles, pues los datos de germinación acumulada obtenidos en este ensayo no se ajustan a los modelos habituales (datos no mostrados).

### 6.3.2. Tasa de germinación

El Coeficiente de la Tasa de Germinación (CTG) no sufre grandes variaciones en los niveles de HCH utilizados (Tabla 6.3). Generalmente este índice es constante dentro de cada serie de niveles de contaminación, si bien los valores son distintos entre cada una de las especies (CTG medio oscila entre 3 y 11). Por otra parte, el Índice de la Tasa de Germinación (ITG) se ve influenciado por el nivel de contaminación (Tabla 6.3). Las monocotiledóneas, *Brassica* sp. y *Phaseolus vulgaris* L., presentan los valores de ITG más elevados ( $\text{ITG}_{\text{CONTROL}} > 40$ ); *Trifolium pratense* L. y *Pisum sativum* L. presentan un índice intermedio ( $20 < \text{ITG}_{\text{CONTROL}} < 40$ ), mientras que *Solanum nigrum* L. tiene un valor de este índice muy bajo ( $\text{ITG}_{\text{CONTROL}} < 10$ ). El ITG de las monocotiledóneas desciende de modo paulatino con el aumento de concentración de HCH. Las diferencias entre tratamientos respecto al CONTROL no son significativas en general. No obstante, a partir del nivel  $10\ 000\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  de HCH total, la diferencia de ITG es significativa a  $P < 0.05$ . Esto no sucede en ninguna de las plantas dicotiledóneas. El ITG de *Solanum nigrum* L., en el nivel de  $300\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  se produce un aumento de ITG (media  $\text{ITG}_{\text{CONTROL}}$ : 8; media  $\text{ITG}_{300}$ : 17; significativo a  $P < 0.01$ ; Tabla 6.3).



**Figura 6.1.** Curvas de germinación acumulada (GA,%) con respecto al tiempo, para varios niveles de contaminación seleccionados (CONTROL, 300, 2 500, 5 000 y 10 000  $\text{mg}\ \text{kg}^{-1}$  HCH total). a) *Triticum aestivum* L.; b) *Phaseolus vulgaris* L.

**CAPITULO 6. Efectos sobre la germinación y desarrollo inicial en suelo**

**Tabla 6.3.** Valores del Coeficiente de la Tasa de Germinación (CTG) y del Índice de la Tasa de Germinación (ITG). TRI, *Triticum aestivum* L.; AVE, *Avena sativa* L., HOR, *Hordeum vulgare* L.; TRP, *Trifolium pratense* L.; PIS, *Pisum sativum* L.; SOL, *Solanum nigrum* L.; BRA, *Brassica sp.*, PHA, *Phaseolus vulgaris* L.

CTG	TRI		AVE		HOR		TRP		PIS		SOL		BRA		PHA	
	media	d.s. <sup>1</sup>	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
CONTROL	8.4 ± 0.2		6.3 ± 0.3	6.0 ± 0.4	8.4 ± 0.4	6.1 ± 1.1	5.7 ± 0.2	7.6 ± 0.1	7.1 ± 0.8							
300	8.3 ± 0.2	n.s. <sup>2</sup>	6.2 ± 0.2	n.s.	8.0 ± 0.3	n.s.	6.4 ± 0.5	n.s.	5.9 ± 0.1	n.s.	7.6 ± 0.2	n.s.	7.9 ± 0.7	n.s.		
600	8.5 ± 0.3	n.s.	6.2 ± 0.2	n.s.	8.5 ± 0.4	n.s.	5.4 ± 0.6	n.s.	6.2 ± 0.5	n.s.	7.7 ± 0.4	n.s.	7.3 ± 0.5	n.s.		
1 250	7.9 ± 0.5	n.s.	6.0 ± 0.2	n.s.	8.2 ± 0.7	n.s.	5.1 ± 0.9	n.s.	5.3 ± 0.3	n.s.	8.3 ± 0.6	n.s.	7.3 ± 0.5	n.s.		
2 500	8.0 ± 0.3	n.s.	5.7 ± 0.1	*	7.8 ± 0.2	n.s.	5.1 ± 0.3	n.s.	5.6 ± 0.8	n.s.	8.7 ± 0.4	n.s.	8.5 ± 0.5	n.s.		
5 000	8.7 ± 0.4	n.s.	5.9 ± 0.2	n.s.	8.4 ± 0.2	n.s.	5.7 ± 0.2	n.s.	6.6 ± 0.5	n.s.	10.0 ± 1.3	a	7.7 ± 1.1	n.s.		
7 500	9.8 ± 0.5	n.s.	5.6 ± 0.4	**	8.3 ± 1.0	n.s.	5.7 ± 0.2	n.s.	3.7 ± 3.2	n.s.	7.4 ± 0.7	n.s.	8.3 ± 1.1	n.s.		
10 000	9.4 ± 1.0	*	5.8 ± 0.1	n.s.	8.3 ± 0.3	n.s.	11.0 ± 7.8	n.s.	5.4 ± 0.5	n.s.	8.3 ± 0.3	n.s.	7.8 ± 0.2	n.s.		
12 500	9.4 ± 0.4	n.s.	5.8 ± 0.2	n.s.	8.8 ± 1.2	n.s.	3.3 ± 2.9	n.s.	5.1 ± 0.5	n.s.	8.1 ± 0.2	n.s.	8.9 ± 1.1	*		

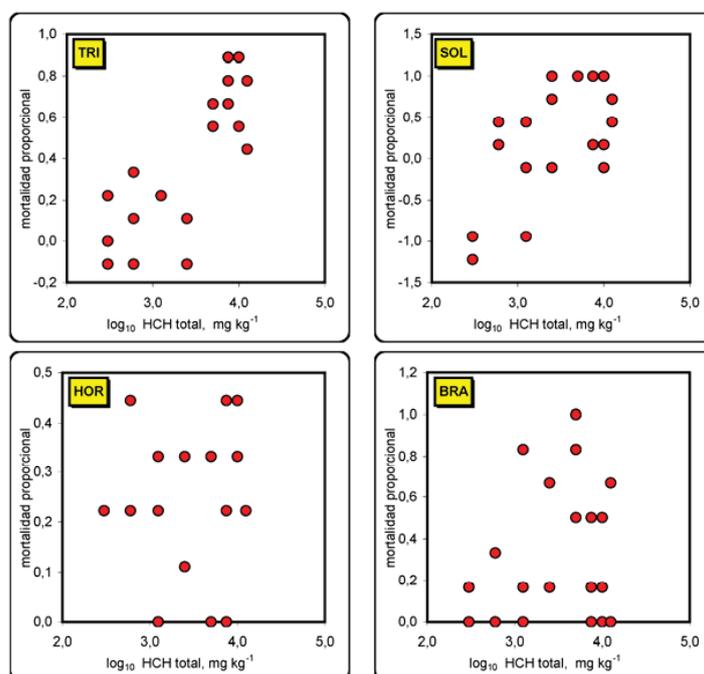
ITG	CONTROL		300		600		1 250		2 500		5 000		7 500		10 000		12 500	
	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
CONTROL	67 ± 7		40 ± 4	46 ± 7	28 ± 7	25 ± 8	8 ± 6	48 ± 2	45 ± 17									
300	61 ± 5	n.s.	44 ± 2	n.s.	32 ± 6	n.s.	37 ± 10	n.s.	17 ± 3	**	47 ± 3	n.s.	50 ± 11	n.s.				
600	62 ± 22	n.s.	43 ± 3	n.s.	36 ± 5	n.s.	21 ± 16	n.s.	7 ± 2	n.s.	48 ± 15	n.s.	43 ± 21	n.s.				
1 250	44 ± 13	n.s.	39 ± 4	n.s.	29 ± 19	n.s.	22 ± 16	n.s.	6 ± 3	n.s.	41 ± 19	n.s.	43 ± 21	n.s.				
2 500	55 ± 16	n.s.	32 ± 5	n.s.	22 ± 1	n.s.	33 ± 7	n.s.	2 ± 1	n.s.	46 ± 9	n.s.	55 ± 13	n.s.				
5 000	39 ± 12	n.s.	33 ± 5	n.s.	50 ± 11	n.s.	36 ± 12	n.s.	2 ± 2	n.s.	32 ± 9	n.s.	37 ± 16	n.s.				
7 500	40 ± 6	n.s.	28 ± 5	**	24 ± 15	n.s.	26 ± 14	n.s.	4 ± 4	n.s.	34 ± 7	n.s.	55 ± 7	n.s.				
10 000	37 ± 6	*	29 ± 5	*	31 ± 15	n.s.	26 ± 17	n.s.	3 ± 3	n.s.	50 ± 11	n.s.	50 ± 17	n.s.				
12 500	39 ± 13	n.s.	33 ± 3	n.s.	28 ± 7	n.s.	14 ± 13	n.s.	2 ± 1	n.s.	45 ± 22	n.s.	40 ± 10	n.s.				

<sup>1</sup> d.s., desviación estándar (n=3); <sup>2</sup> n.s., diferencia relativa al control estadísticamente no significativa a P<0.05; \*, diferencia relativa al control estadísticamente significativa a P<0.05; \*\*, diferencia relativa al control estadísticamente significativa a P<0.01.

Al representar la germinación acumulada frente al tiempo, parecen confirmarse estos resultados. Existen dos respuestas típicas: en el caso de *Triticum aestivum* L. (así como en el de las monocotiledóneas) hay un retraso en la germinación en los niveles de contaminación más elevados (Figura 6.1a). Las dicotiledóneas, por su parte, presentan unas curvas similares independientemente de la concentración de HCH, tal como se aprecia en el ejemplo de *Phaseolus vulgaris* L., (Figura 6.1b).

### 6.3.3. Supervivencia

La variable supervivencia-mortalidad (S-M) se comporta de un modo similar a lo ya visto con la Germinación Acumulada. Los diferentes análisis presentan valores aceptablemente similares de NBE0 y EC<sub>50</sub> (Figura 6.1; Tabla 6.4). Considerando cada nivel de contaminación, el valor de la supervivencia desciende con la presencia de HCH, pero esto depende en gran medida de la especie vegetal que se considere. En el caso de las especies *Triticum aestivum* L. y *Hordeum vulgare* L., los valores de NSEO son los mismos que los encontrados al analizar la germinación (2 500 mg kg<sup>-1</sup> para *Triticum* y 7 500 mg kg<sup>-1</sup> para *Hordeum*). La misma tendencia siguen los valores de NBE0 (5 000 y 10 000 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente). En cuanto a la supervivencia, la especie *Phaseolus vulgaris* L. muestra un descenso significativo (a P<0,05) a partir del nivel de 10 000 mg kg<sup>-1</sup>. El resto de plantas investigadas no muestran un descenso significativo de la supervivencia en ninguno de los niveles de contaminación examinados. No obstante, la supervivencia aumenta significativamente en el nivel de 300 mg kg<sup>-1</sup> en el caso de *Solanum nigrum* L (Tabla 6.4).



**Figura 6.2.** Rectas de ajuste mortalidad (recalculada con respecto al control) – concentración (Log<sub>10</sub> HCH total, mg kg<sup>-1</sup>). TRI, *Triticum aestivum* L.; SOL, *Solanum nigrum* L.; HOR, *Hordeum vulgare* L.; BRA, *Brassica* sp.

**Tabla 6.4.** Resumen de los parámetros derivados del análisis de contraste de hipótesis y del análisis probit de la variable supervivencia-mortalidad(S-M). Valores en mg kg<sup>-1</sup> de HCH total. TRI, *Triticum aestivum* L.; AVE, *Avena sativa* L., HOR, *Hordeum vulgare* L.; TRP, *Trifolium pratense* L.; PIS, *Pisum sativum* L.; SOL, *Solanum nigrum* L.; BRA, *Brassica sp.*, PHA, *Phaseolus vulgaris* L. NSEO, Nivel Sin Efecto Observado; NBEO, Nivel mas Bajo con Efecto Observado; h, hormesis.

Especie	Parámetros (contraste)			Parámetros (probit)		
	NSEO	NBEO	H	EC <sub>10</sub>	EC <sub>20</sub>	EC <sub>50</sub>
<b>TRI</b>	2 500	5 000	-	8	66	4 173
<b>AVE</b>	-	-	n.s. <sup>1</sup>	a	a	a
<b>HOR</b>	7 500	10 000	-	1	216	>12 500
<b>TRP</b>	-	-	n.s.	a	a	a
<b>PIS</b>	-	-	-	a	a	a
<b>SOL</b>	-	-	*	a	a	a
<b>BRA</b>	-	-	-	41	444	>12 500
<b>PHA</b>	10 000	12 500	-	109	601	>12 500

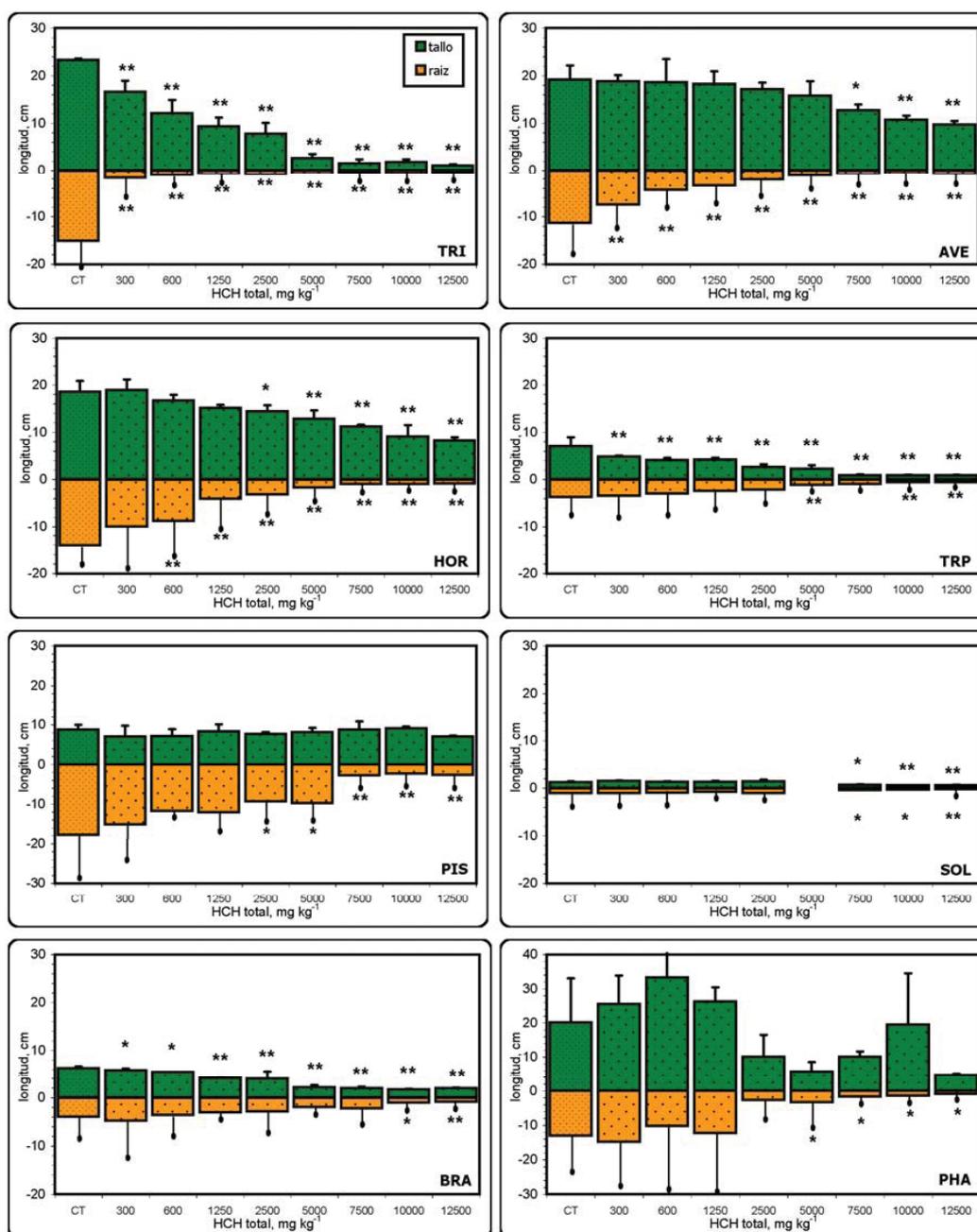
<sup>1</sup> n.s., diferencia no significativa a P<0,05; \*, diferencia significativa a P<0,05; <sup>a</sup>, ajuste incorrecto del modelo.

#### 6.3.4. Crecimiento y desarrollo inicial

El tamaño de las plántulas se ve afectado de modo significativo en los niveles más bajos de concentración de HCH total utilizados en este estudio (Figura 6.3). En general todas las plantas muestran una tendencia al descenso relativo de la longitud media de tallos y hojas, si bien hay diferencias en función de la especie vegetal.

En lo que respecta al **tallo**, *Triticum aestivum* L., *Trifolium pratense* L. y *Brassica sp.* presentan un descenso constante y significativo de la longitud media desde el nivel de contaminación de 300 mg kg<sup>-1</sup> (a P<0.01; Figura 6.3). Este efecto es a partir de 2 500 mg kg<sup>-1</sup> en *Hordeum vulgare* L., mientras que en el caso de *Avena sativa* L. y *Solanum nigrum* L. el descenso ocurre a partir de 7 500 mg kg<sup>-1</sup>. *Phaseolus vulgaris* L. no muestra una tendencia clara, pues si bien la longitud del tallo varía entre los diferentes niveles de contaminación, las diferencias encontradas no son significativas (a P<0.05).

En cuanto al efecto sobre la elongación de la **raíz** mas larga, hay que decir que en el momento de la medición se observa un desarrollo anormal de las raíces en muchas de las macetas con presencia de HCH, similar al descrito en los experimentos de crecimiento en disolución nutriente (Capítulo 5). Las tres especies de monocotiledóneas muestran un comportamiento similar, con un descenso de la longitud media de la raíz mas larga en los niveles de contaminación inferiores (en nivel 300 mg kg<sup>-1</sup>, *Triticum*; en nivel 600 mg kg<sup>-1</sup>, *Avena* y *Hordeum*; significativo a P<0.01; Figura 6.3). *Trifolium repens* L. y *Brassica sp.* mostraron una respuesta similar. En ambos casos se trata de plantas con una longitud de raíz inferior a 5 cm. En *Trifolium*, la elongación radicular se reduce a partir de niveles intermedios de contaminación (5 000 mg kg<sup>-1</sup>) (significativo P<0.01; Figura 6.3). *Pisum sativum* L. y *Phaseolus vulgaris* L. presentaron un descenso moderado de la longitud media de la raíz mas larga. En el caso de *Pisum*, dicha diferencia es significativa (P<0.05) a partir del nivel de 2 500 mg kg<sup>-1</sup>. Por su parte, la raíz de *Phaseolus* se ve afectada de modo significativo (P<0.05) a partir del nivel de contaminación de 5 000 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 6.3).



**Figura 6.3.** Longitud del tallo y de la raíz (cm) al finalizar el experimento. TRI, *Triticum aestivum* L.; TRP, *Trifolium pratense* L.; AVE, *Avena sativa* L.; HOR, *Hordeum vulgare* L.; PIS, *Pisum sativum* L.; SOL, *Solanum nigrum* L.; BRA, *Brassica* sp.; PHA, *Phaseolus vulgaris* L. \*, diferencia relativa al control estadísticamente significativa a  $P < 0.05$ ; \*\*, diferencia relativa al control estadísticamente significativa a  $P < 0.01$ .

CAPITULO 6. Efectos sobre la germinación y desarrollo inicial en suelo

**Tabla 6.5.** Valores del Índice de Vigor de la Plántula (IVP) y de la Longitud Radicular Específica (LRE, m g<sup>-1</sup>) al finalizar el experimento. TRI, *Triticum aestivum* L.; AVE, *Avena sativa* L.; HOR, *Hordeum vulgare* L.; TRP, *Trifolium pratense* L.; PIS, *Pisum sativum* L.; SOL, *Solanum nigrum* L.; BRA, *Brassica* sp.; PHA, *Phaseolus vulgaris* L.

IVP	TRI		AVE		HOR		TRP		PIS		SOL		BRA		PHA						
	media	d.s. <sup>1</sup>	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.					
CONTROL	346	± 45	275	± 80	325	± 30	43	± 18	169	± 68	10	± 7	102	± 14	332	± 148					
300	161	± 44	** 263	± 33	n.s. <sup>2</sup> 227	± 68	*	41	± 6	n.s.	167	± 36	n.s.	105	± 23	n.s.	354	± 179			
600	113	± 44	** 211	± 29	n.s. 208	± 39	*	32	± 1	n.s.	126	± 12	n.s.	8	± 4	n.s.	319	± 44			
1250	77	± 12	** 201	± 39	n.s. 159	± 51	**	33	± 28	n.s.	140	± 86	n.s.	10	± 7	n.s.	52	± 28			
2500	77	± 14	** 185	± 3	*	157	± 44	**	20	± 4	n.s.	171	± 16	n.s.	6	± 5	n.s.	58	± 25		
5000	23	± 9	** 145	± 37	*	136	± 36	**	21	± 8	n.s.	135	± 14	n.s.	±	±	n.s.	31	± 1		
7500	10	± 5	** 120	± 18	*	112	± 19	**	6	± 3	*	80	± 45	n.s.	4	± 1	n.s.	38	± 9		
10000	11	± 3	** 97	± 12	*	71	± 26	**	9	± 4	*	77	± 2	n.s.	4	± 2	n.s.	25	± 1		
12500	7	± 1	** 90	± 14	*	71	± 5	**	6	± 1	*	64	± 6	n.s.	2	± 0	n.s.	21	± 10		
<b>LRE</b>																					
(m g <sup>-1</sup> )																					
CONTROL	27.4	± 4.2	50.3	± 11.6	21.2	± 1.2	110.6	± 34.1	7.3	± 1.9	±	±	73.7	± 21.3	2.7	± 0.4					
300	3.5	± 0.6	** 22.3	± 7.1	** 16.1	± 6.0	n.s.	157.6	± 61.3	n.s.	9.3	± 2.6	n.s.	-	±	-	96.1	± 39.4	n.s.	3.4	± 0.7
600	2.7	± 0.1	** 29.9	± 7.8	** 16.6	± 5.3	n.s.	98.7	± 41.4	n.s.	5.2	± 0.0	n.s.	-	±	-	98.6	± 23.7	n.s.	3.6	± 1.8
1250	2.1	± 0.1	** 17.5	± 3.6	** 7.7	± 3.9	**	97.6	± 27.0	n.s.	6.3	± 0.9	n.s.	-	±	-	68.3	± 10.6	n.s.	4.0	± 2.7
2500	1.7	± 0.1	** 6.6	± 2.3	** 5.8	± 1.3	**	86.2	± 19.9	n.s.	5.1	± 0.8	n.s.	-	±	-	62.0	± 24.8	n.s.	3.2	± 0.8
5000	1.5	± 0.1	** 4.7	± 1.6	** 4.1	± 1.1	**	31.8	± 5.7	*	3.7	± 1.1	*	-	±	-	32.2	± 1.6	n.s.	3.4	± 1.9
7500	1.3	± 0.1	** 2.5	± 0.2	** 2.3	± 0.2	**	18.1	± 1.6	**	1.1	± 0.3	**	-	±	-	38.3	± 10.7	n.s.	0.9	± 0.2
10000	2.1	± 0.3	** 2.9	± 0.4	** 2.0	± 0.1	**	18.0	± 3.7	**	0.9	± 0.2	**	-	±	-	18.7	± 2.2	*	2.5	± 0.2
12500	2.2	± 0.6	** 2.7	± 0.2	** 2.1	± 0.2	**	16.2	± 1.9	**	1.2	± 0.3	**	-	±	-	18.6	± 2.3	*	1.8	± 0.5

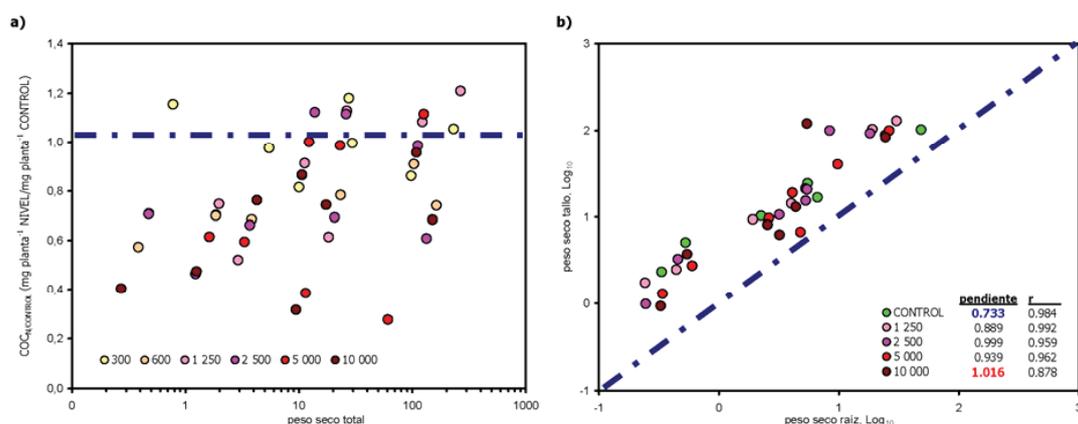
<sup>1</sup> ds, desviación estándar; <sup>2</sup> n.s., diferencia relativa al control estadísticamente no significativa a P<0.05; <sup>3</sup> en el caso de SOL, no se ha podido calcular LRE a causa por no disponer de dato de peso seco de raíces. \*, diferencia relativa al control estadísticamente significativa a P<0.05; \*\*, diferencia relativa al control estadísticamente significativa a P<0.01.

El Índice de Vigor de la Plántula (IVP) oscila entre valores de 10 - 346 para el nivel de contaminación cero (CONTROL), mientras que para el nivel de contaminación más alto (12 500 mg kg<sup>-1</sup>) dicha variación es menor (2 - 90) (Tabla 6.5). *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L. y *Phaseolus vulgaris* L. presentan valores altos (IVP>300); *Avena sativa* L., *Pisum sativum* L. y *Brassica* sp. valores intermedios (300>IVP>100); *Trifolium pratense* L. y *Solanum nigrum* L., valores bajos (IVP<100). En general, todas las especies vegetales investigadas muestran un descenso generalizado de este índice con el nivel de contaminación. *Triticum aestivum* L. presenta un descenso acusado de IVP (IVP<sub>CONTROL</sub>, 346, IVP<sub>300</sub>, 161, IVP<sub>12 500</sub>, 7; significativo a P<0.01). Aunque no tan acusado, el IVP de *Hordeum vulgare* L. también desciende desde los niveles iniciales de contaminación (IVP<sub>CONTROL</sub>, 325, IVP<sub>300</sub>, 227, la diferencia es significativa P<0.05). *Avena sativa* L. sufre una caída de IVP del mismo orden, pero las diferencias no son significativas hasta el nivel de 2 500 mg kg<sup>-1</sup> (IVP<sub>CONTROL</sub>, 275, IVP<sub>2 500</sub>, 185; significativo, P<0.05). *Trifolium pratense* L., por su parte, muestra un IVP bajo en general que se reduce a partir de niveles altos de HCH (IVP<sub>CONTROL</sub>, 43, IVP<sub>7 500</sub>, 6; significativo, P<0.05). El resto de especies vegetales no manifiestan un descenso de IVP tan acusado. *Solanum nigrum* L., *Brassica* sp. y *Phaseolus vulgaris* L. presentan un aumento de IVP en niveles bajos (IVP<sub>CONTROL</sub> < IVP<sub>300</sub>; no significativo, P<0.05). No obstante, estas plantas muestran en todos los casos un descenso gradual del IVP en los siguientes niveles de contaminación.

La respuesta de la Longitud Radicular Específica (LRE o SRL –specific root length) es muy similar en todas las plantas (Tabla 6.5). El índice LRE varía en un rango de 3 - 111 m g<sup>-1</sup> (LRE<sub>CONTROL</sub>). El rango es mas estrecho (2 - 19 m g<sup>-1</sup>) al considerar el nivel de contaminación más alto (LRE<sub>12 500</sub>). En función de LRE<sub>CONTROL</sub>, *Trifolium pratense* L. presenta el valor más elevado (LRE>100); *Brassica* sp. y *Avena sativa* L. presentan un valor intermedio (100>LRE>50); *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., *Pisum sativum* L. y *Phaseolus vulgaris* L., el valor más bajo (LRE<30). El índice LRE desciende en *Triticum aestivum* L., de modo acusado (LRE<sub>CONTROL</sub>, 27.4 m g<sup>-1</sup>; LRE<sub>300</sub>, 3.5 m g<sup>-1</sup>; diferencia significativo a P<0.01). En el caso de *Avena sativa* L. y *Hordeum vulgare* L. el comportamiento del índice LRE es muy similar, aunque partiendo de valores de LRE<sub>CONTROL</sub> diferentes. *Phaseolus vulgaris* L. muestra un aumento de LRE (LRE<sub>CONTROL</sub>, 2,7 m g<sup>-1</sup>, LRE<sub>5 000</sub>, 3.4 m g<sup>-1</sup>; no significativo, P<0.05). No obstante, se trata en general de valores de LRE muy bajos, no superiores en ningún caso a 5 m g<sup>-1</sup>. *Trifolium pratense* L., *Pisum sativum* L. y *Brassica* sp. muestran un aumento relativo de LRE<sub>300</sub> (no significativo, P<0.05). No obstante, a partir de LRE<sub>1 250</sub>, hay un descenso, de acuerdo con la tendencia general (Tabla 6.5).

### 6.3.5. Producción y reparto de biomasa vegetal

Las diferentes especies vegetales utilizadas en este estudio presentan valores de peso seco y peso fresco con una correlación aceptable (r= 0,961; datos no mostrados) considerando todas las plantas y todos los niveles de contaminación, siguiendo pues tendencias similares. Se ha utilizado el dato de peso seco. La **acumulación** de biomasa seca para el conjunto de especies (calculado como: mg planta<sup>-1</sup> en nivel correspondiente / mg planta<sup>-1</sup> en CONTROL; COC<sub>N/CONTROL</sub>) indica que, en general, la presencia de HCH en el suelo hace que se reduzca dicha acumulación (COC<sub>N/CONTROL</sub><1), indicando una pérdida de biomasa (Figura 6.4a). La tendencia es a un mayor descenso de la acumulación de biomasa seca con el aumento de la concentración de HCH, pero esto es muy variable, dependiente de la especie vegetal y de la biomasa total. En algunos casos, no obstante, se aprecian un aumento del cociente (COC<sub>N/CONTROL</sub> >1; acumulación neta de biomasa con respecto al CONTROL), pero muy ligero y los datos son muy dispersos (Figura 6.4a).



**Figura 6.4.** Producción y reparto de biomasa seca: a) incremento relativo de biomasa seca con respecto al control ( $\text{mg planta}^{-1}$  en nivel correspondiente /  $\text{mg planta}^{-1}$  en CONTROL;  $COC_{N/CONTROL}$ ) para el conjunto de especies investigadas, en función de la biomasa total ( $\log_{10}$ ); b) Relación biomasa seca raíz-tallo: correlación y ajuste ( $r$ ; pendiente) ( $\log_{10}$ ). Se han representado los valores medios de los niveles más característicos; la tendencia es común en todos los niveles de contaminación.

En relación al **reparto relativo** de biomasa seca entre los tejidos de las plantas, la figura 6.4b resume los principales resultados. Al representar el peso seco de la raíz frente al peso seco del tallo (ambos en  $\text{mg planta}^{-1}$ , escala logarítmica,  $\log_{10}$ ), se aprecia el reparto alométrico de la biomasa entre ambos órganos. Si se desglosa para cada uno de los niveles de contaminación utilizados el ajuste de estos dos parámetros, se observa una tendencia clara: al aumentar el nivel de contaminación, la pendiente (P) aumenta progresivamente ( $P_{CONTROL}$ , 0.733;  $P_{2\,500}$ , 0.999;  $P_{5\,000}$ , 0.939;  $P_{10\,000}$ , 1.016;  $r > 0.870$ ; Figura 6.4b). Esto se cumple de modo general para todas las especies utilizadas en este experimento.

### 6.3.6. Análisis de ecotoxicidad: regresión logística

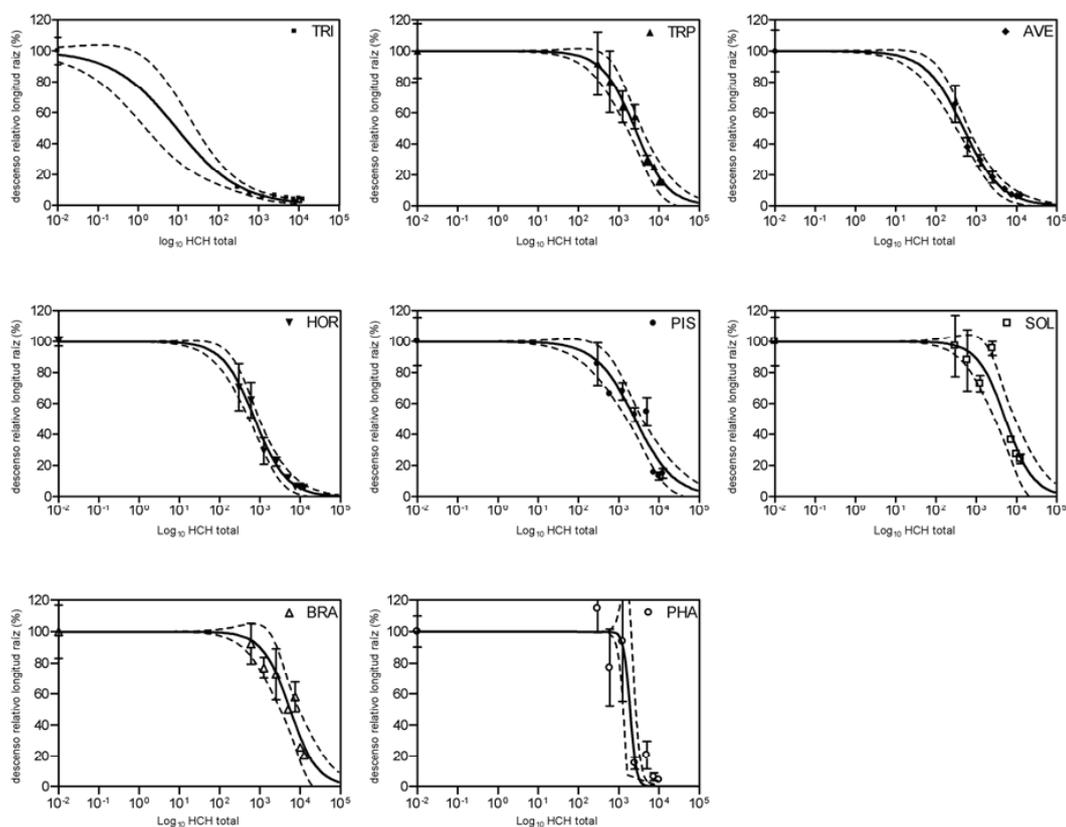
La Tabla 6.6 muestra los valores de  $EC_{50}$  obtenidos después de un ajuste log-logístico de las variables consideradas en este estudio (germinación acumulada, supervivencia-mortalidad, longitud raíz, longitud tallo, biomasa total, biomasa raíz, biomasa tallo, IVP, LRE). En este estudio se observa que los valores de  $EC_{50}$  oscilan desde cero (en realidad, estimación muy baja) hasta ajustes por encima del nivel de contaminación máximo que se ha utilizado ( $12\,500 \text{ mg kg}^{-1}$  de HCH total). Asimismo, en varios casos el ajuste a una curva teórica no ha sido posible, especialmente para el caso de *Pisum sativum* L. La germinación (GA) y la supervivencia-mortalidad (S-M) son las variables con los valores más elevados de  $EC_{50}$ , generalmente por encima de  $12\,500 \text{ mg kg}^{-1}$ . Por otro lado, la longitud (de raíz y tallo) y los índices combinados (IVP y LRE) muestran valores bajos pero similares del parámetro  $EC_{50}$ . La Figura 6.5 es un ejemplo del ajuste logístico de un parámetro muy utilizado, la longitud de raíz, para todas las plantas del ensayo.

CAPÍTULO 6

**Tabla 6.6.** Resumen del análisis de ecotoxicidad: regresión logística. Valores de EC<sub>50</sub> para las especies utilizadas en este estudio. TRI, *Triticum aestivum* L.; TRP, *Trifolium pratense* L.; AVE, *Avena sativa* L., HOR, *Hordeum vulgare* L.; PIS, *Pisum sativum* L.; SOL, *Solanum nigrum* L.; BRA, *Brassica* sp., PHA, *Phaseolus vulgaris* L.

Variable	EC <sub>50</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )							
	TRI	TRP	AVE	HOR	PIS	SOL	BRA	PHA
GA	10 500	n.c. <sup>1</sup>	n.c.	>12 500	n.c.	>12 500	>12 500	>12 500
S-M	5 139	n.c.	>12 500	>1 2500	n.c.	10 059	>12 500	>12 500
Longitud tallo	769	1 183	12 470	10 591	>12500	0	3 591	9 641
Longitud raíz	9	2 517	481	741	2 544	5 290	5 615	2 294
Peso Seco total	3 761	10 623	0	>12 500	>12 500	0	>12 500	9 589
Peso Seco tallo	2 811	4 328	>12 500	>12 500	n.c.	0	>12 500	>12 500
Peso Seco raíz	>12 500	0	0	>12 500	n.c.	n.c.	n.c.	1 310
IVP	259	2 748	5 175	1 641	8 715	6 734	2 849	3 899
LRE	9	3 833	439	1 103	4 052	n.c.	6 263	>12 500

<sup>1</sup> n.c., no calculable (valor muy bajo, inferior a 0).



**Figura 6.5.** Curvas de ajuste de regresión logística característica en el análisis de ecotoxicidad. A modo de ejemplo, se utiliza el descenso relativo de la longitud de raíz (%). TRI, *Triticum aestivum* L.; TRP, *Trifolium pratense* L.; AVE, *Avena sativa* L., HOR, *Hordeum vulgare* L.; PIS, *Pisum sativum* L.; SOL, *Solanum nigrum* L.; BRA, *Brassica* sp., PHA, *Phaseolus vulgaris* L. Las barras verticales son el error estándar; las líneas discontinuas marcan el intervalo de confianza (al 95%) de la curva de ajuste.

## 6.4. DISCUSIÓN

### 6.4.1. Efectos sobre la germinación y supervivencia

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la **germinación acumulada** no es una variable sensible para detectar efectos fitotóxicos del HCH en las etapas iniciales del desarrollo vegetal. La mayoría de las plantas investigadas no sufren efectos negativos directos en la etapa de germinación inicial, en la que las semillas son más sensibles a las condiciones del ambiente. El HCH puede adsorberse en los suelos a la materia orgánica, quedando retenido, lo que supone un efecto de protección (Weber y Miller, 1989). No obstante, existe una respuesta por debajo del óptimo; las plantas evidencian signos de estrés, causado por la presencia de HCH (descenso de la supervivencia, retraso en la germinación). *Solanum nigrum* L., por ejemplo, se ve afectada, pero en menor medida, dado que es una planta que habitualmente vive en ambientes adversos. Respecto a los cultivos, el comportamiento es divergente entre las monocotiledóneas (*Triticum aestivum* L. muy afectado, *Avena sativa* L. y *Hordeum vulgare* L., no tan afectados), mientras que las leguminosas de huerto (*Pisum sativum* L. y *Phaseolus vulgaris* L.) muestran una tendencia a tolerar la presencia de HCH en las etapas iniciales de la germinación. En este sentido, su capacidad fijadora de nitrógeno puede proporcionarles una ventaja en condiciones de ambiente desfavorable para su crecimiento y desarrollo. El análisis de la supervivencia-mortalidad confirma que *Triticum* es la planta más afectada por la presencia de HCH. Dado que la mortalidad aumentó en muchas de las macetas, se sugiere una acción acumulativa por la presencia de HCH que induce cambios en el vegetal que se manifiestan a lo largo del ciclo vital (efectos subletales; Newman y Unger, 2003).

Por otro lado, la **tasa de germinación** se retrasa. El HCH parece tener cierta capacidad de alterar el proceso normal de germinación de *Triticum aestivum* L., por ejemplo. El efecto se manifiesta como un retardo en la emergencia de la plántula del suelo. Esto implica una demora en el proceso normal de desarrollo que afecta al establecimiento y crecimiento posterior de la plántula. La emergencia de la raíz es un período especialmente crítico de la germinación y cualquier modificación del entorno de las plantas puede provocar daños a largo plazo (Baskin y Jerry, 1998).

Diversos estudios han descrito los efectos fitotóxicos de los pesticidas en general y del HCH, especialmente el isómero  $\gamma$ -HCH, en particular. Al nivel de la germinación, esto se manifiesta en una descompensación de procesos bioquímicos en la semilla, afectando a las enzimas hidrolíticas en monocotiledóneas (supresión actividad amilasa), disminuyendo el crecimiento (Hopkins, 1952; Dalvi y col., 1972; Gange y col., 1992; Bidlan col., 2004). Dado que las plantas dicotiledóneas no dependen en exceso de los hidratos de carbono durante el desarrollo de la semilla (utilizan reservas proteicas; Bewley y Black, 1994), no se verían tan afectadas. Daños más agudos se pueden producir por una reducción de la respiración de las células de la semilla o por un desarrollo anómalo de los tejidos embrionarios (Lichtenstein y col., 1962; Salazar y Paulsen, 1971). Estos fenómenos, en su conjunto, podrían explicar los resultados obtenidos en este estudio. No se trata de un daño agudo (a corto plazo), sino que se perturba el desarrollo normal de las plantas (daño crónico).

Se ha constatado que en el caso de *Solanum nigrum* L. se aprecia un incremento relativo en el porcentaje de germinación. A niveles de contaminación bajos (respecto a los ensayos en este estudio) hay un efecto de estimulación de distintas respuestas vegetales a la presencia del contaminante. Esta sobrecompensación, conocida como **hormesis**, es un fenómeno relativamente común en los estudios de contaminación ambiental e implica una actividad adicional de la planta para intentar reponerse del estrés al que se le ha sometido (Calabrese y Baldwin, 2003; Calabrese, 2005). Dichos incrementos en las respuestas medidas no se detectan a niveles de contaminación más altos, pero se manifiestan en varias de las variables estudiadas.

### 6.4.2. Efectos sobre el crecimiento y desarrollo tempranos: morfología

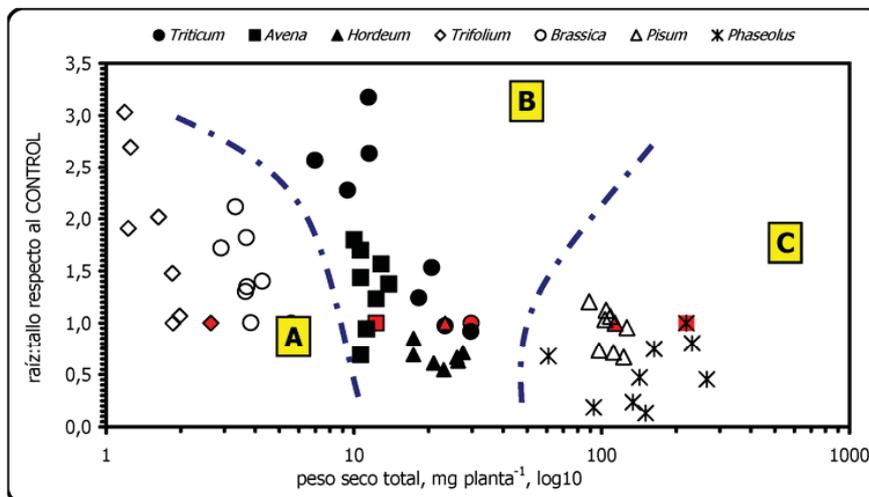
En general, el HCH afecta al desarrollo de las plántulas, limitándolo. Dado que la contaminación tiene su origen en el suelo, las raíces muestran los efectos de la presencia del HCH de modo más claro que los tallos. No obstante, la longitud de los tallos se ha visto severamente afectada en varias especies (*Triticum*, *Trifolium*, *Hordeum*). En general, las plantas **monocotiledóneas** responden negativamente. Dado que el desarrollo de la raíz determina la capacidad de la planta de adquirir los recursos (agua, nutrientes) del suelo circundante, un impacto del estrés en esta característica se refleja en el rendimiento fisiológico. En los estados iniciales del crecimiento esta dependencia de la raíz es mayor, reduciendo la capacidad fisiológica de las plantas para sobrellevar el estrés presente en el suelo. Los índices combinados estudiados (IVP y LRE; Tabla 6.5) siguen un patrón similar: las plantas monocotiledóneas presentan el mayor impacto. De este modo, la capacidad de explorar el sustrato y obtener los recursos para un correcto crecimiento se ve reducida en gran medida. Los desajustes a nivel bioquímico y morfológico descritos durante la germinación provocan que el desarrollo de la plántula esté desequilibrado desde un principio (radículas y raíces primarias con crecimiento disminuido; Dalvi y col. 1972). Esto puede influir decisivamente en la futura producción de biomasa de las plantas (Bidlan y col., 2004). La LRE es un modo de conocer como cada planta explora su entorno con eficacia y cómo será la translocación, dentro de la raíz y hacia el tallo, de los carbohidratos producidos (Boot y Mensink, 1990). Las plantas monocotiledóneas no sólo presentan valores relativamente bajos de LRE, sino que ésta se ve muy afectada por la presencia de HCH. En cambio, la respuesta de *Trifolium* y *Brassica* a la contaminación es la de movilizar los recursos de la planta hacia el desarrollo de la raíz (en peso y longitud), favoreciendo una LRE mayor en niveles bajos de HCH. No obstante, los niveles altos superan el umbral de esta respuesta. Esto incide en la importancia del nivel de contaminación en la respuesta de las plantas.

### 6.4.3. Efecto subletales del HCH: biomasa

Los efectos negativos descritos anteriormente indican que la **acumulación** de biomasa de las plantas utilizadas en este estudio disminuye. Las diferencias de acumulación de materia seca se manifiestan en las estructuras de sostén (tallos) frente a los tejidos fotosintéticos (el número medio de hojas tiende a descender en los niveles elevados de contaminación; datos no mostrados). Es decir, la respuesta general de las plantas ante esta situación de estrés, es acumular biomasa en la zona de sostén, cambiando la relación Raíz:Tallo, es decir, el **reparto relativo** de biomasa seca (Figura 6.4). Como se ha visto (Capítulo 5), la pendiente de ajuste biomasa seca de la raíz vs. biomasa seca de los tejidos aéreos es un indicio de cómo es el cociente entre las tasas de crecimiento de los tejidos implicados (Fitter y Hay, 2002). Un valor

de teórico de 1 supone que el cociente de las tasas de crecimiento es constante; en caso contrario (pendiente  $\neq 1$ ) el cociente de peso de la raíz (root weight ratio, RWR=peso raíz:peso planta;  $g\ g^{-1}$ ) cambiará con el tiempo a medida que la planta crezca (Farrar y Gunn, 1998). En este estudio, la pendiente aumenta paulatinamente (0.73 a  $>1$ ). La tendencia es entonces a que el cociente RWR disminuya, facilitando la acumulación progresiva de biomasa seca en el tallo. El hecho de encontrar una respuesta diferente a lo comentado en el CAPITULO 5 se relaciona con los niveles de contaminación tan elevados ensayados en este experimento. Asimismo, los daños se producen desde el momento de la germinación y no tan solo sobre el desarrollo temprano. A largo plazo, esta estrategia pretende favorecer la supervivencia de la planta, reparando así los daños causados durante la germinación con un aumento de biomasa aérea, favoreciendo la fotosíntesis.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se pueden distinguir tres grupos de plantas en función de la productividad y la estrategia frente al HCH (relación Raíz:Tallo) (Figura 6.6). El **Grupo A** lo constituyen plantas de baja productividad general que acumulan biomasa radicular (*Trifolium* y *Brassica*). El **Grupo B** se corresponde con las monocotiledóneas, de productividad media-alta, pero que responden a la contaminación favoreciendo la acumulación de reservas preferentemente en el tallo. Finalmente, el **Grupo C**, constituido por *Pisum* y *Phaseolus*, plantas de alta producción de biomasa y que tienden a mantener el desarrollo normal, lo cual les confiere, a corto plazo, una ventaja al favorecer la producción de tejidos fotosintéticos.



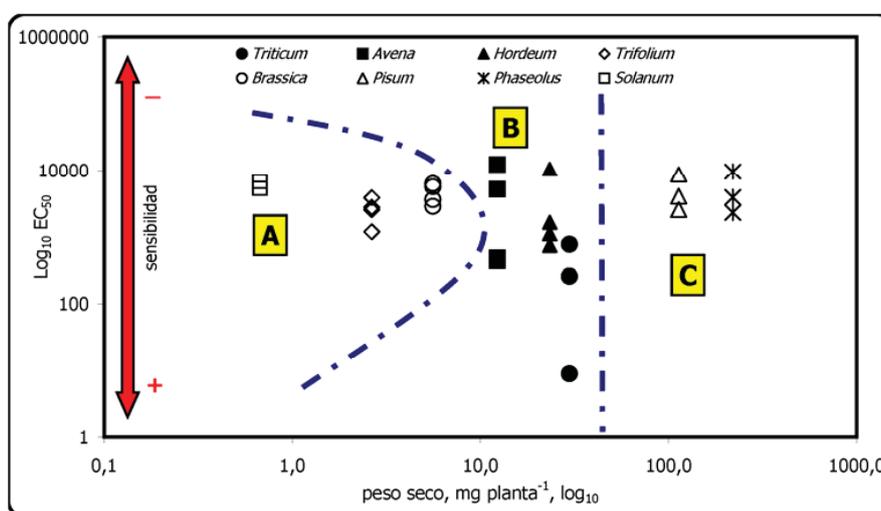
**Figura 6.6.** Representación de la relación Raíz:Tallo (en relación al tratamiento CONTROL) en función del peso seco total ( $mg\ planta^{-1}$ ,  $\log_{10}$ ). La relación no se ha podido calcular en el caso de *Solanum*.

#### 6.4.4. Toxicidad del HCH

Los valores de Concentración Efectiva ( $EC_x$ ) indican que la germinación no es una fase especialmente crítica. Los valores de  $EC_{10}$  y  $EC_{20}$  se pueden considerar como estimaciones del nivel de contaminación con efecto no observable (NSEO) o bien del nivel más bajo que no presenta contaminación

(NBEO). Estas concentraciones son calculadas de modo estadístico, sin una interpretación biológica directa; en todo caso se podrían asimilar a niveles de concentración segura para el desarrollo de los organismos (Crane y Newman, 2000).

No obstante, aplicando la regresión logística, se obtienen unos valores del parámetro  $EC_{50}$  relativamente más coherentes (Tabla 6.6). Las diferentes variables estudiadas muestran un respuesta particular para la contaminación con HCH, relacionada con la sensibilidad de cada planta. La comparación de los valores de  $EC_{50}$  obtenidos en este experimento y los resultados obtenidos en ensayos con otros contaminantes orgánicos (Tabla 6.7), indica que los valores de  $EC_{50}$  son altos. No obstante, dado el particular diseño de este experimento y las concentraciones utilizadas, la comparación directa no es posible. Hay que tener en cuenta, además, la influencia del tiempo de exposición y la etapa del desarrollo vegetal que se investigue.



**Figura 6.7.** Resumen de los valores de  $EC_{50}$  (escala logarítmica,  $\text{Log}_{10}$ ) más representativos en función de la biomasa seca total ( $\text{mg planta}^{-1}$ ,  $\text{Log}_{10}$ ). Ahora se ha podido incluir a *Solanum* en la representación. Las variables seleccionadas son: longitud de raíz, longitud del tallo, IVP y LRE.

Es posible establecer la **sensibilidad relativa** (en función de las variables analizadas y las especies utilizadas) para las condiciones de este experimento. Las variables más sensibles para estudiar la toxicidad del HCH en el suelo investigado son la longitud de raíz, la longitud del tallo, el IVP y la LRE. En función de éstas variables se puede estimar la sensibilidad de las plantas empleadas (Figura 6.7). El **Grupo A**, se corresponden con plantas sensibles (baja productividad; *Trifolium*, *Brassica* y ahora también *Solanum*;  $EC_{50}$  relativamente alto). El **Grupo B**, integra a las especies de sensibilidad media-baja (*Triticum*, *Avena*, *Hordeum*). Finalmente, el **Grupo C**, presenta valores de  $EC_{50}$  altos indicando baja sensibilidad (alta productividad; *Pisum* y *Phaseolus*) (Figura 6.7).

Efectos sobre la germinación y desarrollo inicial en suelo

**Tabla 6.7.** Resumen de los resultados más importantes obtenidos en otros estudios de toxicidad de pesticidas en plantas superiores (incluido el HCH).

Especie	Pesticida	Concentración	Respuesta	Efectos y razones tolerancia/sensibilidad	Referencia
Trigo <i>Triticum sp.</i>	18 productos	30 mg kg <sup>-1</sup>	sensible	inhibición del crecimiento; daño tisular; reducción en tasa de respiración de semillas	Lichtenstein y col., 1962.
Guisante <i>Pisum sp.</i> (y otras)	Incluye Lindano		tolerante	menor alcance del daño	
Sorgo <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench.	γ-HCH	0.01-1-10 microM	tolerante-	a concentraciones intermedias, aumento de crecimiento	Salazar y Paulsen, 1971.
Avena <i>Avena sativa</i> var. <i>Lodi</i>	Paration	6 mg kg <sup>-1</sup>	sensible	a concentraciones altas, descenso del crecimiento	Fuhremann y Lichtenstein, 1978
Arroz <i>Oryza sativa</i> L.	DDT y HCH	-	sensible	descenso de la tasa de respiración; descenso contenido en clorofila a y b, reducción de la concentración de almidón y azúcares	Verma y Pillai, 1991
Maiz <i>Zea mays</i>			sensible		
Lechuga <i>Lactuca sativa</i>	76 contaminantes prioritarios incluye β-HCH	1 a >1 000 (mg kg <sup>-1</sup> )	tolerante	valor EC <sub>50</sub> , basado en biomasa del tallo, >1 000 mg kg <sup>-1</sup>	Hulzebos y col., 1993.
Frijol- judía <i>Vigna sp.</i>	DDT	32-90 mg kg <sup>-1</sup>	tolerante	absorción y acumulación	Kiflom y col., 1999.
Raigrás <i>Lolium perenne</i>	p,p'-DDE	129-185-230 ng g <sup>-1</sup>	tolerante	degradación en la rizosfera	White, 2000.
Alfalfa <i>Medicago sativa</i>		0.1 a 0.2 mg kg <sup>-1</sup>	tolerante		
Rábano <i>Raphanus sp.</i>	HCH técnico	0.2-50 mg kg <sup>-1</sup>	sensible	reducción en el porcentaje de germinación y en el vigor de las plántulas	Bidlan y col., 2004.
Frijol verde <i>Vigna radiata</i>				reducción de la actividad de enzimas (lacasas y amilasas)	
Trigo <i>Triticum aestivum</i> L. (y otras) cv. Pandas	Imazamox	variable	sensibilidad variable	valores de EC <sub>50</sub> basados en inhibición del crecimiento (biomasa fresca del tallo)	Pannacci y col., 2006.
Trigo <i>Triticum aestivum</i>	Clorotoluron	0-25 mg kg <sup>-1</sup>	sensible	acumulación de especies reactivas de oxígeno; efectos bioquímicos (actividad peroxidasa y catalasa)	Song y col., 2007.

Esto permite, finalmente, establecer un **orden relativo de tolerancia** a la presencia del HCH total en el suelo (tolerancia decreciente, sensibilidad creciente): *Phaseolus*, *Pisum*>*Brassica*, *Trifolium*, *Solanum*>*Hordeum*, *Avena*>*Triticum*. *Triticum*, sería la especie menos adecuada para la continuación de los estudios en campo. Por otra parte, *Solanum* y *Trifolium*, dada su escasa productividad, no serían recomendables. El grupo formado por *Hordeum*, *Brassica*, *Pisum* y *Phaseolus* parece el más indicado para la continuación de los ensayos en condiciones de campo, al conjugar una tolerancia relativa alta y una productividad aceptable. *Phaseolus*, dado que no se ve afectada ni en la germinación ni en otras variables estudiadas y su destacable productividad, aún en condiciones adversas, se presenta como candidata para utilizar en fitocorrección.

## 6.5. CONCLUSIONES

Este experimento pone de manifiesto que el suelo experimental utilizado ejerce cierto efecto protector, especialmente durante la etapa de la germinación. No obstante, todas las especies utilizadas se ven afectadas por la presencia del HCH durante el desarrollo temprano. El HCH presenta efectos fitotóxicos sobre las especies investigadas, aunque esto depende de la especie particular. La intensidad de dichos efectos es variable en función de que variable se considere. La germinación es una variable poco sensible para detectar el efecto del HCH; el IVP y la variación de la longitud de tallos y raíces sí son variables aceptables. La producción de biomasa de las diferentes especies no se ve claramente afectada. No obstante, el reparto de la biomasa seca y con ello la actividad fisiológica están condicionados por el nivel de contaminación del suelo.

Este experimento ha permitido establecer un orden de sensibilidad creciente – tolerancia decreciente para las especies investigadas: *Phaseolus*, *Pisum*>*Brassica*, *Trifolium*, *Solanum*>*Hordeum*, *Avena*>*Triticum*. Básicamente, esto remite al tipo de planta (dicotiledónea vs. monocotiledónea). No obstante, se deben considerar otras características (productividad, viabilidad, valor económico), en la selección de especies candidatas a llevar a cabo la fitocorrección de suelos contaminados por HCH. En este sentido, *Hordeum*, *Brassica* y *Phaseolus* son las plantas que mejores resultados han ofrecido globalmente, tanto en los ensayos en disolución nutriente como en los ensayos en suelo contaminado. Estas especies se consideran apropiadas para llevar a cabo nuevos ensayos en campo.

## 6.6. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, G. y H. Duncan. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*, 120: 363-370.
- Alkorta, I. y C. Garbisu. 2001. Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology*, 79: 273-276.
- Amadori, E. 1993. The production and use of HCH. En: HCH and halogenated pesticides. State of art for risk assessment and technology development. IWU. Magdeburg. Págs. 11-13.
- Audus, L. J. 1976. *Herbicides. Physiology, Biochemistry, Ecology*. Vol. 1. Academic Press. London.
- Barriada-Pereira, M., M. J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez y E. Fernández-Fernández. 2005. Organochlorine pesticides accumulation and degradation products in vegetation samples of a contaminated area in Galicia (NW Spain). *Chemosphere*, 58: 1571-1578.
- Baskin, C. C. B., Jerry M. 1998. Ecologically meaningful germination studies. En: Baskin, C. C. B. y J. M. Baskin (Eds.), *Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press. San Diego. Págs. 5-26.
- Bewley, J. D. y M. Black. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*. Plenum Press. New York.

- Bidlan, R., M. Afsar y H. K. Manonmani. 2004. Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere*, 56: 803-811.
- Boot, R. G. A. y M. Mensink. 1990. Size and morphology of root systems of perennial grasses from contrasting habitats as affected by nitrogen supply. *Plant and Soil*, 129: 291-299.
- Calabrese, E. J. 2005. Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution*, 138: 378-411.
- Calabrese, E. J. y L. A. Baldwin. 2003. Hormesis: the dose-response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43: 175-197.
- Calvelo Pereira, R., M. Camps-Arbestain, B. Rodríguez Garrido, F. Macías y C. Monterroso. 2006. Behaviour of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environmental Pollution*, 144: 210-217.
- Calvelo Pereira, R., C. Monterroso, F. Macias y M. Camps-Arbestain. 2007. 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*, (2007), doi:10.1016/j.envpol.2007.11.009
- Chiapusio, G., A. M. Sánchez, M. J. Reigosa, L. González y F. Pellissier. 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *Journal of Chemical Ecology*, 23: 2445-2453.
- Crane, M. y M. C. Newman. 2000. What level of effect is a no observed effect? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 516-519.
- Dalvi, R. R., B. Singh y D. K. Salunkhe. 1972. Influence of selected pesticides on germination and associated metabolic changes in wheat and mung bean seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20: 1000-1003.
- Farrar, J. y S. Gunn. 1998. Allocation: allometry, acclimation and alchemy? En: Lambers, H., Poorter, H. y Van Vuren, M. M. I. (Eds.), *Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences*. Blackhuys Publishers. Leiden. Págs. 183-198.
- Fitter, A. H. y R. Hay. 2002. *Environmental Physiology of Plants*. Academic Press. San Diego.
- Fletcher, J. S., F. L. Johnson y J. C. McFarlane. 1988. Database assessment of phytotoxicity data published on terrestrial vascular plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7: 615-622.
- Fuhremann, T. W. y E. P. Lichtenstein. 1978. Release of soil-bound methyl [ $^{14}$ C]Parathion residues and their uptake by earthworms and oat plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 605-610.
- Gange, A. C., V. K. Brown y L. M. Farmer. 1992. Effects of pesticides on the germination of weed seeds: implications for manipulative experiments. *Journal of Applied Ecology*, 29: 303-310.
- Hopkins, H. T. 1952. Inhibition of growth by Benzene Hexachloride isomers and protective effect of glucose as measured by cell counting technique. *Plant Physiology*, 27: 526-540.
- Hoskins, W. M., J. M. Witt y W. R. Erwin. 1952. Bioassay of 1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane (Lindane). *Analytical Chemistry*, 24: 555-560.
- Hulzebos, E. M., D. M. M. Adema, E. M. Dirven-Van Breemen, L. Henzen, W. A. Van Dis, H. A. Herbold, J. A. Hoekstra, R. Baerselman y C. A. M. Van Gestel. 1993. Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 1079-1094.
- IUSS Working Group WRB. 2006. World reference base for soil resources 2006. Segunda Edición. World Soil Resources Report Nº. 103. FAO, Roma.
- Kechavarzi, C., K. Pettersson, P. Leeds-Harrison, L. Ritchie y S. Ledin. 2007. Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. *Environmental Pollution*, 145: 68-74.
- Kidd, P., A. Prieto-Fernández, C. Monterroso y M. J. Acea. 2008. Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant and Soil*, 302: 233-247.
- Kiflom, W. G., S. O. Wandiga, P. K. Ng'ang'a y G. N. Kamau. 1999. Variation of plant p,p'-DDT uptake with age and soil type and dependence of dissipation on temperature. *Environment International*, 25: 479-487.
- Kostoff, D. 1948. Atypical growth, abnormal mitosis, polyploidy and chromosome fragmentation induced by hexachlorocyclohexane. *Nature*, 162: 845-846.
- Lichtenstein, E. P., W. F. Millington y G. T. Cowley. 1962. Insecticide effects on plant growth, effect of various insecticides on growth and respiration of plants. *Journal of Food and Agricultural Chemistry*, 10: 251-256.
- Mackova, M., D. N. Dowling y T. Macek. 2006. *Phytoremediation and Rhizoremediation: Theoretical background*. Springer. Doordrecht.
- Medina, V. F., M. Marmiroli, E. Maestri, A. C. Dietz y S. C. McCutcheon. 2003. Plant tolerances to contaminants. En: McCutcheon, S. C. y Schnoor, J. L., (Eds.), *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants*. Wiley Interscience. Hoboken, New Jersey. Págs. 189-232.
- Merkel, N., R. Schultze-Kraft y C. Infante. 2005. Phytoremediation in the tropics - influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environmental Pollution*, 138: 86-91.
- Metcalf, R. L. 1955. *Organic insecticides: Their chemistry and mode of action*. Interscience Publishers. New York.
- Miglioranza, K. S. B., J. E. Aizpún De Moreno, V. J. Moreno, M. L. Osterrieth y A. H. Escalante. 1999. Fate of organochlorine pesticides in soils and terrestrial biota of "Los Padres" pond watershed, Argentina. *Environmental Pollution*, 105: 91-99.
- Moore, D. R. J. y P.-Y. Caux. 1997. Estimating low toxic effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16:

- 794-801.
- Newman, M. C. y M. A. Unger. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. CRC Press. Boca Raton.
- Pannacci, E., A. Onofri y G. Covarelli. 2006. Biological activity, availability and duration of phytotoxicity for imazamox in four different soils of central Italy. *Weed Research*, 46: 243-250.
- Potters, G., T. P. Pasternak, Y. Guisez, K. J. Palme y M. A. K. Jansen. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12: 98-105.
- Roselló, J. A. y M. Mayol. 2002. Seed germination and reproductive features of *Lysimachia minoricensis* (Primulaceae), a wild-extinct plant. *Annals of Botany*, 89: 559-562.
- Sainz, M. J., B. González-Penalta y A. Vilarinho. 2006. Effects of hexachlorocyclohexane on rhizosphere fungal propagules and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Plantago lanceolata*. *European Journal of Soil Science*, 57: 83-90.
- Salazar, A. G. y G. M. Paulsen. 1971. Physiological responses of *Sorghum bicolor* to Benzene Hexachloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19: 1005-1007.
- Salt, D. E., R. D. Smith y I. Raskin. 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 643-668.
- Shi, Y., Y. Shi, X. Wang, Y. Lu y S. Yan. 2007. Comparative effects of lindane and deltamethrin on mortality, growth, and cellulase activity in earthworms (*Eisenia fetida*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89: 31-38.
- Song, N. H., X. L. Yin, G. F. Chen y H. Yang. 2007. Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. *Chemosphere*, 68: 1779-1787.
- Suntio, L. R., W. Y. Shiu, D. Mackay, J. N. Seiber y D. Glotfelty. 1988. Critical review of Henry's law constants for pesticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 103: 1-59.
- USC. 2003. Evaluación y bioremediación de suelos contaminados con isómeros de HCH en el Polígono de Torneiros, Porriño (Pontevedra). Informe Final de Proyecto. Universidad de Santiago de Compostela.
- Verma, A. y M. K. K. Pillai. 1991. Bioavailability of soil-bound residues of DDT and HCH to certain plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 23: 347-351.
- Vijgen, J. 2006. The legacy of lindane HCH isomer production. International HCH and Pesticides Association. URL: <http://www.ihpa.info/docs/library/Lindane%20Main%20Report%20DEF20JAN06.pdf>.
- Weber, J. B. y C. T. Miller. 1989. Organic chemical movement over and through soil. En: Sawhney, B. L. y Brown, K. W. (Eds.), *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Soil Science Society of America. Madison, Wiscconsin. Págs. 305-334.
- White, J. C. 2000. Phytoremediation of weathered *p,p'*-DDE residues in soil. *International Journal of Phytoremediation*, 2: 133-144.
- Wieczorek, J. K. y Z. J. Wieczorek. 2007. Phytotoxicity and accumulation of anthracene applied to the foliage and sandy substrate in lettuce and radish plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 369-377.

## **CONCLUSIONES GENERALES**



## CONCLUSIONES GENERALES

---

Las **conclusiones generales** obtenidas en este trabajo se pueden resumir del siguiente modo:

1. Los suelos agrícolas de Galicia presentan niveles relativamente elevados de los isómeros de HCH más importantes ( $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH). A pesar de esto, no se pueden considerar como contaminados en base a la legislación vigente. La presencia del HCH en los suelos agrícolas de Galicia ha sido causada por el uso prolongado de productos conteniendo tanto HCH técnico como lindano. Es posible establecer una secuencia temporal aproximada: inicialmente se ha utilizado el HCH técnico y con posterioridad el lindano. No puede descartarse, no obstante, que la utilización de ambos pesticidas coincidiese en el tiempo. En todo caso, es probable que se trate de una contaminación antigua (iniciada a partir de la década de 1950). La presencia de un "fondo" de isómero  $\alpha$ -HCH en los suelos agrícolas de Galicia indica que otros procesos (Transporte a Larga Distancia) han actuado sobre los pesticidas depositados en los suelos.
2. Las plantas que son capaces de crecer en zonas contaminadas acumulan HCH (isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) en sus tejidos, con lo que se confirman como un sumidero de este tipo de compuestos. La importancia de la bioacumulación depende de la concentración inicial del contaminante en el suelo, de las propiedades físico-químicas de cada isómero (fundamentalmente la hidrofobicidad y la volatilidad), y el tipo de especie vegetal y de tejido que se considere. En general, son los tejidos aéreos (principalmente las hojas) los que acumulan las mayores concentraciones de todos los isómeros de HCH ( $HCH_{\text{biomasa aérea}}/HCH_{\text{raíz}} > 1$ ). Se confirma que el mecanismo de acumulación del HCH en los tejidos vegetales es un proceso isómero-selectivo, favoreciendo la acumulación de  $\beta$ -HCH. La incorporación de los tejidos vegetales contaminados en el suelo influye, entre otros procesos, a la acumulación preferente del isómero  $\beta$ -HCH en el horizonte superficial de los suelos, en comparación con las cantidades presentes en el residuo original.
3. El estudio del efecto rizosfera indica que la especie vegetal tiene influencia en la solubilidad acuosa de los distintos isómeros de HCH, aumentando ésta por lo general, y con ello afectando a la biodisponibilidad de estos compuestos. La concentración de HCH se reduce en el entorno radicular.
4. La volatilización del HCH a partir del suelo contaminado y la posterior deposición del compuesto sobre la biomasa aérea de las plantas es probablemente el principal mecanismo que explica la presencia y comportamiento de los isómeros de HCH (especialmente,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -HCH) en tallos y hojas. No obstante, la ruta partícula  $\rightarrow$  planta no puede ser descartada. En todo caso, no se produce absorción-translocación.
5. En general, el crecimiento de las plantas en disolución nutriente se ve afectado por la presencia de HCH, a pesar de las relativamente bajas concentraciones utilizadas. El vigor de todas las especies utilizadas se ha visto reducido, conduciendo a una menor supervivencia y a un descenso de productividad en muchas de las plantas. Las variables clave a la hora de evaluar la toxicidad y el estrés producido por el HCH han sido la Transpiración Relativa Normalizada y la Eficiencia de la Producción en el Uso del Agua. La producción neta de

## CONCLUSIONES GENERALES

---

biomasa no parece muy afectada, mientras que el reparto de la misma si se ve alterado por la presencia del HCH. La respuesta común de todas las plantas es favorecer la acumulación de biomasa seca en las raíces para superar la situación de estrés, con lo que disminuye a largo plazo la fotosíntesis y el vigor del vegetal.

6. El suelo experimental empleado ejerce un cierto efecto protector durante la etapa de la germinación, facilitando así la supervivencia inicial de las plantas. No obstante, todas las especies utilizadas se ven afectadas por la presencia del HCH, que causa fitotoxicidad sobre las plantas investigadas. El efecto negativo depende de la especie particular. La intensidad del estrés es variable en función de que parámetro de la fisiología se considere. La germinación es una variable poco sensible para detectar el efecto del HCH; el IVP y la variación de la longitud de tallos y raíces si son variables aceptables. La producción de biomasa de las diferentes especies no se ve claramente afectada. No obstante, el reparto de la biomasa seca y con ello la actividad fisiológica, si se condicionan con el nivel de contaminación del suelo.
7. Respecto a la posible utilización de plantas en estudios de fitocorrección en suelos contaminados, los experimentos en campo indican que *Cytisus striatus* (Hill) Roth. es una candidata idónea para su la fitocorrección de los suelos de la zona de Torneiros. Por otro lado, los experimentos de invernadero han permitido establecer un orden relativo de sensibilidad-tolerancia de las diferentes plantas investigadas ante la presencia de HCH. Básicamente, esto remite al tipo de planta (monocotiledónea – dicotiledónea). No obstante, se deben considerar otras características (productividad, viabilidad, valor económico), en la selección final de especies. En este sentido, *Hordeum vulgare* L., *Brassica* sp. y *Phaseolus vulgaris* L. son las plantas que mejores resultados han ofrecido globalmente, tanto en los ensayos en disolución nutriente como en los ensayos en suelo contaminado. Estas especies se consideran apropiadas para llevar a cabo experimentos en campo en la zona contaminada de Torneiros.