
This is the **published version** of the master thesis:

Conesa Bernat, Helen; Fernández Verdejo, David Juan (tut.); Salom Bermudez, Daniel (tut.). *Efecte dels surfactants en la biodegradació del lindà adsorbit a la matriu sòlida d'un aquífer contaminat emprant cultius que contenen bacteris del gènere Shewanella i Pseudomonas*. (Universitat Autònoma de Barcelona), 2026 (Enginyeria Biològica i Ambiental)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/336549>

under the terms of the  license.

**Efecte dels surfactants en la
biodegradació del lindà adsorbit a
la matriu sòlida d'un aqüífer
contaminat emprant cultius que
contenen bacteris del gènere
Shewanella i *Pseudomonas***

HELEN CONESA BERNAT

MÀSTER EN ENGINYERIA BIOLÒGICA I AMBIENTAL

**SUPERVISORS: DAVID JUAN FERNÁNDEZ VERDEJO, DANIEL
SALOM BERMÚDEZ I ERNEST MARCO URREA**

FEBRER 2026

Continguts

Resum.....	3
Continguts clau.....	3
1. Introducció	4
2. Materials i Mètodes.....	10
3. Resultats i Discussió.....	13
4. Conclusions.....	20
Reconeixements	21
Bibliografia	21

Llista de Figures

Figura 1. Reducció anaeròbia del lindà.....	6
Figura 2. Via de degradació del catecol en <i>Pseudomonas sp.</i>	7
Figura 3. Concentració de la solubilitat del lindà.....	13
Figura 4. Evolució de la concentració de MCB i BZ en <i>Shewanella sp.</i>	15
Figura 5. Evolució de la concentració de MCB en <i>P. veronii</i>	16
Figura 6. Evolució de les concentracions de MCB i BZ en <i>Shewanella sp.</i> i sòl.....	18

Resum

Aquest estudi avalua l'efecte dels surfactants Dodecil Sulfat Sòdic (SDS), Tween 80 (T80) i E-Mulse 3® (E3) en la biodegradació de lindà, monoclorobenzè (MCB) i benzè per consorcis enriquits en *Shewanella* sp. i purs de *Pseudomonas veronii*. Els surfactants incrementen la solubilitat del lindà, però poden alterar l'activitat microbiana: el SDS a 1 g/L inhibeix la degradació en *Shewanella*, mentre que T80 i E3 només en redueixen la velocitat. La degradació del MCB per *P. veronii* no es veu afectada. En sòls contaminats, l'ús de surfactants és essencial per garantir la biodisponibilitat del lindà, destacant la importància de seleccionar-los adequadament en estratègies de bioremediació.

Paraules clau: Lindà, Monoclorobenzè, *Shewanella*, *Pseudomonas*, SDS, Tween 80, E-Mulse 3®.

Continguts clau

- Els surfactants augmenten la solubilitat del lindà en aigua fins a un 94%.
- El SDS inhibeix *Shewanella* sp. a 1 g/L, però *P. veronii* és més tolerant.
- El Tween 80 i l'E-Mulse 3® són compatibles amb la bioremediació anaeròbia.
- L'ús de surfactants és clau per degradar el lindà adsorbit en sòls reals.

1. Introducció

1.1. Origen del contaminant, normativa i emplaçament principal

El lindà, conegut químicament com l'isòmer gamma de l'1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexà (HCH), és un pesticida organoclorat que es va utilitzar massivament a tot el món com a insecticida d'ampli espectre durant el segle XX [1]. La seva aparició i adopció no es poden separar del context bèl·lic, ja que els historiadors emfatitzen que el control industrial de plagues ha estat estretament entrellaçat amb les lògiques i els materials de la guerra química des de finals del segle XIX. Després de la Segona Guerra Mundial, els mètodes de producció de nitrogen per a explosius es van adaptar per a fertilitzants, i els productes químics utilitzats per combatre vectors de malalties durant el conflicte es van redirigir cap al control de plagues agrícoles [2]. Aquest llegat de "guerra tòxica" va convertir substàncies com el lindà en eines fonamentals de la "Revolució Verda", un procés d'intensificació agrícola que va introduir noves formes de violència lenta i invisible contra el medi ambient i els cossos dels treballadors [3].

La producció del lindà s'obté a partir de la fotocloració del benzè (BZ) mitjançant radiació UV, un procés que genera una barreja de diferents isòmers coneguda com a "HCH tècnic". Aquesta barreja conté principalment els isòmers α - (55-80%), β - (5-14%), γ - (8-15%), δ - (2-16%) i ϵ -HCH (3-5%). Les diferències principals entre els isòmers són la volatilització de l'isòmer β -HCH, que és inferior al γ -HCH, i que el aquest darrer és l'únic isòmer amb propietats insecticides efectives. Així doncs, l'"HCH tècnic" se sotmet a un procés de purificació mitjançant cristallització fraccionada per obtenir el producte comercial (lindà) amb una puresa superior al 99% [1].

Aquesta estratègia industrial ha resultat històricament molt ineficient i altament contaminant. Per cada tona de lindà purificat que es produeix, es generen aproximadament entre 6 i 12 tones de residus d'altres isòmers d'HCH que no tenen utilitat comercial. Durant dècades, aquests residus van ser abocats de manera inadequada en piles obertes o en abocadors sense revestir prop de les plantes de fabricació, estimant-se que entre 4 i 7 milions de tones d'aquests residus perillosos s'han dispersat per tot el món [4].

La perillositat dels isòmers de l'HCH se centra en les seves propietats químiques: són persistents i bioacumulables en els teixits vius. S'han documentat efectes tòxics greus en els éssers humans i el medi ambient, incloent alteracions en els sistemes nerviós, immunològic i endocrí, potencials efectes carcinògens i desordres reproductius [5]. A causa d'aquest perfil de toxicitat, l'Estat Espanyol va regular els nivells de referència a un màxim de 1 mg/kg de pes sec, contemplat dins

de l'annex 5 del Real Decret 9/2005, del 14 de gener, pel que s'estableix la relació d'activitats potencialment contaminadores del sòl i els criteris i estàndards per a la declaració de sòls contaminats. Després, la Unió Europea va prohibir tots els seus usos l'any 2008 (Reglament (CE) núm. 850/2004). Posteriorment, al maig del 2009, els isòmers α -, β - i γ -HCH van ser inclosos en el Conveni d'Estocolm sobre Contaminants Orgànics Persistents (POP per les sigles en anglès) fent que el seu tractament s'hagi d'abordar a nivell mundial, incloent-hi les reserves obsoletes i els grans volums de residus que queden com a llegat de la producció [6].

Un dels exemples més crítics d'aquest llegat de contaminació a Europa es troba a Sabiñánigo (Osca, Espanya). Entre 1975 i 1988, l'empresa INQUINOSA va abocar de manera inadequada i il·legal un mínim de 115.000 tones de la resta d'isòmers d'HCH no aplicables com insecticides en els dos dels abocadors no impermeabilitzats de les localitats properes de Sardas i Bailín. Aquesta acció ha convertit la zona en un dels dipòsits d'HCHs més grans del món, provocant la migració de substàncies tòxiques a través del subsol. Com a resultat, es van detectar aproximadament 4.000 tones de líquids de fase densa no aquosa (DNAPL) que contaminen els dipòsits al·luvials i representen una amenaça directa per al riu Gállego [7].

Després de retirar la fase lliure del DNAPL, els esforços se centren en la remediació d'aquests emplaçaments, una tasca complexa a causa de la baixa conductivitat hidràulica de capes com els llims, la persistència dels contaminants i la seva gran concentració. Les tecnologies estudiades inclouen des de mètodes fisicoquímics com l'extracció de vapor o l'oxidació química *in situ* (ISCO), fins a la bioremediació. La bioestimulació *in situ* es presenta com una alternativa sostenible i de baix cost, ja que aprofita la capacitat de certs microorganismes autòctons per degradar els clorobenzens i els isòmers d'HCH tant en condicions aeròbiques (oxidatives) com anaeròbiques (reductives). Tanmateix, l'èxit d'aquestes intervencions depèn de factors com la presència de microorganismes autòctons capaços de degradar els contaminants, de la complexitat geoquímica del lloc i de la capacitat de fer arribar els nutrients i acceptors d'electrons a les zones contaminades [8]. En conseqüència, l'estudi dels microorganismes capaços de degradar el lindà és essencial per a assegurar la viabilitat dels processos de bioremediació. S'ha observat que l'aqüífer conta amb els microorganismes capaços de transformar els contaminants presents a Sardas: isòmers de pentaclorobenzè, tetraclorobenzè, triclorobenzè, diclorobenzè, HCH, heptaclorociclohexè, hexaclorohexè i pentaclorociclohexè, conjuntament amb MCB i BZ [7]. Aquests microorganismes degradadors pertanyen a gèneres com *Acidovorax*, *Lutibacter*, *Rhodoferax*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* i *Shewanella* [1].

1.2. Consorcis bacterians aïllats de l'emplaçament

La bioremediació ofereix una alternativa al tractament del lindà en lloc de la seva oxidació química, un procés que comporta el risc de generar productes intermedis més tòxics, com ara les dioxines o fenols policlorats [9].

Durant els últims anys, el grup de recerca BioemUAB ha estudiat la capacitat de bioestimulació de l'emplaçament de Sabiñánigo en diferents condicions (anaeròbia i aeròbia) i addicionant nutrients (nitrat, fòsfor o lactat), i s'han obtingut dos cultius microbians al laboratori aplicant transferències successives a medi definit i tècniques com la dilució fins a l'extinció. En primer lloc, s'ha aïllat un consorci anaerobi enriquit en *Shewanella sp.*, que transforma els isòmers de HCH a MCB i BZ, i en segon lloc, un cultiu aerobi pur de *Pseudomonas veronii* que mineralitza el MCB i BZ. La ruta de degradació anaeròbia del lindà condueix a la formació majoritària de MCB amb traces de BZ per l'activitat de bacteris dehalorespiradors que utilitzen hidrogen com a donador d'electrons. Les rutes descrites a la bibliografia relatives a la reducció del lindà a MCB i BZ estan representades a la *Figura 1*. Paralelament, el gènere de *Pseudomonas* és capaç de mineralitzar en condicions aeròbies el MCB i el BZ fins a CO_2 , incorporant-los al cicle de Krebs com a Succinil-coA o Acetil-CoA i emprant-los com a substrat per al seu creixement [10], en un procés esquematitzat a *Figura 2*.

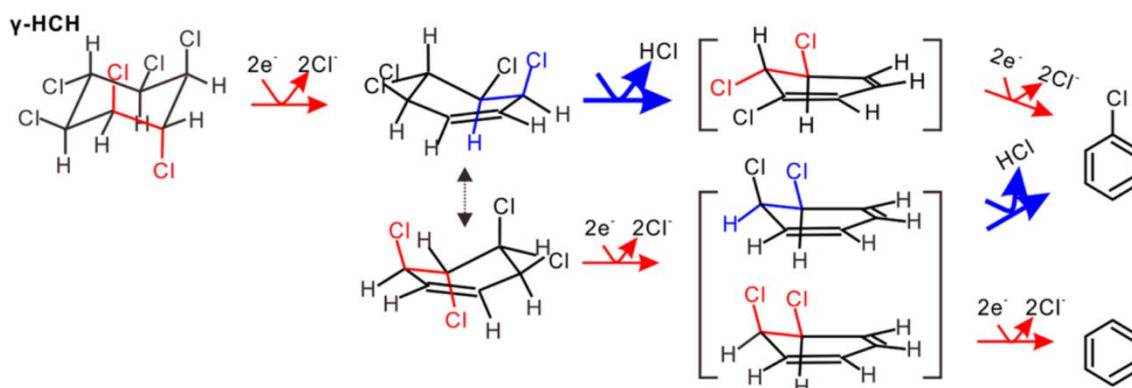


Figura 1. Vies descrites per a la dechloració de l'isòmer γ - HCH. Les estructures es van dibuixar a ChemDraw (v16). Les fletxes més gruixudes representen les reaccions més favorables en aquest pas. Els enllaços i substituents acolorits a cada molècula representen la ubicació on tenen lloc les reaccions [11].

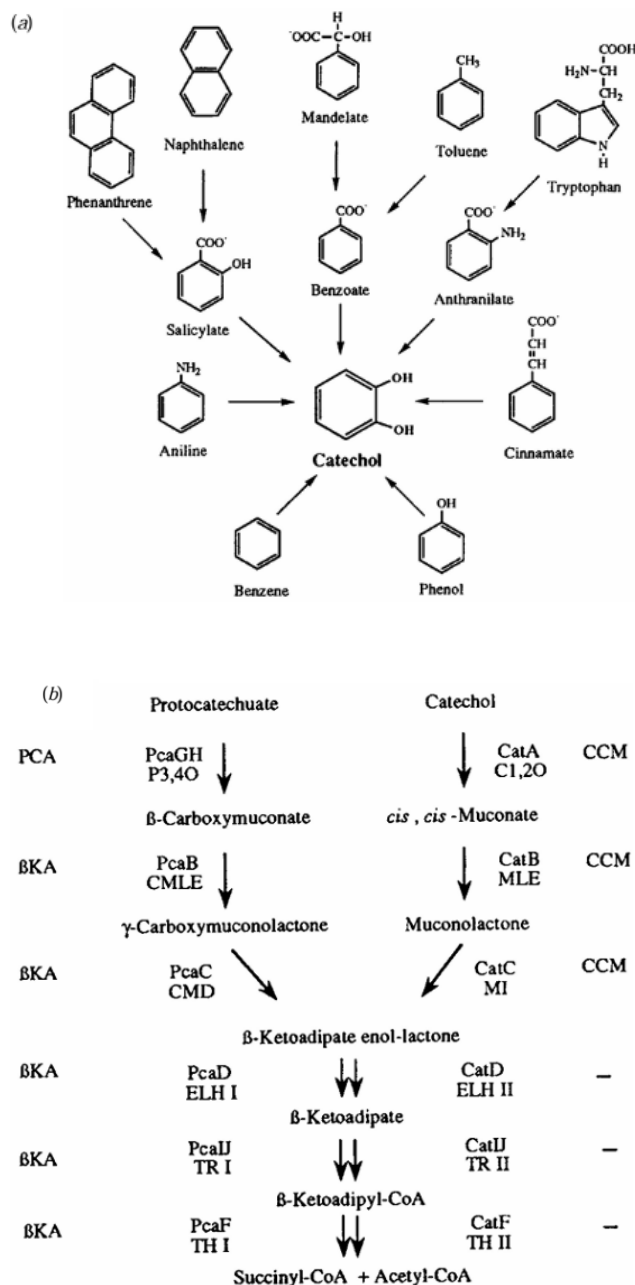


Figura 2. Compostos canalitzats cap a (a) catecol i (b) enzims i inductors utilitzats per la ruta de degradació del catecol mitjançant la regulació de la via del β -ketoàdipat en *Pseudomonas*. Les abreviacions dels enzims: P3,4O, protocatecuat 3,4-dioxigenasa; CMLE, enzim lactonitzant de *cis,cis*-muconat- γ -carboxi; CMD, descarboxilasa de γ -carboximucònilactona; C1,2O, catecol 1,2-dioxigenasa; MLE, enzima lactonitzant de *cis,cis*-muconat; MI, isomerasa de muconolactona; ELH, hidrolasa d'enollactona; TR, ketoàdipat:transferasa de succinil-CoA; TH, tioelasa de ketoàdipil-CoA. Les abreviacions dels inductors: CML, γ -carboximucònilactona; β KA, β -ketoàdipat; PCA, protocatecuat; CCM, *cis,cis*-mucònat; (—) indica que l'enzim no està present [12].

1.3. Ús i aplicació de surfactants en la remediació de l'emplaçament de Sabinánigo

L'emplaçament de Sardas ha estat objecte de diverses estratègies de remediació. Entre altres, s'han empleat dos tipus de surfactants destinats a facilitar l'extracció i posterior tractament dels residus de lindà [13]. D'una banda, s'ha aplicat l'E-Mulse 3® (E3), un surfactant comercial no iònic i biodegradable seleccionat per la seva elevada capacitat de solubilitzar contaminants orgànics i per la seva compatibilitat amb processos d'oxidació química [14]. En aquest cas s'ha emprat a l'emplaçament seguint les tecnologies de remediació de SEAR (*Surfactant-Enhanced Aquifer Remediation*) orientat a mobilitzar el DNAPL mitjançant injecció i extracció, i de *Surfactant In-Situ Chemical Oxidation* (S-ISCO), que combina la injecció de surfactants amb oxidants per promoure la degradació *in situ* [15]. Per altra banda, el Dodecil Sulfat Sòdic (SDS), un surfactant aniònic, s'ha utilitzat sobretot en assajos de laboratori i en processos d'electroremediació per estudiar la mobilitat dels contaminants sota camps elèctrics [13].

S'ha observat que el SDS pot interferir en els processos d'oxidació química, ja que les micelles que forma poden repellar els agents oxidants i impedir-ne l'accés al contaminant, fet que fa necessària l'addició de cations que neutralitzen aquestes càrregues, reduint la repulsió electrostàtica i facilitant que el surfactant s'adsorbeixi al sòl [16]. D'altra banda, l'E3 mostra un comportament més equilibrat entre la solubilització i l'oxidació química posterior [17].

Per altra banda, el surfactant Tween 80 (T80) no s'ha aplicat a l'emplaçament de Sardas, però sí a altres emplaçaments reportats a la bibliografia. Segons Xu et al. (2024) [18], el T80 incrementa la solubilitat aparent dels contaminants hidròfobs mitjançant la formació de micelles, fet que facilita la transferència dels isòmers de l'HCH des de la matriu sòlida cap a la fase aquosa. Tanmateix, la seva interacció amb minerals argilosos, especialment la bentonita (argila de gra fi que conté bases i ferro), pot provocar un augment de l'espai interlaminar i, com a conseqüència, una pèrdua d'aigua i una contracció volumètrica del sòl. Aquest procés pot generar clivelles que afavoreixen la migració de contaminants com el MCB cap a estrats més profunds [19]. El T80 presenta una elevada afinitat per les argiles, de manera que calen concentracions altes per saturar els llocs d'adsorció i garantir que la fracció no adsorbida sigui efectiva en la solubilització del contaminant. No obstant això, concentracions excessives poden generar un efecte competitiu, en què les micelles en solució redueixen l'eficàcia del surfactant adsorbit i, per tant, disminueixen el rendiment global de la remediació [20].

L'aplicació d'aquests agents químics genera diversos efectes sobre la matriu geològica i el comportament dels contaminants. En primer lloc, la reducció de la tensió superficial afavoreix la solubilització i desorció de compostos hidrofòbics

com els clorobenzens i l'HCH, facilitant-ne el pas a la fase aquosa i, per tant, possibilitant la seva extracció i posterior oxidació [14]. En segon lloc, s'ha constatat que una fracció significativa del surfactant queda adsorbida als materials geològics locals, formats majoritàriament per gresos (sorra sedimentaria d'entre 2 i 1/16 mm de diàmetre que pot contenir ferro, calci, sofre, silici i coral) i llims (partícules del sòl d'entre 1/16 i 1/256 mm de diàmetre). Aquest fet disminueix la concentració efectiva disponible a la fase líquida per a la remediació i obliga a incrementar la dosi empleada per tal de superar la capacitat d'adsorció del sòl [15].

Un altre paràmetre que afecta als resultats és l'envelliment de la contaminació, que amb més de tres dècades d'interacció amb la matriu sòlida, dificulta notablement la desorció i extracció dels contaminants fins i tot en presència de surfactants [21].

Tot i els avenços en la remediació del lindà, l'ús de surfactants en tecnologies com SEAR i S-ISCO continua presentant incerteses [18, 22], especialment pel que fa al seu impacte sobre els microorganismes responsables de la biodegradació. La bioremediació és una alternativa més econòmica i menys generadora de subproductes tòxics que l'oxidació química, i pot integrar-se amb tractaments basats en surfactants, però encara es desconeix fins a quin punt aquests compostos poden inhibir o modificar l'activitat de bacteris com *Shewanella sp.* i *Pseudomonas veronii*. La bibliografia mostra efectes molt variables segons el tipus i la concentració del surfactant, sense que existeixi una conclusió clara sobre la seva influència en la degradació del lindà i dels seus intermedis de degradació [20].

Aquesta manca d'informació és crítica per al disseny de tractaments *in situ*, on la desorció dels contaminants sovint depèn de l'ús de surfactants. Per això, l'objectiu del treball és estudiar l'efecte de diferents surfactants sobre la biodisponibilitat i la degradació dels contaminants a l'emplaçament de Sabiñánigo (HCH, MCB i BZ) en cultius amb *Shewanella sp.* i *Pseudomonas veronii*.

2. Materials i Mètodes

2.1 Preparació dels microcosmos

Els microcosmos consisteixen en ampolles de sèrum de vidre de 100 mL de volum total, tancades hermèticament amb septes de butil teflonats i xapes d'alumini per evitar la pèrdua dels compostos volàtils i mantenir les condicions anaeròbies, si s'escau. Els microcosmos s'omplen amb 70 mL de medi sintètic formulat específicament per a cada gènere bacterià.

El consorci que conté *Shewanella* sp. es cultiva en un medi definit que assegura un ambient altament reductor. Aquest medi inclou 3 mM de lactat com a font de carboni, vitamines, 0.01 M de NaHCO_3 com a tampó, sals essencials (2.9 g/L KH_2PO_4 , 3.9 g/L NH_4Cl , 14.3 g/L NaCl , 5.9 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7.4 g/L KCl i 0.2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i metalls traça (0.3 mg/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.001 mg/L ZnCl_2 , 0.001 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.003 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, <0.001 mg/L H_3BO_3 , <0.001 mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, <0.001 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.01 mM NaHCO_3). Per mantenir un potencial redox baix, s'hi afegeix 0.29 mM de citrat de titani (III) com a agent reductor, i per promoure la disponibilitat dels components se li afegeix 1.8 g/L d'àcid nitriloacètic (NTA). Els microcosmos reben una sobrepressió d'una mescla de N_2/CO_2 (4:1, v/v, 0.2 bar) i H_2 (0.4 bar) com a donador d'electrons. Per obtenir l'anaerobiosi del medi, s'aplica primer un buit durant 45 minuts per eliminar l'oxigen dissolt. Tot seguit, es purga l'aigua amb nitrogen durant uns 20 minuts per retirar-ne qualsevol resta d'oxigen residual.

El cultiu de *P. veronii* es cultiva en un medi aerobi que conté les següents concentracions de sals minerals i de metalls traça: 1.01 g/L KNO_3 , 1.3 g/L NH_4Cl , 1.36 g/L KH_2PO_4 , 1.42 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.07 mg/L ZnCl_2 , 0.039 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.54 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.036 mg/L $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.19 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.86 mg/L H_3BO_3 , i 12.8 mg/L de l'agent quelant NTA. També s'hi afegeixen vitamines per potenciar l'activitat metabòlica i s'hi afegeix una sobrepressió de 0.5 bar d' O_2 .

Totes les manipulacions relatives als cultius anaerobis es duen a terme dins d'una cambra anaeròbia amb atmosfera controlada de nitrogen i hidrogen amb l'objectiu de facilitar la transició del sòl cap a condicions estrictament anaeròbies i evitar qualsevol entrada d'oxigen que pugui comprometre l'activitat microbiana. Els cultius es dopen amb el contaminant a degradar (lindà o MCB), i es conserven en una cambra termostàtica a 25 °C en absència de llum en condicions estàtiques. A més, es realitzen transferències periòdiques d'aproximadament un 5% del volum cap a medi fresc quan s'ha degradat prop del 80% de la dosi anterior, assegurant així la continuïtat i la viabilitat del cultiu.

2.2 Preparació d'estoc dels surfactants

Es preparen diversos estocs anaeròbics de surfactants amb l'objectiu de disposar de solucions utilitzables indistintament en condicions aeròbies i anaeròbies. Es formulen les concentracions en funció de la densitat de cada compost, s'afegeixen les quantitats corresponents de surfactant a un volum final de 100 mL d'aigua ultrapura. En el cas del Tween 80, amb una densitat de 1.064 g/cm^3 , s'incorporen 6.5 g de producte, per a l'E-Mulse 3®, amb una densitat de 1.010 g/cm^3 , s'afegeixen 7.0 g i per al SDS, essent un compost sòlid, es dissolen 7.1 g per obtenir la concentració desitjada. Per tal de garantir condicions estèrils, tots els estocs de surfactants es filtren mitjançant xeringa a un filtre de diflorur de polivinilidè (PVDF) (Branchia, $0.22 \mu\text{m}$ i $\varnothing 13 \text{ mm}$).

2.3 Preparació de surfactants experimentals

De manera posterior a la secció anterior, s'estableixen 7 mostres amb 70 mL d'aigua Mili-Q i $500 \mu\text{M}$ de lindà. A la mostra control no se li afegeix cap surfactant, a la resta, se li afegeix 0.2 g/L i 1 g/L dels estocs de cada surfactant preparat. Totes les mostres de surfactant tenen un duplicat.

2.4 Preparació dels microcosmos amb *Shewanella* sp. o *P. veronii* amb surfactants

Per a ambdós gèneres bacterians es realitzen un duplicat de control negatiu, on només s'hi afegeix el medi preparat de la secció 2.1, *Shewanella* sp. o *P. Veronii* (transferit al 5 % v/v), i $500 \mu\text{M}$ de lindà i $800 \mu\text{M}$ de MCB, respectivament. En el control negatiu no se li afegeix mai surfactant. Per altra banda, els controls biòtics consisteixen en medi de cultiu amb el microorganisme corresponent sense dopar amb contaminant.

Per a la resta de microcosmos, es fan duplicats amb les condicions darrerament esmentades i s'apliquen 0.2 g/L i 1 g/L dels estocs de cada surfactant preparat a la secció 2.2.

2.5 Preparació dels microcosmos experimentals amb sòl

Per simular les condicions de l'aqüífer, s'introdueix sòl contaminat amb $40 \mu\text{M}$ HCHs procedent de l'emplaçament de Sardas en microcosmos preparats segons la metodologia descrita a la secció anterior.

A cada microcosmos se l'hi afegeixen 10 g de sòl per 60 mL de medi. El sòl ha estat conservat prèviament en condicions aeròbies a 4°C i es considera microbiològicament inactiu en el moment de la preparació. Per aquest motiu, els microcosmos amb medi i sòl sense inocular actuen com a control negatiu de l'experiment (representat a la llegenda com a "Sòl").

El control del sòl amb activitat bacteriana se li atribueix a “Sòl + *Shewanella*” on se l’inocula el cultiu enriquit en l’espècie degradadora. També s’han preparat un conjunt de microcosmos inoculats i sense sòl els quals s’han anomenat com a “*Shewanella*”. En aquest cas, s’hi afegeix una concentració de 40 µM de lindà, valor que s’estima equivalent al contingut present en el sòl segons la relació de 67 mg de lindà per kg de sòl obtinguda en caracteritzacions prèvies de la matriu sòlida.

El surfactant emprat per la resta de microcosmos és l’E3 present tant en els controls (“Sòl + Surfactant”, amb la concentració corresponent indicada a la llegenda) com en les mostres experimentals designades com “MSSS”. Aquestes mostres inclouen medi, sòl, surfactant (amb la concentració especificada) i 3 mL d’inòcul de *Shewanella* sp.

2.6 Anàlisis químics

Per a l’anàlisi de MCB i BZ, es va injectar un volum de 0.5 mL del *headspace* del microcosmos a un cromatògraf de gasos (GC) (Agilent 6890 N) acoblat a un detector ionitzador de flama (FID) amb la columna DB-5 (30 m × 0.32 mm × 0.25 µm). En aquest cas, la injecció es va fer en mode *split* (1:2) a 250 °C i el detector a 300 °C. El programa del forn va començar a 40 °C, amb un increment de 18 °C/min fins a 260 °C i un manteniment final de 15 min. El gas portador és l’heli (1.2 mL/min). El tractament de dades i la integració de pics es duen a terme amb el programari Chromeleon 7.2 (Dionex) per als compostos orgànics.

L’anàlisi del lindà requeria d’una extracció en fase orgànica. Un mil·lilitre de mostra es vortexa amb 2 mL d’una mescla 1:1 d’hexà i acetona a màxima agitació durant 12 min i es centrifuga durant 10 minuts a 3500 rpm. El sobrenedant resultant es filtra amb 0.22 µm a un vial. Aquests extractes de lindà es conserven a 4 °C durant 10 dies i s’analitzen en un GC (Agilent 8860) acoblat a un detector de captura d’electrons (ECD). El forn del GC està equipat amb la columna HP-5 (30 m × 0.32 mm × 0.25 µm). La injecció es realitza en mode *splitless* a 280 °C, i el forn del GC segueix un programa de temperatura iniciant-se a 90 °C, incrementant-se a 18 °C/min fins a 250 °C i mantenint-se 15 min. El gas portador utilitzat és l’argó a 0.5 mL/min. La quantificació dels compostos orgànics es realitza mitjançant corbes de calibratge preparades amb patrons a concentracions conegudes.

3. Resultats i Discussió

3.1. Solubilització del lindà amb diferents surfactants

Per comprovar l'efecte que tenen el tipus i la concentració dels surfactants en la solubilitat del lindà, es mesura la concentració de lindà en aigua ultra pura. S'hi afegeixen 0.2 g/L i 1 g/L de cada surfactant i 500 μM de lindà, que supera la seva solubilitat màxima en aigua ($>25 \mu\text{M}$). En aquest cas, el control, que no conté cap surfactant, mostra una concentració de lindà de $39.2 \pm 2.2 \mu\text{M}$ (Figura 3), similar a altres valors presents a la bibliografia [23].

Es pot observar com, en general, la presència de surfactant augmenta la solubilitat del lindà en aigua. En concret, el surfactant SDS a concentració 0.2 mg/L és el que mostra menys solubilitat amb $42.9 \mu\text{M}$, però a l'augmentar la concentració a 1 g/L de SDS, la solubilitat del lindà també augmenta a $57.9 \mu\text{M}$, representant un increment del 13% i 52% respectivament, en comparació amb el control. Pel cas del T80, la concentració de lindà dissolt augmenta fins a $55.1 \pm 3.9 \mu\text{M}$ i a $73.9 \pm 1.1 \mu\text{M}$, és a dir, un 45.1% i fins a un 94.8% d'augment en la solubilitat del lindà, per concentracions de 0.2 i 1 g/L del surfactant, respectivament. Aquest fenomen succeeix de manera similar amb l'E3: la solubilitat del lindà passa a ser de $60.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$ i $73.0 \pm 1.5 \mu\text{M}$, representant un increment del 59.3% i un 92.4% en la solubilitat del lindà, a concentracions de 0.2 i 1 g/L, respectivament de surfactant.

Aquests resultats confirmen l'augment de la solubilitat del lindà en medi aquós en presència de surfactants i, en conseqüència, augmenta la biodisponibilitat del contaminant.

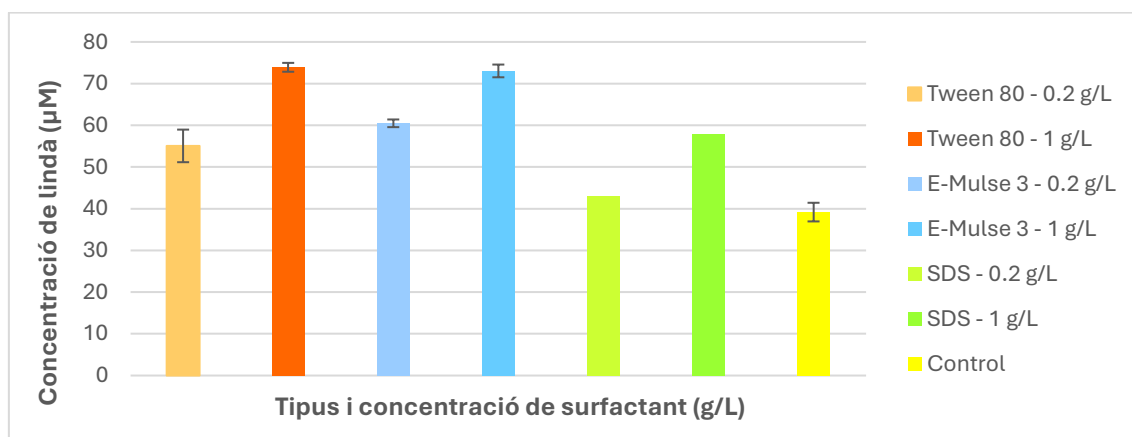


Figura 3. Concentració del lindà en aigua en presència de diferents surfactants. Els valors indicats resulten de la mitjana aritmètica de duplicats, i les barres d'error indiquen la seva desviació estàndard, excepte del SDS que només conté una rèplica.

3.2. Efectes de la presència de surfactants en l'activitat biodegradadora de cultius microbians

Per analitzar l'efecte dels surfactants en el creixement microbià de *Shewanella* i *Pseudomonas* en paral·lel, es preparen duplicats de microcosmos anaerobis i aerobis, respectivament, amb els surfactants i les composicions descrites a materials i mètodes. La selecció de les concentracions dels surfactants es basen en les que se solen aplicar al camp (1–2 g/L). En presència de sòl, una part del surfactant queda adsorbit; atès que s'ha observat que d'1 g/L només en romanen aproximadament 0.2 g/L a la fase líquida, i que de 2 g/L afegits se'n manté al voltant d'1 g/L, l'estudi en matriu líquida s'inicia amb aquestes concentracions efectives.

En els microcosmos anaerobis, dopats amb lindà, es mesura la producció de MCB i BZ, ja que són els productes de transformació finals del lindà per *Shewanella*. La *Figura 4* mostra que la presència dels surfactants disminueix la producció de MCB i BZ en la majoria dels casos. El control negatiu, on no s'ha afegit surfactant però hi ha presència bacteriana, mostra concentracions de MCB i BZ i velocitats de degradació més elevades en comparació amb les mostres d'E3 i SDS. En el cas d'1 g/L de SDS, no es detecta producció de MCB o BZ, indicant que aquesta concentració de surfactant exerceix un efecte inhibitori de la reducció del lindà en *Shewanella*.

Els microcosmos que contenen T80 mostren major concentració de MCB i benzè produït, després del control negatiu, amb valors màxims de $427.80 \pm 23.48 \mu\text{M}$ i $438.66 \pm 7.30 \mu\text{M}$, però disminueixen en 35 dies fins a $379.24 \pm 82.04 \mu\text{M}$ i $424.04 \pm 29.11 \mu\text{M}$ per a concentracions de 0.2 g/L i 1 g/L del surfactant, respectivament. Aquests resultats concorden amb Wang et al. (2024) [19], on es confirma que T80 no inhibeix la biodegradació anaeròbica de l'HCH; les fonts també esmenten que pot afavorir la degradació dels isòmers més recalcitrants (com l' α - i el β -HCH) en augmentar-ne la biodisponibilitat per als microorganismes.

En el cas d'E3 a 0.2 g/L, la producció de MCB i BZ arriba fins a $306.94 \pm 13.63 \mu\text{M}$, i durant 35 dies augmenta fins a $413.15 \pm 3.57 \mu\text{M}$, fet que facilita la comparació dels valors finals amb els valors del dia 16 de T80. En canvi, a 1 g/L, arriba a acumular en 16 dies fins a $220.15 \pm 10.37 \mu\text{M}$ de MCB i BZ, valors molt inferiors a comparació a 0.2 g/L d'E3. Tot i així, també experimenta un increment de la degradació de lindà fins a $357.49 \pm 15.59 \mu\text{M}$. Per tant, s'observa que a l'augmentar la concentració de 0.2 g/L a 1 g/L d'E3, el lindà es degrada més lentament.

Els resultats utilitzant el surfactant SDS mostren una diferència significativa en la producció de MCB i BZ segons la concentració de surfactant. Utilitzant el dia 16 com a valor màxim, a 0.2 g/L les concentracions de la suma dels productes assolien els $239.94 \pm 16.50 \mu\text{M}$, mentre que a 1 g/L, no arriben als 50 μM . És cert que a 0.2

g/L de SDS, la degradació continua fins a $343.45 \pm 50.85 \mu\text{M}$ al dia 51, però a 1 g/L, aquesta concentració fins i tot disminueix $7.37 \pm 3.69 \mu\text{M}$. Així doncs, es conclou que el surfactant SDS pot generar una inhibició i que a més concentració de SDS, més lenta és la degradació de lindà en condicions anaeròbies.

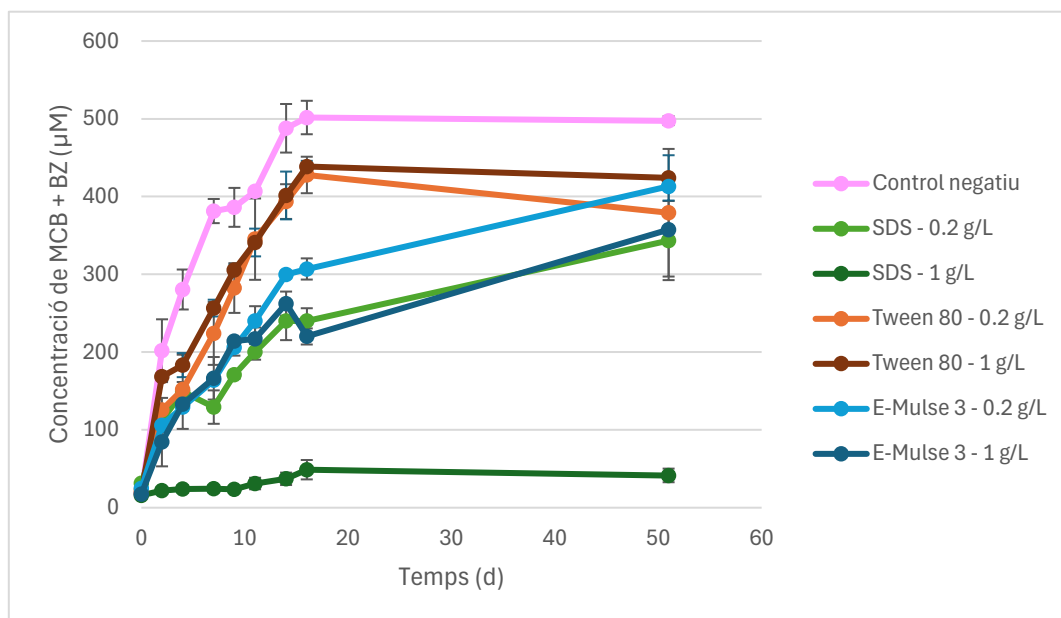


Figura 4. Evolució de la concentració de MCB i BZ per un cultiu enriquit en *Shewanella* en presència de diferents surfactants a dues concentracions (0.2 i 1 g/L). Els valors indicats corresponen a la mitjana aritmètica de duplicats, i les barres d'error indiquen la seva desviació estàndard.

Per altra banda, en els microcosmos aerobis amb *Pseudomonas*, s'hi afegixen $800 \mu\text{M}$ de MCB i la seva degradació es veu representada a la Figura 5. S'observa que tota la concentració inicial de MCB es degrada en 4 dies excepte als controls abiòtics, on no hi ha degradació. Tant l'E3 com el T80 amb ambdues concentracions mostren una velocitat molt similar al control negatiu, mentre que el SDS a 1 g/L mostra una degradació 3 cops més lenta que el control negatiu, tot i que *Pseudomonas* degrada igualment el contaminant, pel que no se li pot atribuir una inhibició.

Al final del primer dia, el MCB al control negatiu ha davallat fins a $292.53 \pm 23.50 \mu\text{M}$ de MCB. Per a l'E3 a 0.2 g/L és de $327.31 \pm 8.66 \mu\text{M}$ i a 1 g/L és inferior, a 297.11 ± 48.58 , aproximant-se al control negatiu. En el cas del T80 és de $423.41 \pm 12.29 \mu\text{M}$ i de $467.38 \pm 23.61 \mu\text{M}$, a 0.2 i 1 g/L respectivament. Els microcosmos amb SDS tenen concentracions més elevades de MCB durant el primer dia, indicant així una degradació més lenta, de $538.58 \pm 10 \mu\text{M}$ i $656.18 \pm 115.67 \mu\text{M}$, a 0.2 i 1 g/L de surfactant, respectivament.

Durant el segon dia, les diferència més destacable és la dels microcosmos amb 1 g/L de SDS amb un valor de $575.40 \pm 9.44 \mu\text{M}$ de MCB, comparant amb $112.08 \pm 11.23 \mu\text{M}$ pels que contenen 0.2 g/L del surfactant i amb 1 g/L d'E3 a $10.67 \pm 1.79 \mu\text{M}$ de MCB, que és el microcosmos que conté menys concentració de MCB. Per a

ambdues concentracions de T80 i E3, juntament amb el control negatiu, les concentracions són inferiors a 75 μM , donant per finalitzada la seva degradació.

Al quart dia, el microcosmos de SDS a 1 g/L també ha consumit el MCB fins a una concentració inferior de 75 μM i es conclou així que la degradació de MCB per *Pseudomonas* no es veu inhibida amb cap dels surfactants a les condicions testades.

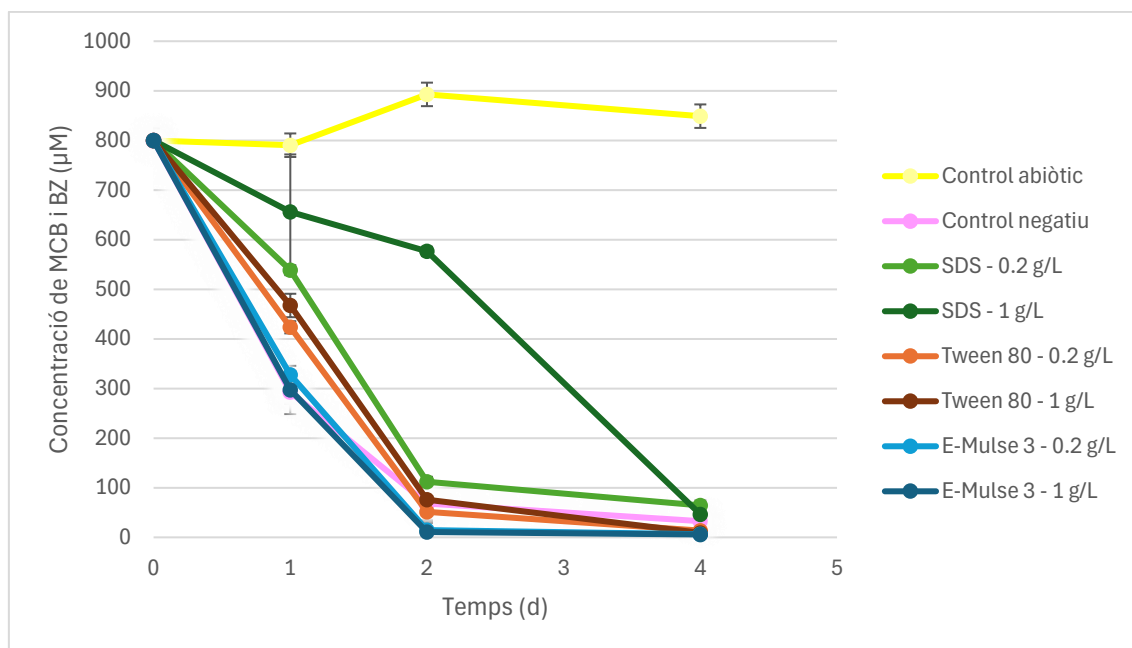


Figura 5. Evolució de la concentració de MCB per un cultiu de *Pseudomonas* en microcosmos afegint diferents surfactants a 0.2 i 1 g/L. Els valors indicats corresponen a la mitjana aritmètica de duplicats, i les barres d'error indiquen la seva desviació estàndard.

3.3. Efecte del surfactant E-Mulse 3® en l'activitat biodegradadora en sediments contaminats

En aquest experiment es compara l'impacte de les diferents concentracions del surfactant en la transformació anaeròbia del lindà en els microcosmos preparats amb sòl contaminat per HCHs procedent de l'emplaçament de Sardas. En analítiques prèvies s'ha comprovat que la concentració inicial de HCHs als sediments era de 67 mg de lindà per cada kg de sòl.

Segons les remediacions SEAR i S-ISCO aplicades *in-situ* a l'emplaçament original de Sardas descrites a la Introducció, es prioritza l'estudi de l'efecte de l'E3 en la degradació del lindà [14]. Paral·lelament, l'E3 també s'escull per la seva compatibilitat amb l'activitat degradadora bacteriana observada a la secció anterior. La selecció de les concentracions de surfactant es descriu a la secció 3.2,

on per poder avaluar les concentracions estudiades a la matriu líquida, se l'hi afegeixen al sòl 2 g/L i 1 g/L; la tercera concentració a 0.2 g/L es manté per consistència i mantenir unes condicions mínimes en surfactant. L'addició de diferents concentracions de surfactant permet examinar com modulen la biodisponibilitat del contaminant adsorbit al sòl per part de *Shewanella*. Per tal de discernir l'efecte del surfactant en presència de *Shewanella*, es preparen sis tipus de controls, descrits detalladament a la secció 2.5 de materials i mètodes.

L'evolució del MCB i BZ produïts arran de la degradació dels HCHs es mostren a la Figura 6. Durant els 24 dies, els duplicats del control de *Shewanella* sense sòl ni surfactants van produir un màxim de $28.58 \pm 1.27 \mu\text{M}$ de MCB i BZ en 13 dies, estabilitzant-se al voltant de $17 \mu\text{M}$ al final de l'experiment. Els controls "Sòl" i "Sòl + *Shewanella*" no superen els valors de $6 \mu\text{M}$ en cap dels duplicats durant el temps de l'estudi, resultat que indica que ni l'activitat microbiana que hi pugui haver present en el sòl ni el cultiu de *Shewanella* no són capaços de degradar els contaminants adherits sense el surfactant. Per altra banda, els controls abiòtics amb E3 tenen un pic el dia 6, amb concentracions màximes de 11.23 ± 12.21 , 11.83 ± 1.91 i de $6.1 \pm 0.99 \mu\text{M}$ de MCB a 0.2, 1 i 2 g/L d'E3 respectivament. Aquest pic se li atribueix a una reducció química mediada pel citrat de titani (III) present en el medi [24].

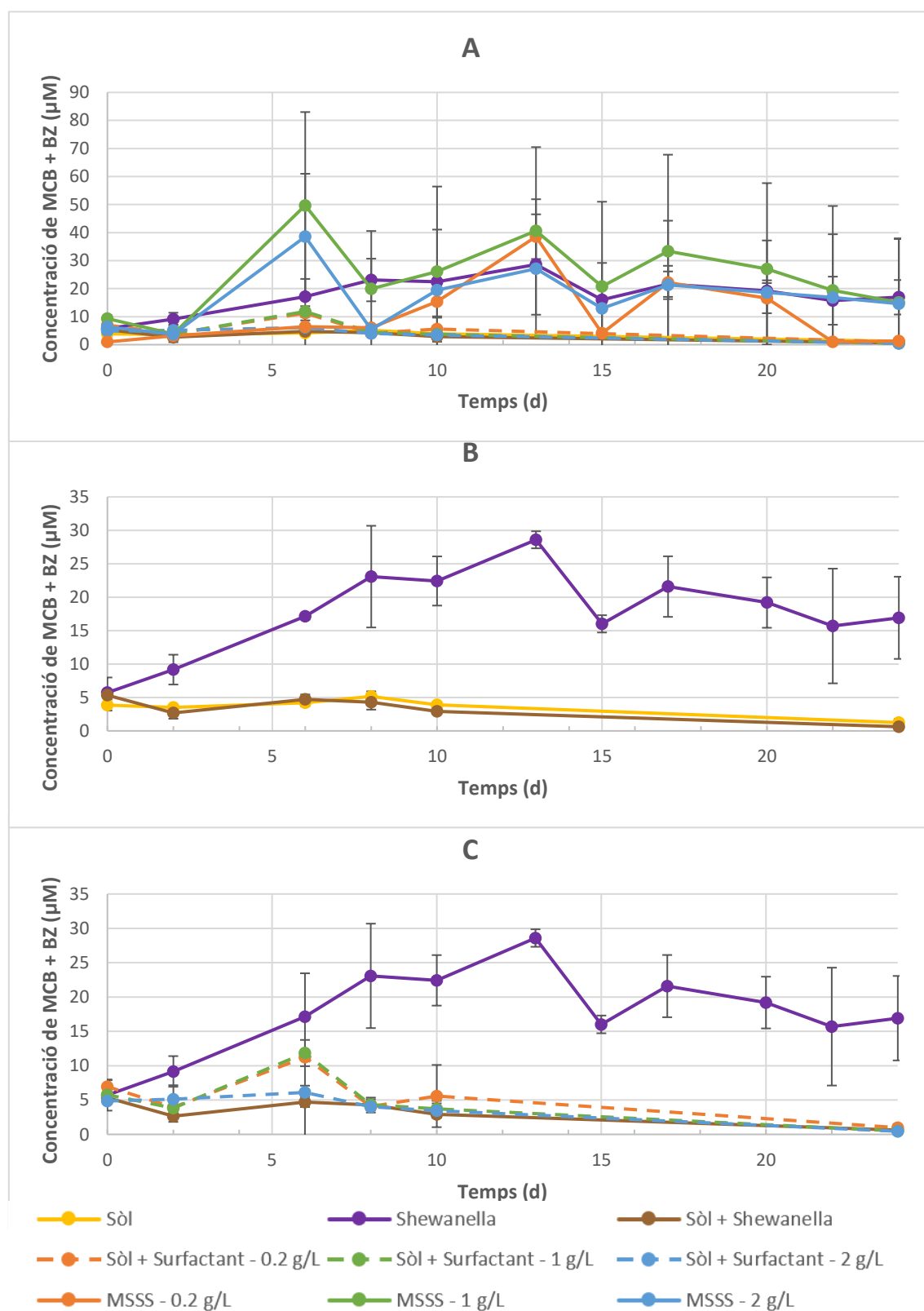
Les mitjanes de les mostres amb E3 i *Shewanella* presenten unes oscil·lacions més o menys significatives depenent de la concentració del surfactant. En el cas de 0.2 g/L de surfactant, el dia 13 hi ha un màxim de $38.54 \pm 7.97 \mu\text{M}$ de MCB, la següent mostra baixa fins a $4.11 \pm 0.84 \mu\text{M}$, augmentant de nou a la següent mostra a $22.80 \pm 5.95 \mu\text{M}$, però tornant a disminuir fins a $1.32 \pm 0.04 \mu\text{M}$ a l'últim dia.

A 1 g/L d'E3, hi ha oscil·lacions constants des dels valors màxims de líndà del dia 6 a $49.69 \pm 33.30 \mu\text{M}$, disminuint la següent mostra fins a $19.91 \pm 20.64 \mu\text{M}$, tornant a incrementar a $40.59 \pm 29.88 \mu\text{M}$ el dia 13, seguida de dues oscil·lacions més, l'últim dia els resultats havien arribat fins a $15.09 \pm 22.62 \mu\text{M}$; en un dels triplicats el valor mínim és de 0.95, mentre que el màxim és de $41.17 \mu\text{M}$ de MCB.

Finalment, per a 2 g/L, també hi ha hagut fluctuacions, amb una màxima de 38.53 ± 22.44 el dia 6, disminuint a $5.42 \pm 0.85 \mu\text{M}$ la mesura següent, on el dia 13 torna a incrementar a $27.13 \pm 24.76 \mu\text{M}$, situant-se al voltant de $20 \mu\text{M}$ fins el dia 24 que s'obté un valor de $14.58 \pm 23.35 \mu\text{M}$.

Aquests resultats indiquen que l'addició d'E3 facilita l'alliberament del líndà del sòl i incrementa la fracció disponible a la fase líquida, fet que permet a *Shewanella* accedir-hi i transformar-lo de manera eficient. Les concentracions màximes de MCB obtingudes són estequiomètricament coherents amb les concentracions de HCHs present en el sòl, mostrant una degradació gairebé completa del contaminant. Les fluctuacions en les concentracions de MCB i BZ al llarg del temps

es poden associar a la re-adsorció al sòl tant del surfactant, com del MCB, BZ [25] i HCHs [26]. També es conclou que les desviacions estàndards tan elevades són causades per una distribució heterogènia d'HCHs en el sòl deguda a la pròpia diferència granulomètrica d'aquest, ja que no es va realitzar cap procés de tamisat abans de repartir-lo als microcosmos.



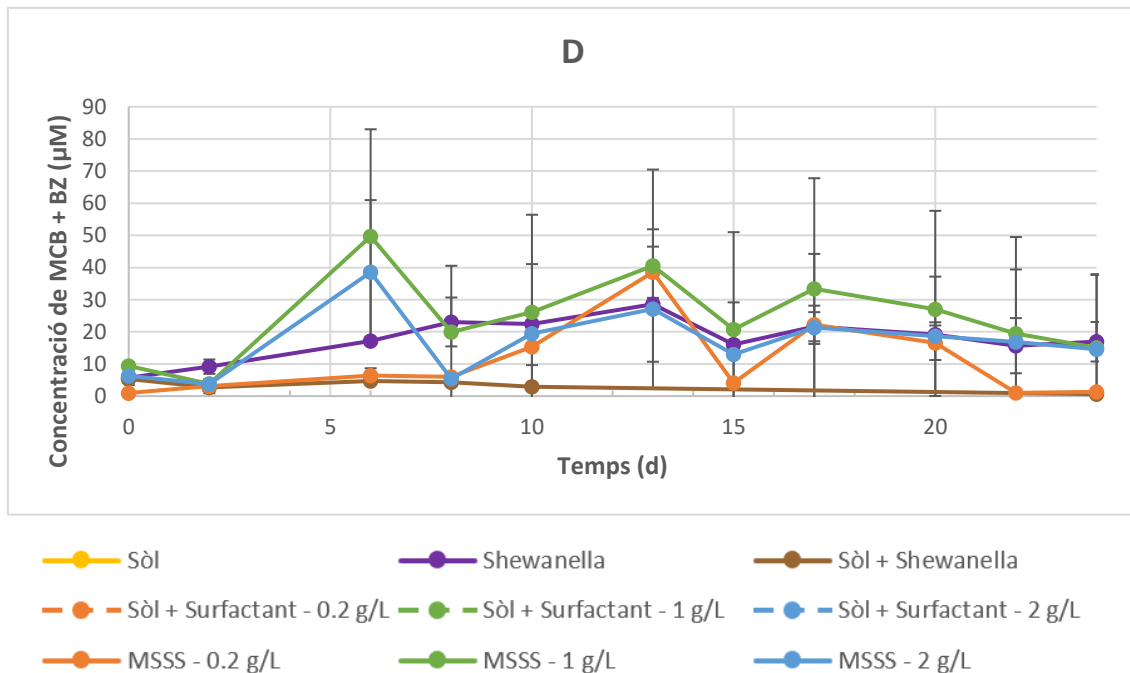


Figura 6. Evolució de les concentracions de MCB i BZ en un cultiu enriquit en *Shewanella* en microcosmos amb sediments contaminats per HCH. A) Visió general de l'experiment. B) Controls de *Shewanella* en matriu líquida, sòl i sòl amb *Shewanella*. C) Controls de *Shewanella* en matriu líquida, sòl i surfactant sense *Shewanella*. D) Control de *Shewanella* en matriu líquida i mostres amb medi, sòl, surfactant i *Shewanella* (MSSS), a diferents concentracions de surfactant. Els valors indicats corresponen a la mitjana aritmètica de duplicats en els controls i triplicats en els MSSS, i les barres d'error indiquen la seva desviació estàndard.

4. Conclusions

L'estudi mostra que l'addició de surfactants incrementa més d'un 90% la solubilitat del lindà en medi aquós, en els casos de T80 i E3, fet que afavoreix la seva biodisponibilitat i, per tant, la seva degradació durant els processos de bioremediació. Tot i això, la resposta microbiana davant aquests compostos és diferent depenent del surfactant: el SDS inhibeix l'activitat degradadora de *Shewanella sp.* a concentracions d'1 g/L, mentre que el T80 es confirma com el surfactant més adequat per potenciar la degradació anaeròbia del lindà. Paral·lelament, els tres surfactants mostren un comportament favorable en la degradació aeròbia del MCB per part de *Pseudomonas veronii*, evidenciant que el sistema és tolerant i respon positivament a totes les formulacions assajades.

Els experiments amb sòl real de l'emplaçament de Sardas revelen, tanmateix, la complexitat de treballar amb matrius naturals. S'evidencia que la biodegradació d'HCHs només és efectiva quan s'acompanya de surfactants, ja que aquests afavoreixen la desorció del lindà adsorbit a la matriu sòlida. Les fluctuacions observades en les concentracions de MCB i BZ reflecteixen una dinàmica complexa de desorció i re-adsorció, condicionada per l'heterogeneïtat del sòl, pel repartiment heterogeni del contaminant a l'emplaçament i per la interacció competitiva entre el surfactant i el contaminant. Aquestes interaccions poden generar contratemps, especialment en sòls argilosos, de gresos o de sorra fina, quan s'utilitzen concentracions elevades de surfactant. A més, la concentració de MCB present en aquests sòls és un ordre de magnitud inferior a la dels assajos en medi líquid, cosa que dificulta la precisió analítica i la interpretació dels resultats.

En conjunt, l'estudi demostra que la bioremediació *in situ* assistida amb surfactants pot ser una estratègia viable per al tractament de sòls contaminats amb HCHs. L'eficàcia del procés depèn de seleccionar un surfactant compatible amb el consorci microbià i d'ajustar-ne adequadament la concentració per garantir-ne la disponibilitat a la fase líquida. Igualment, les característiques pròpies del sòl condicionen la mobilització del contaminant o surfactant i, per tant, el rendiment del tractament. Finalment, les limitacions identificades subratllen la necessitat de futurs estudis que incorporin la complexitat real de la matriu contaminada amb l'objectiu de millorar la transferibilitat dels resultats i optimitzar les estratègies de la bioremediació *in situ*.

Reconeixements

Vull expressar el meu sincer agraïment a Daniel Salom Bermúdez i David Juan Fernández Verdejo per la seva guia i suport al llarg d'aquest treball. Agraïxo igualment la disponibilitat i el lideratge de Paqui Blánquez Cano i Ernest Marco Urrea, així com la col·laboració de tot l'equip de BioRemUAB. Finalment, un reconeixement especial a la meva parella i família pel seu suport constant.

Bibliografia

- [1] Soder-Walz JM, Salom D, Granados-Rigol E, Fernández-Verdejo D, Vicent T, Marco-Urrea E, Blánquez P, 2025. Enhanced aerobic bioremediation of an aquifer heavily contaminated with a mixture of chlorobenzenes and hexachlorocyclohexanes at the Sardas landfill (Spain). *J Hazard Mater* 484, 136717. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136717>
- [2] Friedrich B, Hoffmann D, Renn J, Schmaltz F, Wolf M, 2017. *One Hundred Years of Chemical Warfare: Research, Deployment, Consequences*. Springer International Publishing, Cham
- [3] Bertomeu-Sánchez JR, 2019. Introduction. *Pesticides: Past and Present*. *HoST - J Hist Sci Technol* 13, 1–27. <https://doi.org/10.2478/host-2019-0001>
- [4] Vijgen J, De Borst B, Weber R, Stobiecki T, Forter M, 2019. HCH and lindane contaminated sites: European and global need for a permanent solution for a long-time neglected issue. *Environ Pollut* 248, 696–705. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.029>
- [5] Vijgen J, Fokke B, Van De Coterlet G, Amstaetter K, Sancho J, Bensaïah C, Weber R, 2022. European cooperation to tackle the legacies of hexachlorocyclohexane (HCH) and lindane. *Emerg Contam* 8, 97–112. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2022.01.003>
- [6] Vijgen J, Abhilash PC, Li YF, Lal R, Forter M, Torres J, Singh N, Yunus M, Tian C, Schäffer A, Weber R, 2011. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environ Sci Pollut Res* 18, 152–162. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0417-9>
- [7] Santos A, Fernández J, Guadaño J, Lorenzo D, Romero A, 2018. Chlorinated organic compounds in liquid wastes (DNAPL) from lindane production dumped in landfills in Sabiñanigo (Spain). *Environ Pollut* 242, 1616–1624. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.117>
- [8] Salom D, Fernández-Verdejo D, Isidro J, Vicent T, Blánquez P, 2025. Coupling electrokinetic soil flushing with bioremediation for the removal of chlorinated

- benzenes and hexachlorocyclohexane. *J Hazard Mater* 496, 139397. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.139397>
- [9] Zinovyev SS, Shinkova NA, Perosa A, Tundo P, 2004. Dechlorination of lindane in the multiphase catalytic reduction system with Pd/C, Pt/C and Raney-Ni. *Appl Catal B Environ* 47, 27–36. [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(03\)00324-2](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(03)00324-2)
- [10] Kunze M, Zerlin KF, Retzlaff A, Pohl JO, Schmidt E, Janssen DB, Vilchez-Vargas R, Pieper DH, Reineke W, 2009. Degradation of chloroaromatics by *Pseudomonas putida* GJ31: assembled route for chlorobenzene degradation encoded by clusters on plasmid pKW1 and the chromosome. *Microbiology* 155, 4069–4083. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032110-0>
- [11] Qiao W, Puentes Jácome LA, Tang X, Lomheim L, Yang MI, Gaspard S, Avanzi IR, Wu J, Ye S, Edwards EA, 2020. Microbial Communities Associated with Sustained Anaerobic Reductive Dechlorination of α -, β -, γ -, and δ -Hexachlorocyclohexane Isomers to Monochlorobenzene and Benzene. *Environ Sci Technol* 54, 255–265. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05558>
- [12] Harwood CS, Parales RE, 1996. THE β -KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF-IDENTITY. *Annu Rev Microbiol* 50, 553–590. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.553>
- [13] Fernández-Cascán J, Isidro J, Guadaño J, Sáez C, Rodrigo MA, 2023. Electrochemically-assisted remediation of silt polluted with aged HCHs. *Electrochimica Acta* 464, 142934. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.142934>
- [14] Garcia-Cervilla R, Santos A, Romero A, Lorenzo D, 2022. Simultaneous addition of surfactant and oxidant to remediate a polluted soil with chlorinated organic compounds: Slurry and column experiments. *J Environ Chem Eng* 10, 107625. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107625>
- [15] Fernández J, Lorenzo D, Net J, Cano E, Saez P, Herranz C, Domínguez CM, Cotillas S, Santos A, 2024. Sustainable lindane waste remediation: Surfactant-driven residual DNAPL extraction and oxidation in a real landfill (LIFE SURFING). *Sci Total Environ* 934, 173260. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173260>
- [16] Xu C, Ning Y, Wang C, Yang S, Yang Z, Li Y, 2024. Effect of cations on monochlorobenzene adsorption onto bentonite at the coexistence of Tween 80. *J Hazard Mater* 469, 133883. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133883>
- [17] Garcia-Cervilla R, Santos A, Romero A, Lorenzo D, 2022. Abatement of chlorobenzenes in aqueous phase by persulfate activated by alkali enhanced by surfactant addition. *J Environ Manage* 306, 114475. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114475>

- [18] Xu X, He Z, Ji F, Zhang M, Bai J, Wang B, 2024. Insight into the interactions between surfactants and microorganisms for the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Enhancing efficiency, cellular response, and elucidating mechanisms. *Int Biodeterior Biodegrad* 187, 105710. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2023.105710>
- [19] Wang C, Xu C, Liu D, Yang Z, Yang S, Feng Z, Xu J, Li Y, 2024. The effect of Tween 80 on monochlorobenzene migration in bentonite. *J Hazard Mater* 468, 133781. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133781>
- [20] Quintero JC, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM, 2005. Effect of surfactants on the soil desorption of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers and their anaerobic biodegradation. *J Chem Technol Biotechnol* 80, 1005–1015. <https://doi.org/10.1002/jctb.1277>
- [21] Checa-Fernández A, Santos A, Romero A, Domínguez CM, 2021. Remediation of real soil polluted with hexachlorocyclohexanes (α -HCH and β -HCH) using combined thermal and alkaline activation of persulfate: Optimization of the operating conditions. *Sep Purif Technol* 270, 118795. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118795>
- [22] Xiaoyi Xu, Zhimin He, Fan Ji, Mingle Zhang, Jing Bai, Bin Wang, 2023. Insight into the interactions between surfactants and microorganisms for the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Enhancing efficiency, cellular response, and elucidating mechanisms
- [23] Saleh FY, Dickson KL, Rodgers JH, 1982. Fate of lindane in the aquatic environment: Rate constants of physical and chemical processes. *Environ Toxicol Chem* 1, 289–297. <https://doi.org/10.1002/etc.5620010404>
- [24] Rodríguez-Garrido B, Camps Arbestain M, Monterroso MC, Macías F, 2004. Reductive Dechlorination of α -, β -, δ -, and γ -Hexachlorocyclohexane Isomers by Hydroxocobalamin in the Presence of Either Dithiothreitol or Titanium(III) Citrate as Reducing Agents. *Environ Sci Technol* 38, 5046–5052. <https://doi.org/10.1021/es030153x>
- [25] Roe A, Graham JR, 1952. Replacement of the Primary Aromatic Amino Group by Hydrogen Using Diazonium Fluoborates. *J Am Chem Soc* 74, 6297–6298. <https://doi.org/10.1021/ja01144a523>
- [26] Del Puerto O, Noort K, Behringer S, Höfer K, Robinson A, Spurgeon D, Ashauer R, Van Den Brink N, 2026. Organic matter dependent toxicokinetic of lindane in soil: Insights from enchytraeid bioaccumulation studies. *Ecotoxicol Environ Saf* 310, 119717. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2026.119717>