

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**“ESTUDIO DE MOVILIDAD DE COMPUESTOS DISRUPTORES  
ENDOCRINOS BISFENOL A Y 17- $\alpha$ -ETINILESTRADIOL EN SUELOS  
TRATADOS CON BIOSÓLIDOS, MEDIANTE EL USO DE COLUMNAS DE  
LIXIVIACIÓN”**

Memoria presentada a la Universidad de Chile para optar al Título de Químico, por:

**EDGARDO ANDRÉS ROMERO PACHECO**

Directores de Memoria

M.Q. Inés Ahumada Torres  
(Profesor patrocinante)

Dra. Maria Loreto Ascar Estay

Santiago – Chile

2018

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
SUMARY .....	x
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tratamiento de aguas.....	1
1.2 Etapas del proceso y obtención de biosólido .....	2
1.3 Gestión de biosólido.....	4
1.4 Contaminantes emergentes.....	5
1.5 Bisfenol A .....	7
1.6 17- $\alpha$ -etinilestradiol .....	9
1.7 Hipótesis.....	13
1.8 Objetivos .....	13
1.8.1 Objetivo general.....	13
1.8.2 Objetivos específicos.....	13
<b>II. Metodología .....</b>	<b>14</b>
2.0 Materiales .....	14
2.1 Reactivos y solventes .....	14
2.2 Estándares.....	14
2.3 Material de laboratorio .....	15
2.4 Instrumentos y equipos.....	15
2.5 Caracterización fisicoquímica de los suelos.....	16
2.5.1 Determinación de pH.....	17
2.5.2 Determinación de conductividad eléctrica.....	17
2.5.3 Determinación de capacidad de intercambio catiónico.....	17

2.5.4 Determinación de carbono orgánico.....	18
2.5.5 Determinación de metales pesados.....	19
2.5.6 Determinación de la textura de los suelos .....	20
2.6 Enriquecimiento del biosólido con BPA y EE2.....	22
2.7 Estudio de la actividad microbiana.....	23
2.7.1 Determinación de CO <sub>2</sub> por titulación con HCl.....	23
2.7.2 Determinación de Nitrato y Amonio .....	24
2.7.2.1 Determinación de Amonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ).....	24
2.7.2.2 Determinación de Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) .....	25
2.8 Estudio de lixiviación en columnas de suelo.....	26
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>28</b>
3.1 Caracterización física y química de los suelos y del biosólido.....	28
3.2 Determinación de la actividad microbiana.....	30
3.3 Determinación de Nitrato y Amonio.....	34
3.4 Estudios de lixiviación.....	38
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>V. REFERENCIAS .....</b>	<b>46</b>
<b>VI. ANEXOS.....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades fisicoquímicas del Bisfenol A y 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	12
<b>Tabla 2.</b> Caracterización fisicoquímica de los suelos y biosólido .....	28
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones máximas de metales pesado en suelos receptor según normativa y metales pesados presentes en los suelos a trabajar.....	29
<b>Tabla 4.</b> Resumen del análisis ANOVA para la actividad microbiana en suelos, respecto de los tratamientos y el tiempo .....	33
<b>Tabla 5.</b> Resumen del análisis ANOVA para la concentración de los analitos lixiviados respecto al tipo de suelo.....	42
<b>Tabla 6.</b> Resumen del análisis ANOVA para la concentración de los analitos lixiviados respecto a la actividad microbiana presente en los suelos .....	42
<b>Tabla 7.</b> Textura de los suelos.....	53
<b>Tabla 8.</b> Determinación de CO <sub>2</sub> .....	53
<b>Tabla 9.</b> Determinación de Amonio .....	53
<b>Tabla 10.</b> Determinación de Nitrato.....	54
<b>Tabla 11.</b> Lixiviación BPA en suelo Codigua.....	54
<b>Tabla 12.</b> Lixiviación BPA en suelo Codigua - Biosólido.....	55
<b>Tabla 13.</b> Lixiviación BPA en suelo Pomaire .....	55
<b>Tabla 14.</b> Lixiviación BPA en suelo Pomaire - Biosólido .....	56
<b>Tabla 15.</b> Lixiviación BPA en suelo Ostolazas.....	56
<b>Tabla 16.</b> Lixiviación EE2 en suelo Ostolazas - Biosólido.....	56
<b>Tabla 17.</b> Lixiviación EE2 en suelo Codigua.....	57
<b>Tabla 18.</b> Lixiviación de EE2 en suelo Codigua - Biosólido.....	57

<b>Tabla 19.</b> Lixiviación de EE2 en suelo Pomaire .....	58
<b>Tabla 20.</b> Lixiviación de EE2 en suelo Pomaire - Biosólido .....	58
<b>Tabla 21.</b> Lixiviación de EE2 en suelo Ostolazas .....	58
<b>Tabla 22.</b> Lixiviación de EE2 en suelo Ostolazas - Biosólido .....	59
<b>Tabla 23.</b> Resumen del análisis ANOVA para la actividad microbiana en suelos sin tratamiento y tratados con biosólido, respecto del tiempo y el tratamiento.....	59
<b>Tabla 24.</b> Resumen del análisis ANOVA para la actividad microbiana en suelos tratados con biosólido y con biosólido enriquecido, respecto del tiempo y el tratamiento .....	59
<b>Tabla 25.</b> Resumen del análisis ANOVA para la concentración de los analitos lixiviados respecto al tratamiento aplicado a los suelos .....	60
<b>Tabla 26.</b> Resumen del análisis ANOVA para la concentración de los analitos lixiviados respecto al carbono orgánico presente en los suelos.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribución de las tecnologías de tratamiento de aguas utilizadas en la actualidad respecto a la totalidad de PTAS existentes a nivel país. ....	2
<b>Figura 2:</b> Distribución de las aguas servidas previo a su ingreso a una PTAS.....	3
<b>Figura 3:</b> Configuración típica de una Planta de Tratamiento de Aguas Servidas .....	4
<b>Figura 4:</b> Estructura molecular de Bisfenol A (BPA).....	8
<b>Figura 5:</b> Estructura molecular de 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2). ....	10
<b>Figura 6:</b> Triángulo de texturas para clasificación de suelos.....	22
<b>Figura 7:</b> Incorporación de los analitos al biosólido por homogenización en rotavapor .....	23
<b>Figura 8:</b> Coloración curva de calibración y muestras para determinación de Amonio.. ..	25
<b>Figura 9:</b> Equipo Electroforesis capilar utilizado en la determinación de Nitrato.....	26
<b>Figura 10:</b> Actividad microbiana en suelo Codigua sometido a los diferentes tratamientos. ....	31
<b>Figura 11:</b> Actividad microbiana en suelo Pomaire sometido a los diferentes tratamientos. ....	32
<b>Figura 12:</b> Actividad microbiana en suelo Ostolazas sometido a los diferentes tratamientos.. ..	32
<b>Figura 13:</b> Amonio en suelo Codigua sometido a los diferentes tratamientos. ....	34
<b>Figura 14:</b> Amonio en suelo Pomaire sometido a los diferentes tratamientos.....	35
<b>Figura 15:</b> Amonio en suelo Ostolazas.sometido a los diferentes tratamientos .....	35
<b>Figura 16:</b> Nitrato en suelo Codigua sometido a los diferentes tratamientos.....	36

<b>Figura 17:</b> Nitrato en suelo Pomaire sometido a los diferentes tratamientos .....	36
<b>Figura 18:</b> Nitrato en suelo Ostolazas sometido a los diferentes tratamientos .....	37
<b>Figura 19:</b> Curva de lixiviación de BPA en suelo Codigua.....	38
<b>Figura 20:</b> Curva de lixiviación de BPA en suelo Codigua - Biosólido.....	39
<b>Figura 21:</b> Curva de lixiviación de BPA en suelo Pomaire .....	39
<b>Figura 22:</b> Curva de lixiviación de EE2 en suelo Codigua.....	40
<b>Figura 23:</b> Curva de lixivacion de EE2 en suelo Codigua - Biosólido.....	40
<b>Figura 24:</b> Curva de lixiviación de EE2 en suelo Pomaire .....	41
<b>Figura 25:</b> Relacion entre la actividad microbiana y concentración peak de BPA lixiviado.....	43

## **RESUMEN**

El aumento explosivo de la población mundial desde aproximadamente la segunda mitad del siglo XX, además del aumento del ingreso per cápita y la demanda de una dieta más variada por parte de las economías de los mercados emergentes, han llevado a elevar la demanda alimentaria y con ello mejorar la producción agrícola.

De acuerdo a las condiciones climáticas y el uso del suelo, éste puede verse afectado, alterando su calidad debido a variaciones en sus componentes biológicos y fisicoquímicos, llevándolo finalmente al estado de degradación. A fin de recuperar esta condición se han implementado diversos métodos que apuntan a entregar nutrientes, a través de abonos orgánicos y fertilizantes.

En Chile, para llevar a cabo la recuperación de los suelos agrícolas el SAG permite la utilización de lodos estabilizados (biosólidos), provenientes de las plantas de tratamiento de aguas servidas. Los biosólidos pueden contener contaminantes generados por actividades antrópicas, a algunos de ellos se les conoce como contaminantes emergentes, y no están considerados en la normativa que controla la aplicación de estos residuos en suelos o en los análisis de los efluentes provenientes de dichas plantas.

La importancia y peligrosidad de estos contaminantes radica en su capacidad de incorporarse a la cadena trófica y bioacumularse. En seres vivos, algunos de estos contaminantes han demostrado generar alteraciones a nivel hormonal, con lo que han sido catalogados bajo el nombre de “Compuestos Disruptores Endocrinos” (CDE). Dentro de



éstos, encontramos tanto al Bisfenol A (BPA) como a  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2), los cuales poseen elevada actividad biológica, presentándose como un potencial peligro.

Este estudio tuvo por objetivo evaluar la movilidad de estos compuestos en tres suelos de la zona centro del país (Melipilla) al ser tratados con biosólido.

El estudio sobre actividad microbiana, llevado a cabo en muestras de suelo, suelo-biosólido y suelo-biosólido enriquecido (en BPA  $30\text{mgkg}^{-1}$  y EE2  $10\text{mgkg}^{-1}$ ) por el transcurso de 30 días, mostró un aumento de ésta en los suelos tratados con biosólido enriquecido por sobre los tratados con biosólido y suelo sin tratar.

Mediante la utilización de columnas de lixiviación cargadas con suelo y suelo-biosólido en razón de  $90\text{Mgha}^{-1}$ , se agregaron los contaminantes y eluyeron con solución  $0,01\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  recolectando y analizando los lixiviados. El análisis de éstos, mostró retención de los compuestos en función de la textura de los suelos y actividad microbiana presente en ellos.

## SUMMARY

### **Study of mobility of the endocrine disrupting compounds Bisphenol A and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol in soils amended with biosolids, through the use of leaching columns.**

The massive increase in world population since the second half of the XX century, as well as the growth of the income per-capita and the demand of a variety of foods by the economies in emerging markets have led to increase food demand and thereby improve agricultural production.

Depending on climatic conditions and use, the soils could be affected by a change in their biological and physico-chemical components, leaving it in the condition of degraded soil. In order to reverse and combat this condition, multiple methods have been implemented, aiming to deliver minerals and nutrients in form of manure and fertilizers.

To make possible the soil restoration for agricultural use in Chile, SAG allows the use of stabilized sludge. Coming from wastewater treatment plants, the biosolids concentrate a series of pollutants from anthropogenic activities, these are known as emerging contaminants, which until now haven't been considered in the regulations and analysis of effluents.

These pollutants can be bioaccumulated and incorporated into trophic chains. In living organism, it has been revealed the effect generated in the endocrine system, which is why they are known as Endocrine Disrupting Compounds (EDC). Between them, we can find

Bisphenol A (BPA) and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2), both have a high biological activity, and shows potential danger of endocrine disruption.

The main objective of this research was evaluate the mobility of this components through 3 soils of the R.M. (Melipilla) when they are treated with biosolids.

The assays for microbial activity and nitrogen cycle, carried out on samples of soil, soil-biosolids and soil-biosolids spiked with 30mgkg<sup>-1</sup> of BPA and 10mgkg<sup>-1</sup> of EE2, for the course of a month, showed an enhance of the microbial activity in the soils treated with spiked biosolids over the treated with biosolids and untreated soil. At the same time, it was found that the compounds under study increase the transformation of ammonium to nitrate (Nitrification process)

Through the use of leach columns loaded with soil and soil-biosolids in a rate of 90 Mgha<sup>-1</sup>, the pollutants were added and leached with 0.01M CaCl<sub>2</sub> solution, collecting and analyzing the leachates. This showed retention of the compounds in function of the texture and microbial activity of the soils into the column.

## I. INTRODUCCIÓN

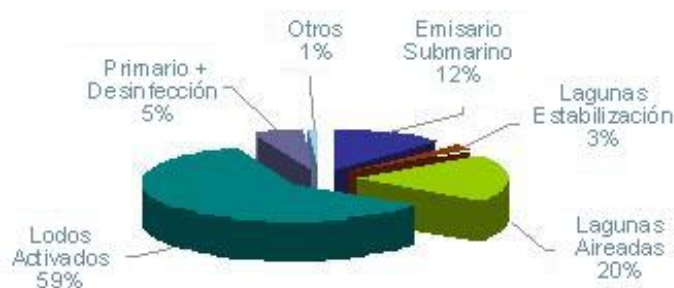
No fue sino hasta la segunda mitad del siglo XX, que términos como “ecología”, “protección y cuidado del ambiente” y “contaminación del agua y aire” comenzaron a ser conocidos por la ciudadanía y ampliamente utilizados por los medios de comunicación, mostrándonos como partícipes del proceso de autodestrucción de la humanidad. Proceso que se ha sabido retrasar, gracias a contar con el conocimiento básico para hacer frente a la contaminación, pagando solo pequeños costos.

### **1.1 Tratamiento de aguas.**

El tratamiento de aguas residuales, enmarcado en el manejo de los recursos naturales de manera sustentable, responde a la necesidad de eliminar elementos no deseados y contaminantes presentes en el agua servida de origen industrial y doméstico, con el fin de devolverlas a cauces naturales de la manera más segura posible y ser utilizadas, por ejemplo, como agua de riego. Todo esto cumpliendo con lo estipulado en la legislación vigente (Criterios de calidad de aguas o efluentes tratados para uso en riego, SAG, 2005). Mediante esta medida se han podido disminuir problemas de frecuente ocurrencia durante la primera mitad de siglo XX, como la baja cantidad de oxígeno disuelto, muerte de peces, florecimiento de algas y contaminación bacterial de los cursos de agua.

A nivel país el tratamiento de aguas servidas alcanza una cobertura del 99.8% gracias a las más de 290 plantas de tratamiento existentes (PTAS), de las cuales 32 se encuentran ubicadas en la Región Metropolitana, entre las que se pueden mencionar: El Trebal, La

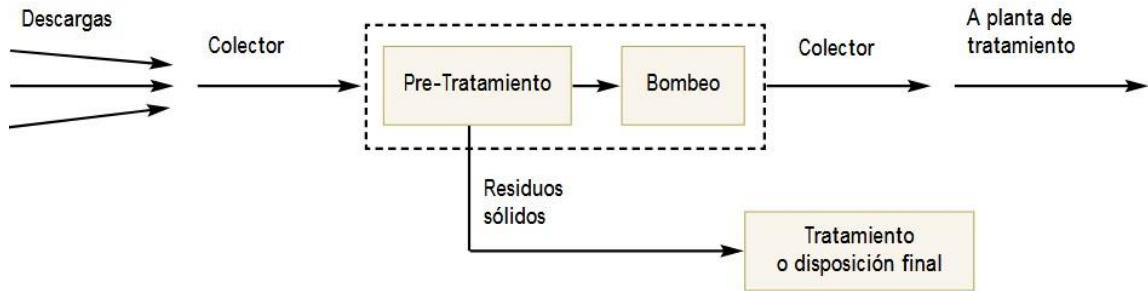
Farfana, San José de Maipo, Melipilla, Talagante, Pomaire (Aguas Andinas S.A.), Los Trapenses (Manquehue S.A.), Larapinta (Selar S.A.), Jardín Lo Prado (Septra S.A.), entre otras (<http://www.siss.gob.cl/577/w3-article-5059.html>). Diferentes tecnologías de tratamiento de aguas son utilizadas en estas plantas, sin embargo, la tecnología de tratamiento predominante corresponde a lodos activados, con casi un 60% respecto del total (ver figura 1).



**Figura 1:** Distribución de las tecnologías de tratamiento de aguas utilizadas en la actualidad respecto a la totalidad de PTAS existentes a nivel país.

### **1.2 Etapas del proceso y obtención de biosólido.**

El proceso se inicia con el ingreso de las aguas a una etapa de tratamiento preliminar, como se muestra en la figura 2, cuyo objetivo es eliminar cualquier elemento que pueda entorpecer alguna de las etapas siguientes, como sólidos gruesos, arenas, aceites y grasas. Los sólidos gruesos, que pueden tapan tuberías y dañar instalaciones, son removidos mediante barras y sistemas de rejillas tipo tamiz; las arenas, que generan abrasión en las tuberías y depósitos en estanques, son removidas mediante un desarenador; y, por último, los aceites y grasas, que pueden colmatar tuberías y equipos, son removidos mediante flotación en un desgrasador.



**Figura 2:** Distribución de las aguas servidas previo a su ingreso a una PTAS.  
(Barañaño,2004)

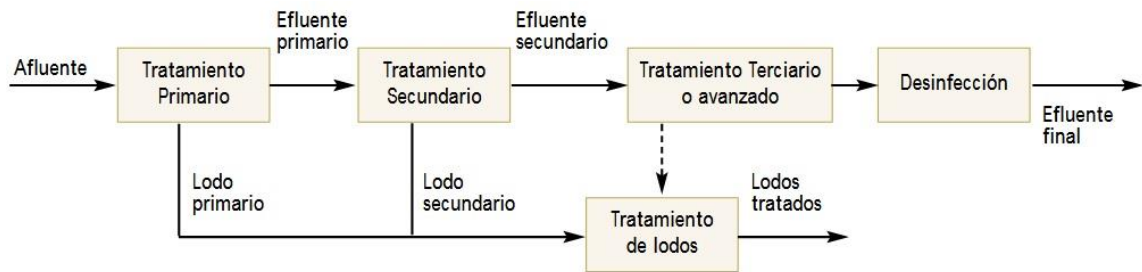
Posterior a este pre-tratamiento, es posible el ingreso a la planta, para ser sometido a tratamiento primario, tratamiento secundario, tratamiento terciario y desinfección. (ver figura 3)

El tratamiento primario tiene por objeto remover la materia orgánica suspendida (Diehl, 1998), mediante sedimentación y flotación, consiguiendo alta remoción de materia orgánica a bajo costo.

El tratamiento secundario tiene por objeto remover la materia orgánica disuelta (Gaudy, 1971), mediante las técnicas de lodos activados, lagunas y lombrifiltros. Esta etapa del tratamiento es muchas veces vista como la principal en una planta de tratamiento.

El tratamiento terciario tiene por objetivo remover cualquier otro elemento no deseado, y está enfocado principalmente a remover nutrientes como nitrógeno y fosforo.

La etapa de desinfección busca remover organismos patógenos para el ser humano, para ello se utiliza cloración (hipoclorito o gas cloro) y rayos UV.



**Figura 3:** Configuración típica de una Planta de Tratamiento de Aguas Servidas (Barañaño,2004)

Los lodos obtenidos del tratamiento primario, secundario y terciario son sometidos a tratamiento para estabilizar aquellos lodos biológicos que lo requieran con el fin de evitar la degradación natural de éstos, con los impactos ambientales negativos asociados a malos olores, emisiones de metano y ácido sulfhídrico, atracción de vectores sanitarios y agentes patógenos. Esto se consigue mediante el proceso biológico de digestión. Luego de la estabilización es necesario deshidratar el lodo, generalmente realizado por espesado gravitacional, seguido por deshidratación mecánica y eventualmente secado en canchas de secado, dando como resultado el biosólido.

### 1.3 Gestión de biosólidos.

Debido al alto volumen de tratamiento de aguas y la consiguiente generación de lodo y biosólido producto de este proceso, las empresas responsables de las plantas de tratamiento han ideado diferentes formas en las cuales disponer de estos residuos a fin de cumplir con la normativa vigente, presente en el “Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas” (D.S. n°004/2009). Es así como, por ejemplo, en la empresa Aguas Andinas S.A. se trataron 580.815.398 m<sup>3</sup> de agua el año

2016, produciendo 303.214 toneladas de biosólido, de los cuales el 22.2% se destinó a rellenos sanitarios, el 34% al Centro de gestión integral de biosólido El Rutal y el 43.8% a reutilización agrícola (Aguas Andinas, 2016). La reutilización agrícola de biosólido implica la aplicación de éstos a suelos degradados, en los cuales se consigue restablecer la calidad del suelo balanceando el pH, agregando materia orgánica, aumentando la capacidad de retención de agua, y restableciendo comunidades microbianas, entre otras. Cabe mencionar que se entiende por suelo degradado a aquel suelo que, por exceso de acidez, niveles de erosión, deterioro de la cubierta vegetal o que, por presentar otras limitaciones físicas, químicas o estructurales, no pueden ser utilizados de modo sustentable en la producción agropecuaria. Frente a todas estas ventajas y el crecimiento que año a año ha experimentado la utilización agrícola de biosólido, surge la necesidad de estudiar el contenido de contaminantes presentes en éstos residuos para determinar su interacción con el suelo, su movilidad, y así de esta manera percibir, la transferencia de éstos a los seres vivos que se encuentran en contacto con ellos y que tan peligrosos pueden llegar a ser para la salud humana.

#### **1.4 Contaminantes emergentes**

Debido al uso extendido de productos químicos en la cotidianeidad de las personas e industrias, no es raro encontrar sustancias contaminantes presentes en los desechos. Si esto lo asociamos a los procesos de tratamiento de aguas, y a la actividad extendida de aplicar biosólido para enmendar suelos e irrigar estos con aguas tratadas, es posible



encontrar la existencia de contaminantes, enlistados bajo la denominación de “contaminantes emergentes”.

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, ahora están siendo ampliamente detectados y tienen potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud (Stuart, 2012).

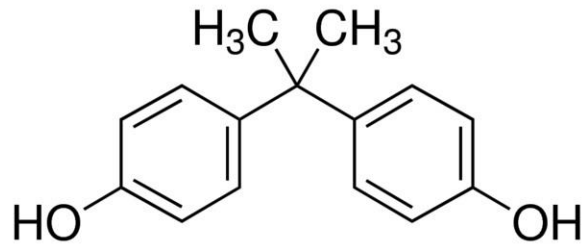
El grupo de los contaminantes emergentes contempla una amplia gama de compuestos químicos como, por ejemplo, productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP's), agentes tensoactivos, plastificantes y aditivos industriales que no están incluidos en el monitoreo actual de los programas de tratamiento de aguas, y de los cuales existe una limitada información disponible sobre el efecto que pueden causar en la salud humana y en el medioambiente (Smital, 2008). Se cree que el consumo a largo plazo de contaminantes traza y contaminantes emergentes puede generar efectos adversos en la salud de la mayoría de los organismos en concentraciones tan bajas como unos cuantos  $\text{ngL}^{-1}$  (Oros, 2003). El efecto y persistencia de estos contaminantes dependen de múltiples factores como lo son su naturaleza química, concentración y la matriz en la que se encuentran (suelo, agua, atmosfera o matriz biológica) (Epstein, 2003).

Los contaminantes emergentes pueden actuar como compuestos disruptores endocrinos (EDC's), sin embargo, predecir el efecto causado en la salud humana debido a la exposición es una tarea complicada (Petrovic, 2004).

Los compuestos disruptores endocrinos son definidos como un químico exógeno o mezcla de químicos, que interfieren con cualquier aspecto de la acción hormonal (Zoeller, 2012). Las personas y los animales entran en contacto con estos compuestos mediante variadas rutas, incluido el consumo de comida y agua, a través de la piel, por inhalación, y por transferencia de madre a feto, a través de la placenta o madre a infante, a través de la lactancia, si una mujer tiene disruptores endocrinos en su cuerpo.

### **1.5 Bisfenol A**

Dentro de los xenoestrógenos sintéticos, el Bisfenol A (BPA) (Figura 4) es el compuesto más importante, producto de una reacción de condensación entre dos moléculas de fenol y una de acetona en presencia de un catalizador, con una producción anual que excede los 8 millones de toneladas métricas. El BPA es usado en la síntesis de policarbonatos, resinas epóxicas y papel térmico (Hoekstra, 2013). Así, lo encontramos en múltiples productos cotidianos como tuberías, equipos electrónicos, papel o juguetes (Flint, 2012; Huang, 2012). Además de materiales que se encuentran en contacto con alimentos y bebidas como empaques, botellas y recubrimientos de latas (Yoshida, 2001; Niu, 2012; Makris, 2013). También es posible estar expuesto a BPA a través de inhalación y contacto dérmico (Geens, 2009; He, 2009).



**Figura 4:** Estructura molecular de Bisfenol A.

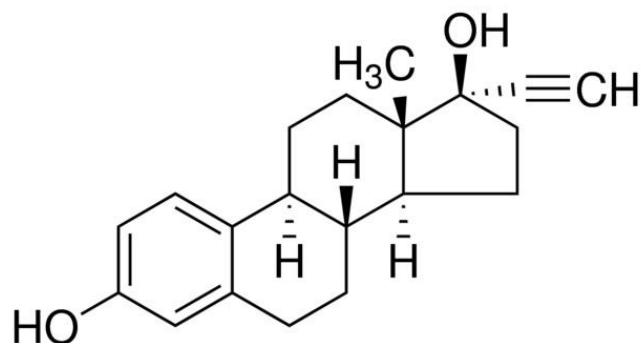
El BPA es capaz de unirse a múltiples tipos de receptores asociados con hormonas del sistema endocrino y otros sistemas del cuerpo (Wetherill, 2005; Iso, 2006; Ziv-Gal, 2013). Debido a su actividad disruptora endocrina y a su potencial mutagénico y oxidativo (Keri, 2007; Richter, 2007; Tayama, 2008; Moon, 2012) exhibe efectos tóxicos en animales y posiblemente en humanos. Se ha probado que el BPA altera las funciones de varias hormonas, incluyendo hormonas sexuales, leptina, insulina y tiroxina, causando efectos hepatológicos, inmunológicos, mutagénicos y carcinogénicos (Meeker, 2010; Doherty 2010; Clayton, 2011; Hassan, 2012), así como también su exposición aumenta los riesgos de obesidad, diabetes y enfermedades del corazón (Teppala, 2012; Shankar, 2012; Xing, 2010).

El BPA se ha demostrado mucho menos tóxico frente a plantas y microorganismos (bacterias, hongos y algas) que son capaces de transformarlo en metabolitos de menor toxicidad (Nakajima, 2002; Sun, 2012; Arboleda, 2013), incluso, algunas bacterias y hongos son capaces de mineralizar el BPA usándolo como fuente de energía y carbón (Shin, 2007; Matsumura, 2009). Estos organismos que degradan o transforman

efectivamente el BPA están siendo usados para removerlo desde ambientes contaminados (Li, 2012; Saiyood, 2013).

### **1.6 17- $\alpha$ -etinilestradiol**

El 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) (Figura 5) es a una hormona sintética derivada del estrógeno natural Estradiol (E2). Es principalmente utilizada como ingrediente activo en píldoras anticonceptivas. Otras aplicaciones de EE2 en medicina humana incluyen a la terapia de reemplazo de estrógenos (TRH, terapia de reemplazo hormonal) (Aris, 2014). Esta hormona es en gran parte excretada por humanos y animales en heces y orines. Es descrito como uno de los EDC's con mayor potencial disruptor (Silva, 2012; Ternes, 1999; Welshons, 2003; Combalbert, 2010; Atkinson, 2012), y ha sido caracterizado como uno de los mayores contribuyentes de actividad estrogénica asociados con las plantas de tratamiento de aguas (Fernández, 2007; Desbrow, 1998). Una vez liberado al ambiente acuático, es potencialmente capaz de modular o imitar la acción de estrógenos esteroidales endógenos de la biota expuesta, alterando la función natural del sistema endocrino y causando efectos adversos en la salud de las especies acuáticas (Campbell, 2006; Jobling, 2003). Su presencia en el ambiente ha sido asociada con la feminización de peces, modificación de comportamiento y reproducción, reducción de fertilidad, aumento de cáncer testicular y mamario en humanos, y la producción de procesos reproductivos anormales (Silva, 2012; Pereira, 2011; Vallejo, 2010; Martínez, 2012). Además, tiene el potencial de bioacumularse y entrar en la cadena trófica (Hibberd, 2009; Magi, 2010).



**Figura 5:** Estructura molecular de 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2)

Puede ser introducida al ambiente acuático a través de variadas rutas, por ejemplo, descargas de aguas residuales sin procesar (Saravanabhavan, 2009) y efluentes de plantas de tratamiento de aguas (Wierman, 2007; Lishman, 2006; Jobling, 2002), las que son consideradas las principales fuentes contaminantes, puesto que reciben varios estrógenos esteroidales y otros EDC's, al igual que la lixiviación proveniente de vertederos puede contener EDC's como Bisfenol A, Nonilfenol, octilfenol, E2 y EE2 (Behnsich, 2001).

Efluentes estrogénicamente activos provenientes de PTAS han sido reportados a nivel mundial en países como Noruega, Suecia, Alemania, Dinamarca, Estados Unidos, Reino Unido, Francia (Falconer, 2006) y Canadá (Lishman, 2006). Los niveles de esteroides estrogénicos pueden ser elevados y variar de acuerdo a muchos factores como densidad poblacional (Van Aerle, 2001; Desforges, 2010), el tipo de tratamiento realizado a las aguas (Khanal, 2006), el caudal del cuerpo receptor y el factor de dilución (Desforges, 2010), etc.

Asumiendo que, en países occidentales, aproximadamente el 17% del total de la población femenina toma regularmente píldoras anticonceptivas, se estima que 4,5 a 6  $\mu\text{g}$  por día de

EE2 son excretados por orina y heces respectivamente (Johnson, 2004; Xu, 2012). Estos datos son usados para predecir una descarga total de estrógenos de 4,4 kg anuales por millón de habitantes. Numerosos estudios reportan la presencia de EE2 en aguas de desecho y superficiales en varios países, en concentraciones desde  $\text{ngL}^{-1}$  a  $\mu\text{gL}^{-1}$  (Xu, 2012; Li, 2013; Pereira, 2011; Gabet, 2007; Ribeiro, 2009; Atkinson, 2012; Fayad, 2013).

Además del potencial movimiento de estos compuestos a aguas superficiales y subterráneas (Dutta, 2010; Guidice, 2011; Mansell, 2011; Yang, 2012; Gottschall, 2012), en el suelo existe el potencial de que estos compuestos alteren la actividad microbiana, así como que ingresen al medioambiente a través de muchas vías, plantas, microorganismos, etc. Hecho por el cual se estudiará la movilidad de BPA y EE2 (propiedades en tabla 1), mediante el método de lixiviación en columnas de suelo. Esto, acompañado del estudio de la actividad microbiana por medio del método de la determinación de  $\text{CO}_2$  mediante titulación con HCl. Lo que nos ayudará a comprender el comportamiento de estos compuestos químicos en suelos de la Región Metropolitana, lo que puede servir como complemento a la regulación del uso agrícola de lodos.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas Bisfenol A y 17- $\alpha$ -etinilestradiol

	<b>Bisfenol A</b>	<b>17-<math>\alpha</math>-etinilestradiol</b>
<b>Peso molecular (g mol<sup>-1</sup>)</b>	228,29	296,40
<b>Solubilidad en agua (mg L<sup>-1</sup>)</b>	300	4,7-19,3
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	3,32	4,15
<b>pKa</b>	9,9-11,3	10,24
<b>Constante de Henry (atm·m<sup>3</sup>/mol)</b>	3,98·10 <sup>-11</sup>	7,94·10 <sup>-12</sup>

## **1.7 Hipótesis**

Los biosólidos que se aplican al suelo como enmienda contienen Bisfenol A (BPA) y 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), los cuales, dependiendo de las características del suelo pueden ser lixiviados y contaminar el nivel freático.

## **1.8 Objetivos**

### **1.8.1 Objetivo General**

Estudiar la movilidad de BPA y EE2 a través de columnas de lixiviación y determinar la influencia en la actividad microbiana del suelo.

### **1.8.2 Objetivos Específicos**

- 1- Caracterizar física y químicamente las muestras de suelo
- 2- Determinar la actividad microbiana a través de la respiración del suelo ( $\text{CO}_2$  liberado) y la transformación de N orgánico de  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NH}_4^+$  desde suelo, con y sin adición de exceso de compuestos disruptores endocrinos.
- 3- Evaluar la movilidad de los compuestos desde el suelo a través del monitoreo del lixiviado proveniente de columnas con suelo y suelo enmendado con biosólido, sometidas a simulación de lluvia.
- 4- Analizar e interpretar los resultados.



## II. METODOLOGÍA

### 2.0 Materiales

#### 2.1 Reactivos y solventes

- Acetona, metanol y acetonitrilo grado HPLC, Merck (Darmstadt, Germany).
- Ácido sulfúrico (97%), ácido nítrico (65%), ácido clorhídrico (37%) Merck (Darmstadt, Germany).
- Dicromato de Sodio (BiosLab, Chile).
- Hidróxido de Sodio, Merck p.a.
- Ácido Salicílico, Merck (Darmstadt, Germany).
- Cloruro de Calcio Dihidrato, Merck p.a.
- Nitroprusiato de Sodio Dihidrato, Merck (Darmstadt, Germany).
- Hexametáfosfato de Sodio, Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Acetato de sodio, Merck (Darmstadt, Germany).
- Citrato Trisodio Dihidrato, Merck (Darmstadt, Germany).
- Hipoclorito de Sodio 5%, Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Sacarosa, Merck (Darmstadt, Germany).
- Agua ultrapura (Milli Q).

#### 2.2 Estándares

- 17 $\alpha$ -etinilestradiol 99%, Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Bisfenol a 99%, Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Estándar de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) 1000  $\text{mgL}^{-1}$ , Merck
- Estándar de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) 1000  $\text{mgL}^{-1}$ , Merck
- Estándar multielemento de metales 1000  $\text{mgL}^{-1}$ , Merck

### **2.3 Material de laboratorio**

- Columna vidrio 2.5 x 20 cm. Kimble, USA.
- Mangueras TYGON. Cole-Parmer US.
- Jeringa de Inyección HAMILTON de 50  $\mu$ L.
- Tubos de vidrio de 10 mL
- Viales ámbar de 10 mL
- Matraces de aforo de 5, 10, 50, 100, 250 y 1000 mL
- Matraces Erlenmeyer
- Tubos de centrífuga 50 mL.
- Membrana de PVDF de 0,45  $\mu$ m de poro
- Tubos eppendorf
- Bureta 50 mL.

### **2.4 Instrumentos y Equipos**

- Balanza analítica Swiss Quality 125 A
- Balanza digital Adam AQT-2600
- Balanza granataria PJ precisa junior 5000
- pH metro WTW pmx 3000
- Conductivímetro WTW LF 539
- Centrífuga varifuge 3.0, HeraeusSepatech
- Ultrasonido, Power Sonic 410
- Agitador Mecánico HEIDOLPH promax 2022
- Espectrofotómetro UV-Visible, Unicam UV/Vis spectrometer
- Espectrómetro Perkin Elmer 1100B
- Hidrómetro ASTM 152 H
- Termómetro BRAND
- Horno microondas Milestone mls 1200 Mega

- Incubadora VWR
- Estufa WTC Binder
- Rotavapor Heidolf HB Digital
- HPLC con detector de arreglo de diodos Waters 2998
- HPLC bomba Waters 1525
- HPLC desgasificador en línea Waters
- Bomba Peristáltica Gilson Minipuls 3
- Colector de fracción Advantec SF-2120
- Sistema Electroforesis Capilar Waters Quanta 4000e

## **2.5 Caracterización Fisicoquímica de los Suelos y Biosólido.**

Se utilizaron 3 suelos de la Zona Central de Chile (Melipilla) pertenecientes a las zonas de Codigua, Ostolazas y Pomaire. Su recolección se realizó eliminando el nivel superior (superficial) y restos orgánicos, obteniendo muestras de 0 a 20 cm de profundidad, las que fueron secadas al aire y tamizadas a un tamaño de 2 mm.

La muestra de biosólido se recolectó de una de las plantas de tratamientos de aguas servidas de la Región Metropolitana (El Rutil, 2016), luego se secó al aire y se tamizó a 2 mm.

Los suelos fueron caracterizados física y químicamente a través de: pH, contenido de carbono orgánico, conductividad eléctrica, contenido de metales pesados y textura.

### **2.5.1 Determinación de pH.**

Se preparó una suspensión de suelo previamente acondicionado (tamizado 2 mm), con agua en proporción 1:2,5. La suspensión se agitó vigorosamente durante 5 minutos en agitador recíproco y se dejó reposar por dos horas. La medición del pH se realizó mediante potenciometría con un electrodo combinado de vidrio-calomelano, previamente calibrado (Sadzawka, 2006).

### **2.5.2 Determinación de conductividad eléctrica.**

Las muestras de suelo, fueron independientemente mezcladas con agua destilada en una relación 1:5, utilizando un contenedor plástico. Se agitó por 30 minutos en agitador recíproco, se filtró con papel filtro N°2 y se colectó el filtrado en un vaso plástico para la medición en el conductivímetro. Posteriormente, se corrigió la conductividad a 25 °C (Sadzawka, 2007).

### **2.5.3 Determinación de Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).**

La determinación de la CIC se llevó a cabo mediante una saturación del suelo con una solución de acetato de sodio 1 M.

En un tubo de centrifuga se agregó 4 g de suelo junto con 33 mL de una solución de acetato de sodio 1 M a pH 8,2. Se agitó el tubo durante 5 minutos en un agitador mecánico recíproco. Se centrifugó 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se trató la muestra con otras tres porciones más de 33 mL de acetato de sodio 1 M. A continuación, se agregó 33 mL de etanol repitiendo el procedimiento anterior. Por último, se agregaron 3 porciones

de 33 mL de acetato de amonio y se colectó el sobrenadante en un matraz de aforo, completándose con agua a un volumen de 100 mL. El extracto se diluyó 50 veces al igual que los blancos.

Se elaboró una curva de calibración desde 1 mgL<sup>-1</sup> a 20 mgL<sup>-1</sup> de cloruro de sodio, a partir de un estándar de 1000 mgL<sup>-1</sup> de Na. Se midió el sodio presente en el extracto por Espectroscopía de Emisión Atómica (EEA), a 589 nm (M.L Jackson, 1970).

#### **2.5.4 Determinación de Carbono Orgánico (CO).**

Se pesó entre 1 y 2 g de suelo en triplicado, (si es biosólido la cantidad de muestra no debe superar los 0,1 g) y se colocaron en matraces Erlenmeyer. Se incluyeron dos blancos y seis matraces con 1 mL de una serie de estándares de carbono orgánico (CO) a partir de sacarosa (0 a 50 mg de CO/ml). A cada matraz se le agregó 10 mL de solución de dicromato de sodio (Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 0,5 M y 20 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado. Luego se dejó reposar sobre una plancha aislante bajo campana durante 30 minutos. Terminado el tiempo de reposo, se agregó 70 mL de agua Milli-Q y se dejó reposar durante la noche. Una alícuota del sobrenadante de cada matraz fue vertida a una cubeta y se midió el dicromato reducido en el espectrofotómetro UV-Vis a 600 nm (Sadzawka, 2006). La lectura obtenida fue utilizada para obtener el %CO en función de la siguiente fórmula:

$$\%CO = \frac{(a - b) \times 1,16}{10 \times s} \times fh$$

Donde:

%CO; porcentaje de carbono orgánico.

a, mg de CO en la muestra.

b, mg de CO en el blanco.

s, masa de suelo (g).

fh, factor de humedad.

1,16; factor de relación con el método de titulación (Walkey y Black).

La materia orgánica de los suelos, se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Materia orgánica (\%)} = 1,724 \times \%CO$$

Donde:

1,724; factor de conversión.

### **2.5.5 Determinación de metales pesados.**

Alrededor de 200 mg de muestra de suelo o de biosólido fue sometida a una pseudo-digestión con agua regia (ISO 11466). Se incluyeron dos blancos y a cada muestra se agregaron 6 mL de una mezcla concentrada de HCl y HNO<sub>3</sub> 1:3 (v/v), utilizando un horno microondas, Milestone mls 1200 Mega. El programa de digestión se dividió en tres etapas: 5 min a 250 W, 5 min a 400 W y 10 min a 500 W, luego se sometió a un minuto de ventilación y 30 minutos de reposo en un baño de agua fría. Las muestras digeridas, se transfirieron a matraces de 10 mL, se aforaron con agua Milli-Q y se filtraron con papel filtro N°2. Para determinar la concentración de los metales: Cu, Zn, Pb, Ni, Cr y Cd por

espectroscopía de absorción atómica (EAA) con llama (FAAS), se elaboró una curva de calibración a partir de un estándar multielemento (Merck) de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ , con los puntos: 0,002; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3,0 y  $3,5 \text{ mgL}^{-1}$  (Contreras, 2009).

### **2.5.6 Determinación de la Textura de los suelos.**

La determinación de textura de los suelos, se realizó a través del método del hidrómetro (Bouyoucos) que consistió en pesar 50 gramos de suelo en un frasco plástico de 1 L, luego se agregó 700 mL de agua destilada y 20 mL de solución de hexametáfosfato de sodio al 10%. Se dejó agitando la solución por 15 minutos en el agitador mecánico, se trasvasijó a una probeta de 1 L y se enrasó con agua destilada. Se tapó la probeta con parafilm y se agitó manualmente por un minuto. Se dejó en reposo por 4 minutos y se midió la temperatura y la lectura del hidrómetro. Se volvió a medir la temperatura y la lectura del hidrómetro luego de dos horas (Sadzawka, 2007).

Para conocer la textura de los suelos, fue necesario obtener las lecturas corregidas ( $H_c$ ), a través de las siguientes expresiones

$$H_{1c} = H_1 + [(T_1^{\circ}\text{F} - 67^{\circ}\text{F}) \times 0,2]$$

Donde:

$H_{1c}$ , corresponde a la lectura corregida del hidrómetro a los 4 minutos.

$H_1$ , corresponde a la lectura del hidrómetro a los 4 minutos.

$T_1$ , corresponde a la temperatura en  $^{\circ}\text{F}$  registrada a los 4 minutos.

$$H_{2c} = H_2 + [(T_2^{\circ}\text{F} - 67^{\circ}\text{F}) \times 0,2]$$

Donde:

$H_{2c}$ , corresponde a la lectura corregida del hidrómetro luego de dos horas.

$H_2$ , corresponde a la lectura del hidrómetro luego de dos horas.

$T_2$ , corresponde a la temperatura en °F registrada luego de dos horas.

Para conocer los porcentajes de Arena, Arcilla y Limo, se utilizaron las siguientes fórmulas:

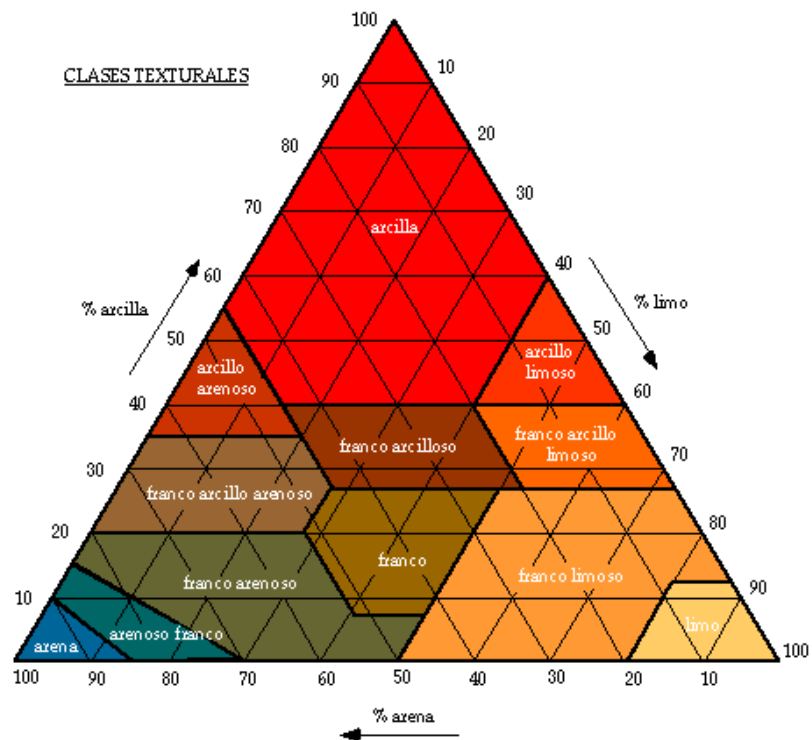
$$\%Arena = 100 - (H_{1c} \times 2)$$

$$\%Arcilla = H_{2c} \times 2$$

$$\%Limo = 100 - (\%Arcilla + \%Arena)$$

Luego fue posible encontrar la textura del suelo en el Triángulo de texturas presentado en la Figura 6.





**Figura 6:** Triángulo de texturas para clasificación de suelos.

## 2.6 Enriquecimiento del biosólido con BPA y EE2.

El biosólido se enriqueció con el equivalente a  $10 \text{ mgkg}^{-1}$  de EE2 o  $30 \text{ mgkg}^{-1}$  de BPA, por separado y de manera independiente, los cuales fueron agregados junto a un exceso de acetona a un balón de 250 mL. La mezcla fue agitada durante 24 horas en rotavapor. El balón se cubrió con papel de aluminio para evitar la fotodegradación de los compuestos (ver Figura 7). Posteriormente, el biosólido fue depositado en una cápsula y se dejó secar a la oscuridad bajo campana.



**Figura 7:** Incorporación de los analitos al biosólido por homogenización en rotavapor.

## **2.7 Estudio de la actividad microbiana.**

### **2.7.1 Determinación de CO<sub>2</sub> por titulación con HCl.**

La determinación de la actividad microbiana, se realizó colocando 25 g de muestra (suelo; suelo-biosólido; suelo-biosólido enriquecido en BPA y suelo-biosólido enriquecido en EE2) en frascos de vidrio de un litro. En el interior del frasco de vidrio, se dejó un vaso precipitado con agua destilada para mantener la humedad, y otro vaso precipitado con 10 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M. Los frascos se cerraron herméticamente y se incubaron a 25 °C durante cuatro semanas. La concentración de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) se determinó titulando el NaOH con ácido clorhídrico (HCl) 0,5 M luego de 24 horas de incubación, 14 días y una última medición a los 28 días (Anderson John P.E. 1982). Estos resultados fueron sometidos al análisis estadístico ANOVA en busca de diferencias significativas entre los tratamientos.

### **2.7.2 Determinación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ).**

En vasos precipitados se dispusieron 30 g de cada una de las muestras (suelo; suelo-biosólido; suelo-biosólido enriquecido en BPA y suelo-biosólido enriquecido en EE2) siendo llevadas a capacidad de campo e incubadas a 25°C durante 4 semanas.

Para llevar a cabo los respectivos análisis, 5 g de muestra (peso seco) fueron llevados a extracción con 50 mL de agua (relación suelo:agua = 1:10), agitando durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada 30 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante filtrado a través de una membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### **2.7.2.1 Determinación de Amonio.**

La determinación de amonio se llevó a cabo por espectrofotometría. Para ello, se prepararon las siguientes soluciones reactivas:

- i) Solución ácido salicílico: disolver 10 g de Citrato Trisodio junto a 10 g ácido salicílico en agua, agregar 35 ml de Hidróxido de Sodio 2 M y una vez frío diluir a 200 ml con agua.
- ii) Solución de Nitroprusiato de Sodio 1%: disolver 100 mg de Nitroprusiato de Sodio en 10 ml de agua (proteger de la luz)
- iii) Solución Hipoclorito de Sodio: preparar en Hidróxido de Sodio 2 M con 0,35% de Cloro disponible.

Así, 2 mL del extracto filtrado de las muestras fueron tomados y vertidos en un matraz de aforo de 10 mL al que se le agregaron 1 mL de la solución ácido salicílico y 0,1 mL de la solución de nitroprusiato, y llevados a aproximadamente 9 mL con agua. Luego se agregó

0,1 mL solución de hipoclorito de sodio y se aforo con agua. La absorbancia fue medida luego de 1 hora a 697,5 nm frente a un blanco preparado de la misma forma, pero sin presencia de nitrógeno amoniacal.

Las curvas de calibración (ver Figura 8) se prepararon a partir de estándares (Merck) de 1000 mgL<sup>-1</sup> de amonio (Qiu, 1987)



**Figura 8:** Coloración curva de calibración (frente) y muestras (fondo) para determinación de Amonio.

#### **2.7.2.2 Determinación de Nitrato.**

La determinación de nitrato presente en los extractos filtrados se llevó a cabo mediante la técnica de Electroforesis Capilar de Zona (Figura 9), usando detección indirecta a una longitud de onda de 254nm (lámpara de mercurio). Para ello, se utilizó solución electrolito Cromato de Sodio (pH=8), capilar de 60cm de largo, voltaje 20kV y un tiempo de inyección de muestra de 30 s.

Así, las lecturas fueron interpoladas en los resultados entregados por las curvas de calibración preparadas a partir de estándares (Merck) de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  de nitrato. (Stahl, 1994)



**Figura 9:** Equipo de Electroforesis capilar utilizado en la determinación de Nitrato.

## **2.8 Estudio de lixiviación en columnas de suelo.**

Las muestras de suelo y suelo-biosólido fueron empacadas en columnas de vidrio a una altura de aproximadamente 15 cm. siendo posteriormente saturadas con solución de  $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$  hasta su máxima capacidad de retención de agua. Los compuestos (BPA o EE2) fueron aplicados por separado y de manera independiente, en la parte superior de la columna, en forma de un pulso de solución que otorgara 2mg de compuesto efectivo a la columna de suelo. Todas las pruebas fueron llevadas a cabo en oscuridad a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Una cantidad predeterminada de solución simulada de lluvia fue agregada mediante goteo durante el transcurso de no menos de 48 h en cada columna de suelo. Las

cantidades de cada compuesto contenidas en el lixiviado fueron determinadas mediante HPLC-DAD y graficadas de acuerdo a la concentración relativa (concentración en el lixiviado/ concentración inicial) frente al volumen de poro (espacio que ocupa un fluido entre las partículas de suelo) correspondiente a cada columna. (OECD, 2003). Los resultados obtenidos fueron utilizados en un análisis estadístico ANOVA, con la finalidad de determinar si los factores actividad microbiana, tratamiento, textura y carbono orgánico generaban diferencias en la concentración de los analitos lixiviados.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Caracterización física y química de los suelos y del biosólido.

En la Tabla 2, se muestran las propiedades fisicoquímicas de los suelos y biosólido que fueron utilizados para los ensayos de lixiviación mediante columnas. Los tres suelos presentan elevado contenido de materia orgánica, un pH levemente básico y conductividad acorde a suelos no salinos. Importante destacar la cantidad de carbono orgánico presente en el biosólido (superior a 35%), lo que lo hace apto para enmendar suelos agrícolas.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de los suelos y biosólido\*.

	<b>Suelo Codigua</b>	<b>Suelo Ostolazas</b>	<b>Suelo Pomaire</b>	<b>Biosólido</b>
<b>pH</b>	7,69	7,60	7,74	-
<b>Conductividad a 25°C (dSm<sup>-1</sup>)</b>	0,074	0,19	0,11	-
<b>Carbono orgánico (%)</b>	2,47	2,15	1,71	35,5
<b>Materia orgánica (%)</b>	4,25	3,71	2,95	-
<b>Capacidad de intercambio catiónico (cmolk<sup>-1</sup>)</b>	13,9	25,9	18,3	-
<b>Densidad aparente (gmL<sup>-1</sup>)</b>	1,47	1,27	1,29	-
<b>Textura</b>	Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoso	-

\*Los valores de la Tabla 2, corresponden a resultados experimentales con un triplicado para cada experimento, y sus desviaciones estándar relativa no superaron el 5%.

En la Tabla 3, se informa el contenido de metales pesados presentes en los suelos seleccionados, así como las concentraciones máximas permitidas para restaurar suelos degradados, estipulados en la legislación correspondiente al D.S. N°004. Se aprecia que los tres suelos cumplen con la normativa, con lo cual la tasa máxima permitida de

aplicación de biosólido para tratarlos correspondería a 90 Mg de biosólido por hectárea de suelo.

Tabla 3. Concentraciones máximas de metales pesados en suelos receptores según normativa y concentración de metales pesados presentes en los suelos seleccionados.

Metal (mgkg <sup>-1</sup> )	Concentración máxima en mgkg <sup>-1</sup> suelo (en base materia seca)						
	Macrozona norte		Macrozona sur	Suelo Codigua	Suelo Ostolaza	Suelo Pomaire	Biosólido
	pH > 6,5	pH ≤ 6,5	pH > 5				
<b>Cd</b>	2	1,25	2	0,17	0,073	0,049	1,59
<b>Cu</b>	150	100	75	0,015	0,019	0,023	326
<b>Ni</b>	112	50	30	12,9	30,8	5,94	68,5
<b>Pb</b>	75	50	50	0,0061	0,0087	0,0079	40,2
<b>Zn</b>	175	120	175	0,052	0,066	0,064	957

\*Los valores de la Tabla 3, corresponden a resultados experimentales con un triplicado para cada experimento, y sus desviaciones estándar relativa no superaron el 5%.

De los metales analizados en los suelos seleccionados, mostrados en la Tabla 3, el de mayor importancia debido a la facilidad de ingresar a la cadena trófica mediante la absorción realizada por los tejidos vegetales, y posteriormente bioacumularse, es el Cd, el cual no debiera sobrepasar los 0,5mg/kg en suelos libres de contaminación (Criterios de Calidad de Suelo Agrícola, SAG, 2005).



Debido a la ausencia de industrias de alto impacto contaminante como refinerías o mineras, se asume que la composición de los suelos no se ha visto mayormente alterada respecto a lo que a metales se refiere, con lo que el contenido de metales correspondería a origen natural, en el peor de los casos emisiones atmosféricas de ciertos metales (Cu, Zn) podrían ser depositadas sobre el suelo (Criterios de Calidad de Suelo Agrícola, SAG, 2005).

Respecto a si el biosólido aumenta la disponibilidad de metales pesados en el suelo que lo recibe, diversos estudios han demostrado lo contrario, debido al alto contenido de carbono orgánico presente en el biosólido, este inmoviliza gran parte de los metales (Contreras, 2009). Lo que es respaldado, a nivel nacional, por un estudio preliminar desarrollado para la elaboración del Protocolo de Aplicación de Residuos Sólidos al Suelo (2008) llevado a cabo por el SAG.

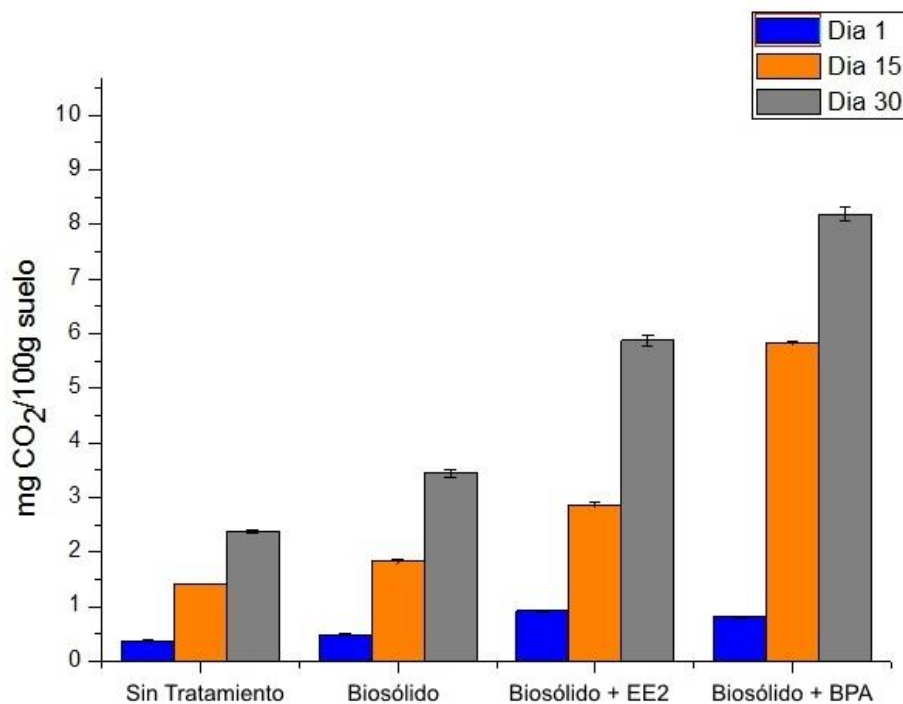
### **3.2 Determinación de la actividad microbiana.**

La actividad microbiana es la responsable en un suelo, de procesos como los de mineralización y humificación de su materia orgánica, lo cual incide sobre otra serie de procesos en que se ven incluidos elementos fundamentales en el suelo (C, N, P y S). La microbiota existente en el suelo, se verá afectada por problemas de contaminación y descontaminación, siendo la mencionada actividad un reflejo de la posibilidad de degradación de compuestos que pueden considerarse tóxicos para ese suelo. Tanto la degradación como la mineralización de compuestos orgánicos, generan liberación de CO<sub>2</sub>

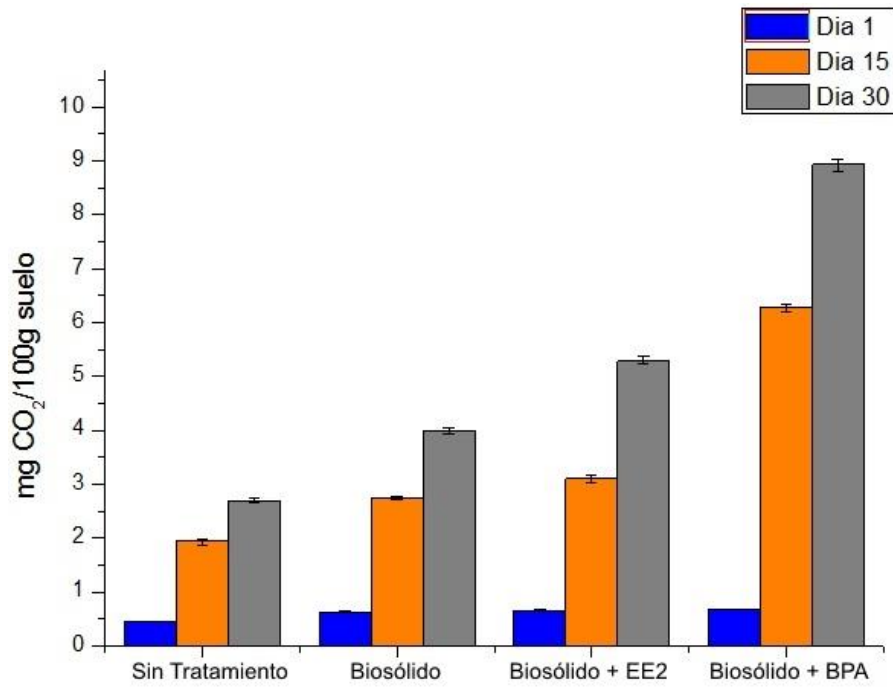
como producto final, por lo que su cuantificación da cuenta de la actividad microbiana del suelo.

Por lo anterior, determinar la actividad microbiana es importante, puesto que la degradación generada por éstos podría ser la responsable de la ausencia o baja concentración de BPA y EE2 lixiviada a través de las columnas.

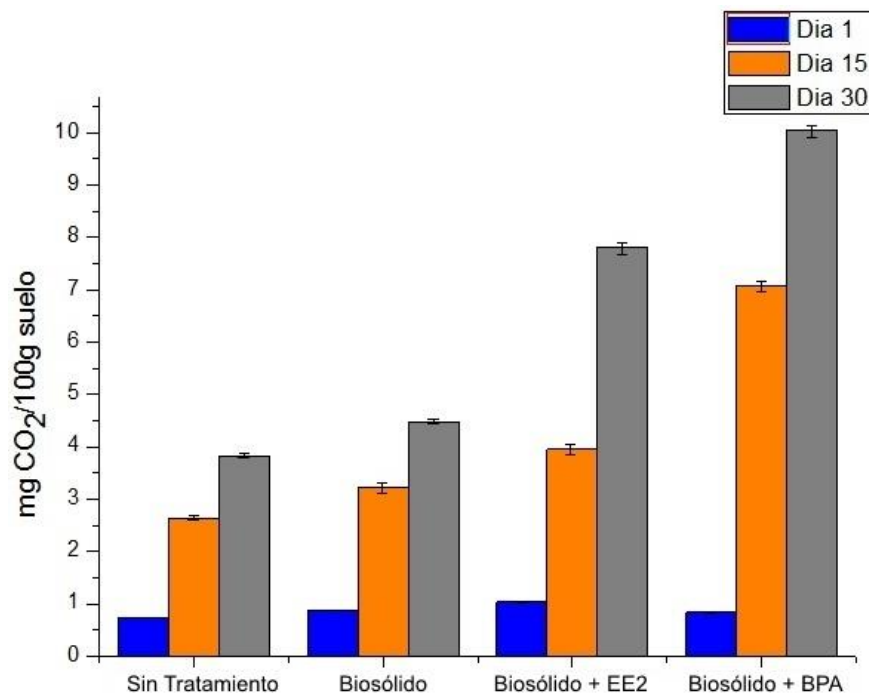
Las figuras 10, 11 y 12 muestran la influencia ejercida por los distintos tratamientos sobre la actividad microbiana de los suelos Codigua, Pomaire y Ostolazas, respectivamente.



**Figura 10:** Actividad microbiana en suelo Codigua sometido a los diferentes tratamientos.



**Figura 11:** Actividad microbiana en suelo Pomaire sometido a los diferentes tratamientos.



**Figura 12:** Actividad microbiana en suelo Ostolazas sometido a los diferentes tratamientos.

Al someter los resultados obtenidos en el estudio de la actividad microbiana a una comparación estadística frente a los factores de tiempo y tratamiento, mediante ANOVA multivaria, se observan diferencias entre los suelos sin tratamiento, los tratados con biosólido, y los tratados con biosólido enriquecido (Tabla 4, anexo: tablas 23 y 24). La diferencia entre éstos se debe claramente al aumento en el contenido de materia orgánica presente en los suelos tratados. Además, los suelos tratados muestran diferencias posiblemente debidas a que los compuestos utilizados para enriquecer el biosólido constituyen un insumo atractivo para los microorganismos cuyos productos de degradación son posteriormente mineralizados a CO<sub>2</sub>.

También puede observarse un claro aumento de la actividad microbiana con el avance de los días, lo que se relaciona con la reproducción de los microorganismos con el correr del tiempo.

Tabla 4. Resultados del análisis ANOVA para la actividad microbiana en suelos, respecto de los tratamientos utilizados y el tiempo.

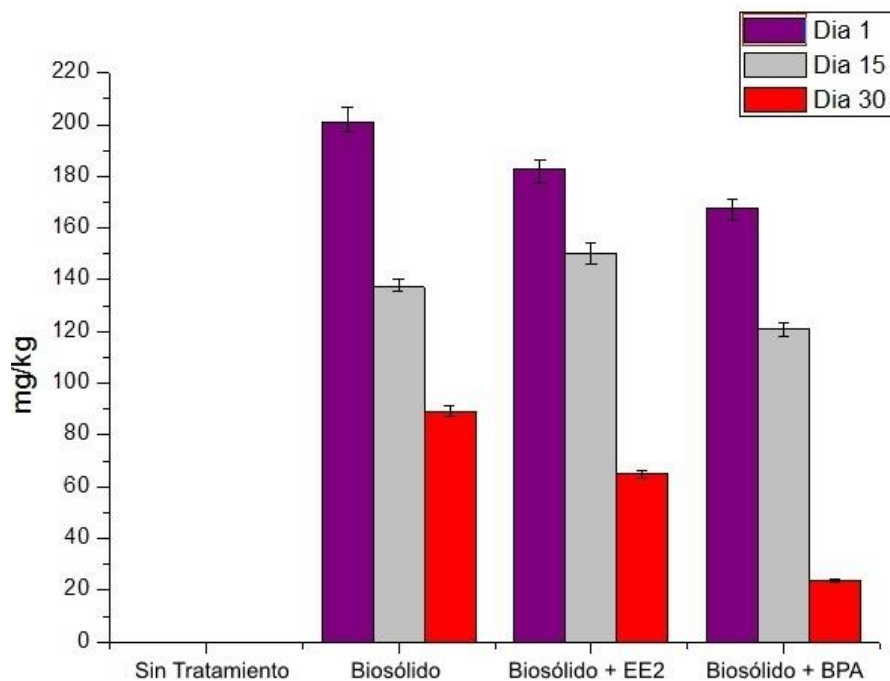
<b>Fuente</b>	<b>SC Ajust</b>	<b>GL</b>	<b>MC Ajust</b>	<b>Valor-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>A: Tiempo</b>	432,823	2	216,412	663,67	0,0000
<b>B: Tratamiento</b>	201,257	3	67,0857	205,73	0,0000
<b>AB: Interacciones</b>	101,65	6	16,9417	51,96	0,0000
<b>Residuos</b>	31,3039	96	0,326083		
<b>Total (corregido)</b>	767,034	107			

### 3.3 Determinación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ).

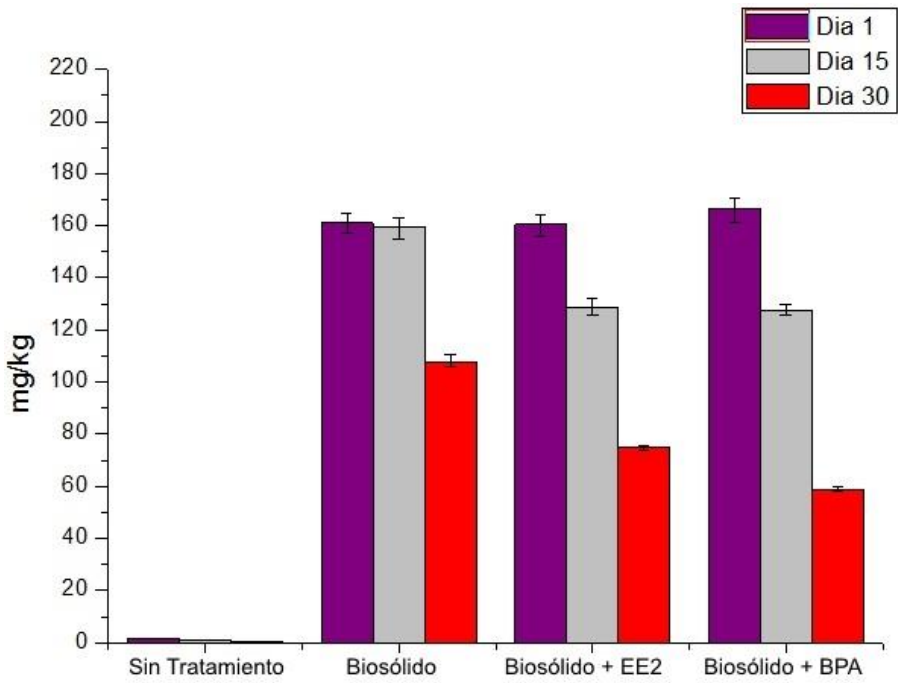
La actividad microbiana del suelo, también puede estimarse en función del contenido de las especies predominantes del ciclo del nitrógeno.

El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) dan cuenta del poder de degradación de la materia orgánica que tienen las bacterias a través de la generación de amonio (amonificación) y de la conversión oxidativa de amonio a nitrato (nitrificación). Dada la importancia que tiene el ciclo del nitrógeno en la fertilidad de un suelo, fue necesario analizar si este fue afectado por la presencia de los compuestos agregados.

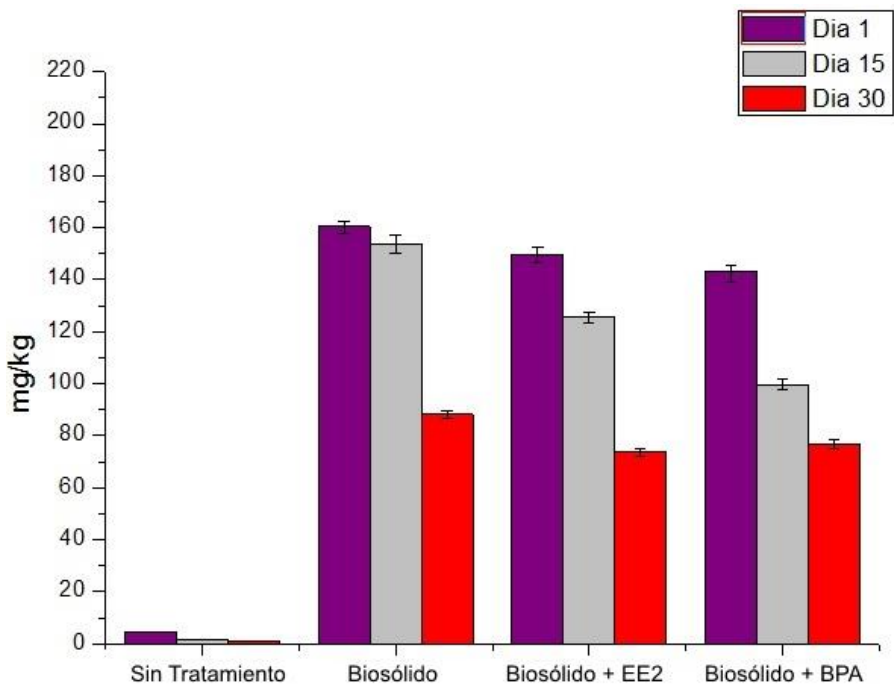
Las figuras 13 a 18 muestran la influencia ejercida por los compuestos sobre la presencia de amonio y nitrato en cada suelo.



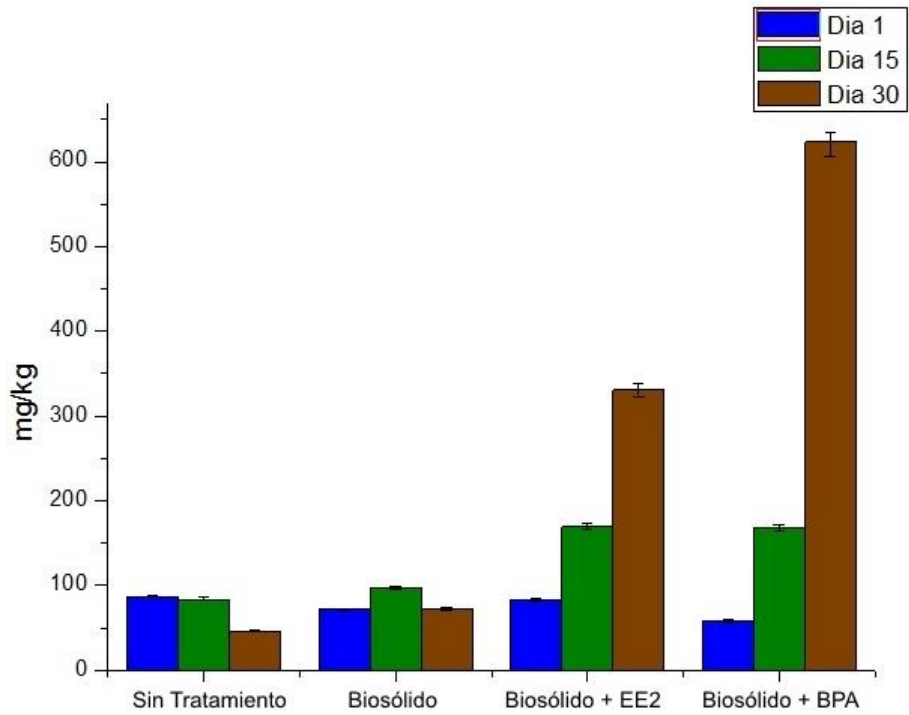
**Figura 13:** Amonio en suelo Codigua sometido a los diferentes tratamientos.



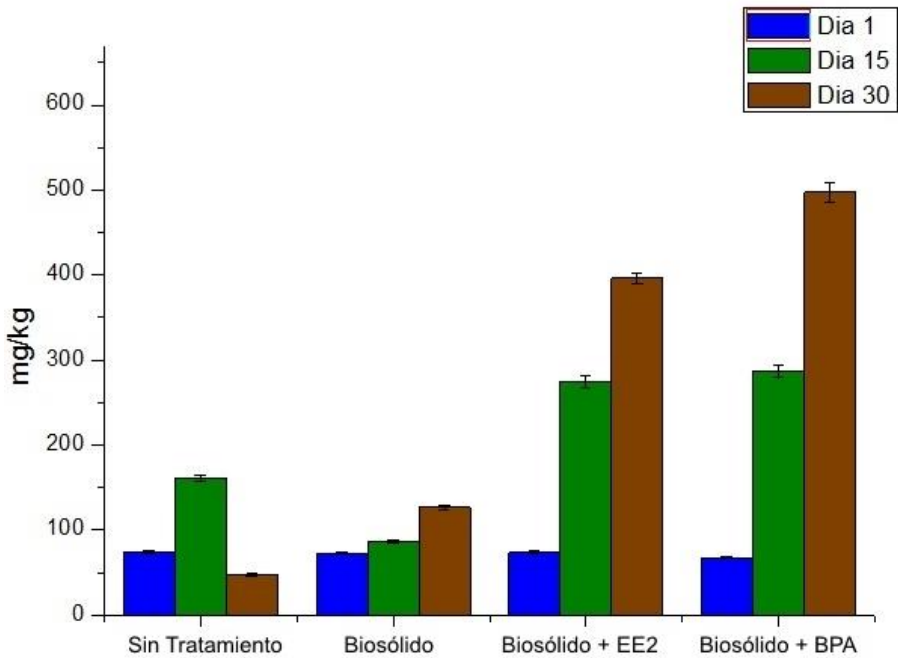
**Figura 14:** Amonio en suelo Pomaire sometido a los diferentes tratamientos.



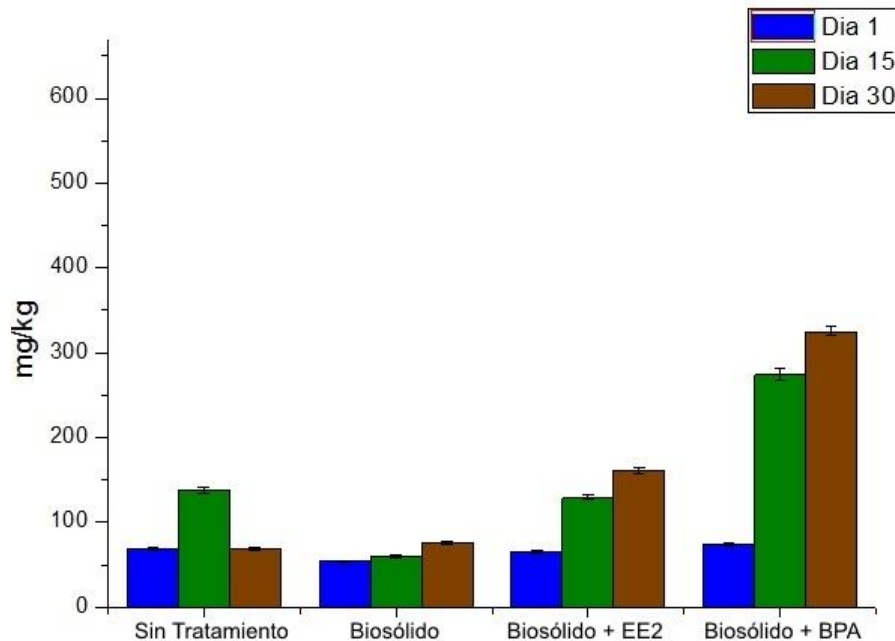
**Figura 15:** Amonio en suelo Ostolazas sometido a los diferentes tratamientos.



**Figura 16:** Nitrato en suelo Codigua sometido a los diferentes tratamientos.



**Figura 17:** Nitrato en suelo Pomaire sometido a los diferentes tratamientos.



**Figura 18:** Nitrato en suelo Ostolazas sometido a los diferentes tratamientos.

Los resultados anteriores nos muestran que una gran cantidad de amonio es entregado por la adición de biosólido al suelo. Es posible observar, además, la disminución de éste con el mayor tiempo de incubación, lo que se correlaciona con el proceso de nitrificación y el aumento en los niveles observados de nitrato gracias a los microorganismos nitrificantes responsables del cambio de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$  y posteriormente a  $\text{NO}_3^-$ .

Sin embargo, la actividad nitrificante está estrechamente relacionada con la biodegradación tanto de BPA como de EE2, de tal forma que el amonio del suelo se convierte en insumo para bacterias nitrificantes como nitrobacter y nitrosomonas, las cuales son capaces de degradar EE2 y BPA (Clouzot, 2008; Roh, 2009; Flores, 2010; Zhang, 2013).

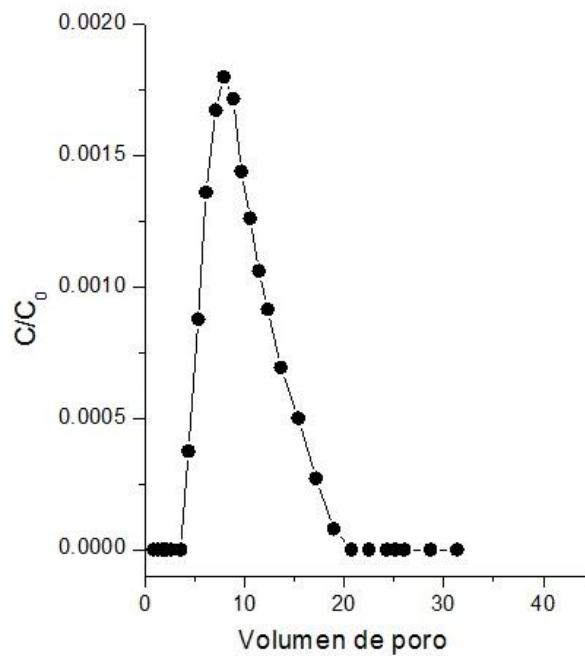


### 3.4 Estudios de lixiviación.

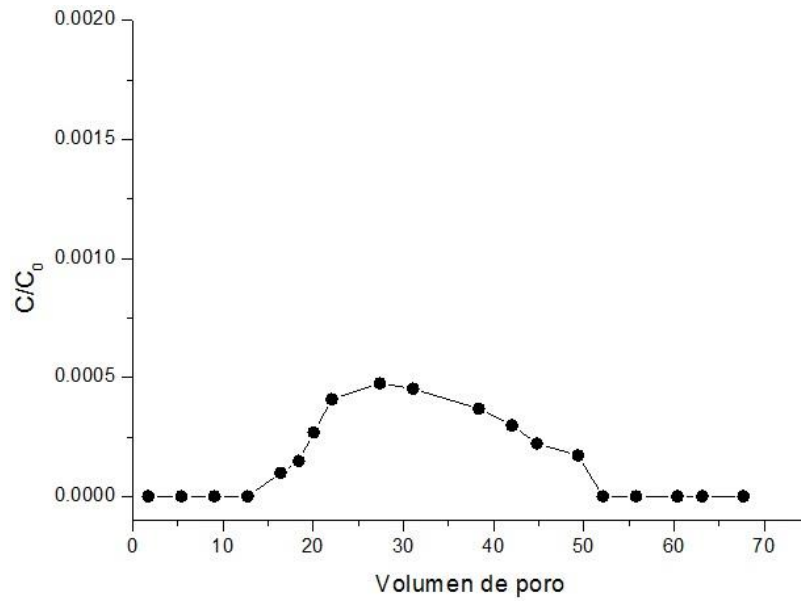
El estudio de lixiviación implicó la recolección y análisis mediante HPLC de los lixiviados provenientes de las respectivas columnas de suelo y suelo-biosólido realizadas para cada uno de los 3 suelos seleccionados.

En las figuras 19 a 24 se presentan la serie de curvas de lixiviación obtenidas para cada compuesto.

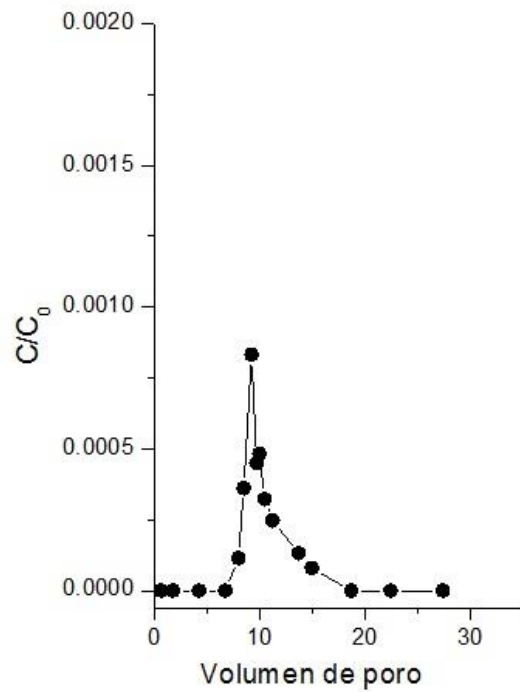
#### BPA



**Figura 19:** Curva de lixiviación de BPA en suelo Codigua.

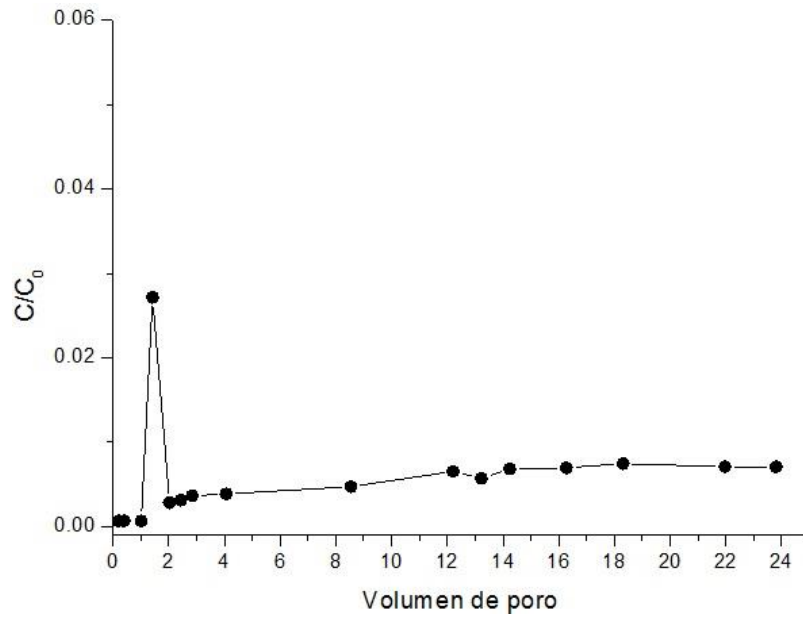


**Figura 20:** Curva de lixiviación de BPA en suelo Codigua-biosólido.

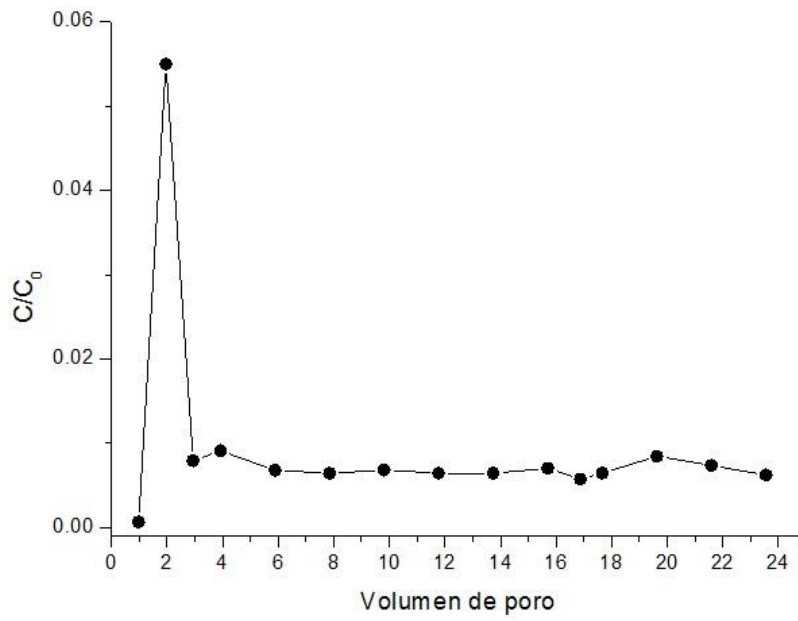


**Figura 21:** Curva de lixiviación de BPA en suelo Pomaire.

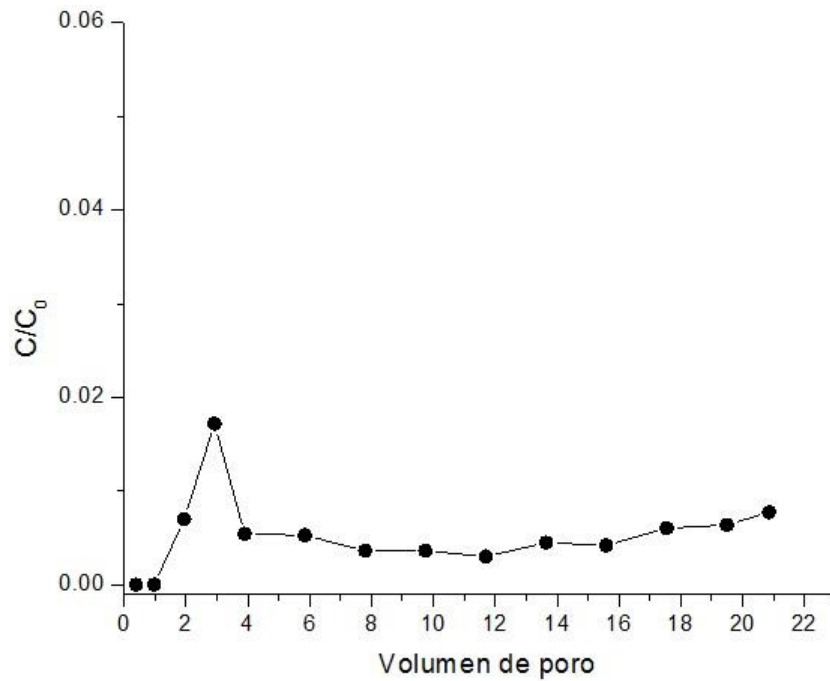
EE2



**Figura 22:** Curva de lixiviación de EE2 en suelo Codigua.



**Figura 23:** Curva de lixiviación de EE2 en suelo Codigua-biosólido.



**Figura 24:** Curva de lixiviación de EE2 en suelo Pomaire.

A fin de establecer como se ve afectada la concentración lixiviada de los analitos por factores como la textura y tipo de suelo, así como por la actividad microbiana y cantidad de materia orgánica presente en éstos, se realizó un ANOVA. Mediante el resultado de éste, junto con las gráficas obtenidas (y su forma), además del hecho que no fue posible detectar BPA ni EE2 en los lixiviados provenientes de los suelos Ostolazas, Ostolazas-biosólido y Pomaire-biosólido, es posible establecer que la retención y/o la no detección de los compuestos en los suelos se compone de un compromiso entre la textura que éstos presentan ( $P = 0,017$ , tabla 5) y el valor obtenido para la actividad microbiana ( $P < 0,001$ , tabla 6).

Tabla 5. Resumen del análisis ANOVA para la concentración de los analitos lixiviados respecto al tipo de suelo.

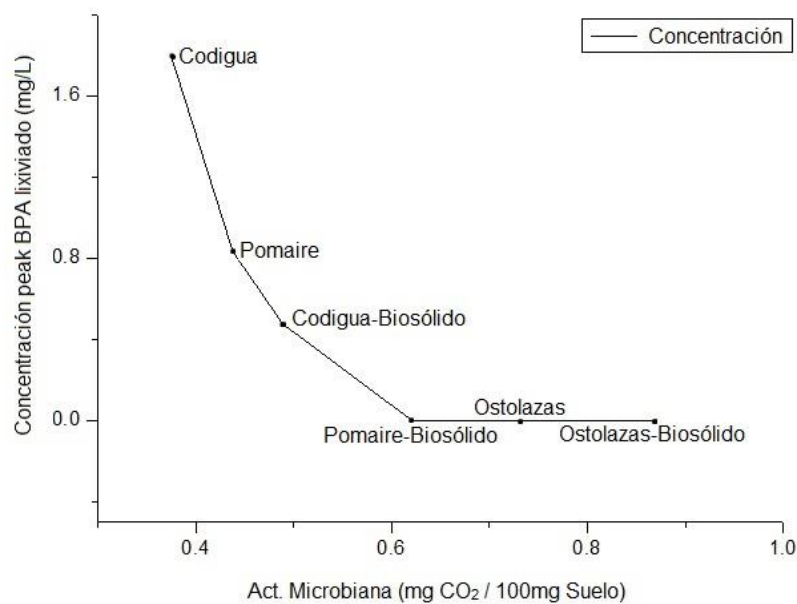
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Tipo de suelo</b>	1	2,303	2,3027	8,25	0,017
<b>Error</b>	10	2,792	0,2792		
<b>Total</b>	11	5,095			

Tabla 6. Resumen del análisis ANOVA para la concentración de los analitos lixiviados respecto a la Actividad Microbiana presente en los suelos.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Act. Microbiana</b>	4	4,9600	1,23999	63,18	0.000
<b>Error</b>	7	0,1374	0,01963		
<b>Total</b>	11	5,0973			

Así, para el flujo correspondiente a 0,23 mL/min (máxima velocidad aplicable sin sobresaturar las columnas de suelo del tipo franco-arenoso), es posible apreciar que en el suelo arenoso de Codigua, a pesar de presentar mayor cantidad de materia orgánica, fue posible obtener curvas tanto para suelo sin tratamiento como para suelo tratado con biosólido, esto debido a su granulometría que permite una velocidad de lixiviación mayor que la de los demás suelos en estudio, lo que dificulta la formación de interacciones por parte de los analitos. Igual de importante se presenta la actividad microbiana encontrada en este suelo, la de menor valor entre los suelos utilizados, lo que implica una menor degradación de los analitos en su paso por esta columna de suelo.

Concordantemente, las gráficas obtenidas en este estudio de lixiviación corresponden a los suelos con menor actividad microbiana, Codigua, Codigua-biosólido y Pomaire, que presentan valores menores a 0,5 mg de CO<sub>2</sub> por 100g de suelo (Figura 25).



**Figura 25.** Relación entre Actividad Microbiana y Concentración Peak BPA lixiviado

La idea anterior se refuerza cuando observamos los suelos de Ostolazas y Pomaire, ambos del tipo franco arenoso que, sometidos al mismo flujo de entrada, presenta curvas solo para el suelo de Pomaire, posiblemente debido a que éste posee menor cantidad de materia orgánica con la cual los compuestos puedan interaccionar, y menor actividad microbiana disponible para degradar los analitos. El efecto de la adición de biosólido a los suelos es posible verlo de manera más clara al observar las curvas para BPA en suelo Codigua y Codigua-biosólido, en esta última, se aprecia el retardo en la lixiviación del compuesto y un ensanchamiento en la curva del lixiviado.

Las curvas de lixiviación de EE2 presentan un fuerte peak inicial que denota la salida del exceso de compuesto, y una posterior salida de manera casi constante del compuesto retenido, confirmando la mayor afinidad del analito con el suelo. Se observa además la

diferencia de magnitudes en la concentración relativa ( $C/C_0$ ) entre los suelos Codigua y Pomaire, este último con un menor contenido de materia orgánica y textura más compacta, pero con una mayor actividad microbiana.

#### IV. CONCLUSIONES

- Los suelos utilizados mostraron diferencia en textura, de importancia significativa en la retención y/o degradación de los analitos, y similitud en pH ( $\approx 7.7$ ), característica influyente en la adsorción de BPA y EE2.
- El estudio de la actividad microbiana mostró un aumento de ella en los suelos tratados con biosólido enriquecido, comparado con el suelo tratado con biosólido y suelo sin tratamiento.
- Para efectos de la incidencia que podrían tener los compuestos sobre el ciclo del nitrógeno, se encontró que éstos incrementaron la transformación del amonio a nitrato, este incremento fue más notorio en los suelos tratados con biosólido enriquecido comparado con los suelos tratados con biosólido natural y suelos sin tratamiento.
- El proceso de lixiviación realizado a través de columnas de suelo mostró que la retención de los compuestos fue función de factores como la textura y la actividad microbiana. Así, los suelos tratados con biosólido al igual que suelos sin tratar que poseen una mayor actividad microbiana, presentaron disminución y/o no detección de los analitos agregados debidos a una mayor retención de los compuestos seleccionados y a procesos de degradación.



## V. REFERENCIAS

1. Aguas Andinas S.A. 2016. Reporte de Sustentabilidad 2016, Capitulo 4, 69p.
2. Anderson John P., Methods of Soil Analysis. Page A.L., Miller R.H., Keeney D.R. 1982. Madison, Wisconsin USA. 41:831-845.
3. Arboleda, C., Cabana, H., De Pril, E., Peter Jones, J., Jiménez, G.A., Mejía, A.I., Agathos, S.N., Penninckx, M.J. 2013. Elimination of Bisphenol A and Triclosan using the enzymatic system of autochthonous colombian forest fungi. ISRN Biotechnology. 2013:968241
4. Aris, A., Shamsuddin, A., Praveena, S. 2014. Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. Environment International 69:104-119.
5. Atkinson S., Marlatt, V., Kimpe, L., Lean, D., Trudeau, V., Vlasis, J. 2012. The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants. Sci Total Environ. 430:119-125.
6. Behnisch, P., Fujii, K., Shiozaki, K., Kawakami, I., Sakai, S. 2001. Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. Chemosphere. 43:977-984.
7. Campbell, C., Borglin, S., Green, F., Grayson, A., Wozniak, E., Stringfellow, W. 2006. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. Chemosphere. 65:1265-1280.
8. Clayton, E., Tood, M., Dowd, J., Aiello, A. 2011. The impact of Bisphenol A and Triclosan on immune parameters in the U.S. population, NHANES 2003-2006. Environ Health Perspect 119(3):390-396.
9. Clouzot, L., Marrot, B., Doumenq, P., Roche, N. 2008. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. J. Environ Prog. 27(3):383-396.
10. Combalbert, S., Hernandez-Raquet, G. 2010. Occurrence, fate and biodegradation of estrogens in sewage and manure. Appl Microbiol Biotechnol 86(6):1671-1692.
11. Contreras, E. 2009. Biodisponibilidad de metales traza en suelos tratados con distintas dosis de biosólido. Uso de plantas de Ballica como bioindicador. Memoria (Químico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
12. Decreto Supremo N°004. Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas 28/10/2009. <https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=1007456&idVersion=2010-04-26>
13. Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent, 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. Environ Sci Technol. 32(11),1549-1558.
14. Desforges, J.P., Peachey, B.D., Sanderson, P.M., White, P.A., Blais, J.M. 2010. Plasma vitellogenin in male teleost fish from 43 rivers worldwide is correlated with upstream human population size. Environ Pollut. 158(10):3279-3284.

15. Diehl, S., Jeppsson, U. 1998. A model of the settler coupled to the biological reactor. *Wat Res.* 32(2):331-342.
16. Doherty, L.F., Bromer, J.G., Zhou, Y., Aldad, T.S., Taylor, H.S. 2010. In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Horm Cancer.* 1(3):146-155.
17. Dutta, S., Inamdar, S., Tso, J., Aga, D.S., Sims, J.T. 2010. Free and conjugated estrogen exports in surface-runoff from poultry litter-amended soil. *J. Environ. Qual.* 39(5):1688-1698.
18. Epstein, E. 2003. Land application of sewage sludge and biosolids. Lewis Publishers. CRC Press LLC, USA
19. Falconer, I.R., Chapman, H.F., Moore, M.R., Ranmuthugala, G. 2006. Endocrine-disrupting compounds: a review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environ Toxicol.* 21(2):181-191.
20. Fayad, P.B., Prevost, M., Sauve, S. 2013. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters, *Talanta* 115:349–360.
21. Fernandez, M.P., Ikonomou, M.G., Buchanan, I. 2007. An assessment of estrogenic organic contaminant in Canadian wastewaters. *Sci Total Environ.* 373(1):250-269
22. Flint, S., Markle, T., Thompson, S., Wallace, E. 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *J Environ Manage.* 104:19-34.
23. Flores, Y. 2010. Remoción de esteroides estrogénicos y patógenos en aguas residuales municipales mediante un biorreactor aerobio con membranas. Tesis para optar al grado de Maestro en Ingeniería Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ingeniería Campus Morelos
24. Gabet, V., Miege, C., Bados, P., Coquery, M. 2007. Analysis of estrogens in environmental matrices, *TrAC Trends Anal. Chem.* 26(11):1113–1131.
25. Gaudy, A., Gaudy, E.T. 1971. Biological Concepts for Design and Operation of the Activated Sludge Process. U.S. Environmental Protection Agency Project 17090 FQJ, Septiembre 1971.
26. Geens, T., Roosens, L., Neels, H., Covaci, A. 2009. Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere.* 76(6):755-760
27. Gottschall, N., Topp, E., Metcalfe, C., Edwards, M., Payne, M., Kleywegt, S., Russell, P., Lapen, D.R. 2012. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere.* 87(2):194-203
28. Guidice, B.D., Young, T.M. 2011. Mobilization of endocrine-disrupting chemicals and estrogenic activity in simulated rainfall runoff from land-applied biosolids. *Environ Toxicol Chem.* 30(10):2220-2228
29. Hassan, Z.K., Eloibeid, M.A., Virk, P., Omer, S.A., ElAmin, M., Daghestani, M.H., AlOlayan, E.M. 2012. Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid Med Cell Longev.* 2012:194829

30. He, Y., Miao, M., Wu, C., Yuan, W., Gao, E., Zhou Z., Li, D.K. 2009. Occupational exposure levels of bisphenol A among Chinese workers. *J Occup Health* 51:432-436.
31. Hibberd, A., Maskaoui, K., Zhang, Z., Zhou, J.L. 2009. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment, *Talanta* 77(4):1315–1321.
32. Hoekstra, E.J., Simoneau, C. 2013. Release of bisphenol A from polycarbonate: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53(4):386-402.
33. Huang, Y.Q., Wong, C.K.C., Zheng, J.S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlstrom, B., Neretin, L., Wong, M.H. 2012. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ Int.* 42:91-99
34. Iso, T., Watanabe, T., Iwamoto, T., Shimamoto, A., Furuichi Y. 2006. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol Pharm Bull.* 29(2):206-210.
35. Jackson M.L 1970. *Análisis químico de suelos.* Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. p 1002.
36. Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod.* 66(2):272-281
37. Jobling, S., Tyler, C.R. 2003. Endocrine disruption, parasites and pollutants in wild freshwater fish. *Parasitology* 126(7):103-107
38. Johnson, A.C., Williams, R.J. 2004. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works, *Environ. Sci. Technol.* 38(13):3649–3658.
39. Keri, R.A., Ho, S.M., Hunt, P.A., Soto, A.M., Prins, G.S. 2007. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod Toxicol* 24(2):240-252
40. Khanal, S.K., Xie, B., Thompson, M.L., Sung, S., Ong, S.K., Van Leeuwen, J. 2006. Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environ Sci Technol.* 40(21):6537-6546
41. Li, G., Zu, L., Wong, P.K., Hui, X., Lu, Y., Xiong, J., An, T. 2012. Biodegradation and detoxification of bisphenol A with one newly-isolated strain *Bacillus* sp. GZB: Kinetics, mechanism and estrogenic transition. *Bioresour Technol* 114:224-230.
42. Li, J., Fu, J., Zhang, H., Li, Z., Ma, Y., Wu, M., Liu, X. 2013. Spatial and seasonal variations of occurrences and concentrations of endocrine disrupting chemicals in unconfined and confined aquifers recharged by reclaimed water: a field study along the Chaobai river, Beijing, *Sci. Total Environ.* 450:162–168.
43. Lishman, L., Smyth, S.A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M., Seto, P. 2006. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogen by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Sci Total Environ* 367(2-3):544-558
44. Magi, E., Scapolla, C., Di Carro, M., Liscio, C. 2010. Determination of endocrine-disrupting compounds in drinking waters by fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 45:1003–1011.

45. Makris, K.C., Andra, S.S., Jia, A., Herrick, L., Christophi, C.A., Snyder, S.A., Hauser, R. 2013. Association between water consumption from polycarbonate containers and bisphenol A intake during harsh environmental conditions in summer. *Environ Sci Technol.* 47(7):3333-3343
46. Mansell D.; Bryson R.; Harter T.; Webster J.; Kolodziej E.; Sedlak D. 2011. Fate of endogenous steroid hormones in steer feedlots under simulated rainfall-induced runoff. *Environ. Sci. Technol.*, 45 (20), pp 8811–8818
47. Martinez, N.A., Pereira, S.V., Bertolino, F.A., Schneider, R.J., Messina, G.A., Raba, J. 2012. Electrochemical detection of a powerful estrogenic endocrine disruptor: ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure, *Anal. Chim. Acta* 723:27–32.
48. Matsumura, Y., Hosokawa, C., Sasaki-Mori, M., Akahira, A., Fukunaga, K., Ikeuchi, T., Oshiman, K., Tsuchido, T. 2009. Isolation and characterization of novel bisphenol-A-degrading bacteria from soils. *Biocontrol Sci.* 14(4):161-169
49. Meeker, J.D., Calafat, A.M., Hauser, R. 2010. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environ Sci Technol.* 44:1458-1463
50. Moon, M.K., Kim, M.J., Jung, I.K., Koo, Y.D., Ann, H.Y., Lee, K.J., Kim, S.H., Yoon, Y.C., Cho, B.J., Parks, K.S., Jang, H.C., Park, Y.J. 2012. Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *J Korean Med Sci.* 27:644-652
51. Nakajima, N., Ohshima, Y., Seriwaza, S., Kouda, T., Edmonds, J.S., Shiraishi, F., Aono, M., Kubo, A., Tamaoki, M., Saji, H., Morita, M. 2002. Processing of bisphenol A by plant tissues: Glucosylation by cultured BY-2 cells and glucosylation/translocation by plants of *Nicotiana Tabacum*. *Plant Cell Physiol.* 43(9):1036-1042
52. Niu, Y., Zhang, J., Wu, Y., Shao, B. 2012. Analysis of bisphenol A and alkylphenols in cereals by automated on-line solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 60(24):6116-6122
53. OECD (2004), *Test No. 312: Leaching in Soil Columns*, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070561-en>
54. Oros, D.R., Jarman, W.M., Lowe, T., David, N., Lowe, S., Davis, JA. 2003. Surveillance for previously unmonitored organic contaminants in the San Francisco Estuary. *Mar Pollut Bull.* 46(9):1102-1110
55. Pereira, R.O., Postigo, C., Lopez de Alda, M., Daniel, L.A., Barcelo, D. 2011. Removal, of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products, *Chemosphere* 82:789–799.
56. Petrovic, M., Eljarrat, E., Lopez de Alda, M.J., Barceló, D. 2004. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Anal Bioanal Chem.* 378(3):549-562
57. Qiu X.; Liu G. 1987. Determination of water-soluble ammonium ion in soil by spectrophotometry. *Analyst* 112:909-911.

58. Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Rocha, E., Rocha, M.J. 2009. Seasonal and spatial distribution of several endocrine-disrupting compounds in the Douro river estuary, Portugal, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56:1–11.
59. Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R., vom Saal, F.S. 2007. In Vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol.* 24(2):199-224.
60. Roh H.; Subramanya N.; Zhao F.; Yu C.; Sandt J.; Chu K. 2009. Biodegradation potential of wastewater micropollutants by ammonia-oxidizing bacteria. *Chemosphere* 77:1084-1089.
61. Sadzawka A. Carrasco M., Grez R., Mora M., Flores H., Neaman A. 2006. Métodos de Análisis recomendados para suelos de Chile. Revisión 2006. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas INIA - N° 34, Santiago, Chile.
62. Sadzawka, A., Zagal, E. 2007. Protocolo de Análisis para suelos y lodos. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán. Comisión de Normalización y Acreditación de la Sociedad Chilena del Suelo por encargo del Servicio Agrícola Ganadero.
63. SAG, 2005. Criterios de calidad de aguas o efluentes tratados para uso en riego.
64. Saiyood, S., Inthorn, D., Vangnai, A.S., Thiravetyan, P. 2013. Phytoremediation of bisphenol A and total dissolved solids by the mangrove plant, *Bruguiera Gymnorhiza*. *Int J Phytoremediation.* 15(5):427-438.
65. Saravanabhavan, G., Helleur, R., Hellou, J. 2009. GC-MS/MS measurement of natural and synthetic estrogens in receiving waters and mussels close to a raw sewage ocean outfall. *Chemosphere.* 76(8):1156-1162.
66. SISS, 2018. Plantas de tratamiento de aguas servidas – Región Metropolitana. Act. 30-05-2018. <http://www.siss.gob.cl/577/w3-article-5059.html>
67. Smital, T. 2008. Acute and chronic effects of emerging contaminants. *Hdb Env Chem* 5(1):105-142.
68. Shankar, A., Teppala, S., Sabanayagam, C. 2012. Bisphenol A and peripheral arterial disease: Results from the NHANES. *Environ Health Perspect.* 120(9):1297-1300.
69. Shin, E.H., Choi, H.T., Song, H.G. 2007. Biodegradation of endocrine-disrupting Bisphenol A by white rot fungus *Irpex Lacteus*. *J Microbiol Biotechnol.* 17(7):1147-1151.
70. Silva, C.P., Otero, M., Esteves, V. 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review, *Environ. Pollut.* 165:38–58.
71. Stahl, R., 1994. Routine determination of anions by capillary electrophoresis and ion chromatography, *J. Chromatogr. A.* 686:143-148.
72. Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., Hart, A. 2012. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci Total Environ.* 416:1-21.
73. Sun, Q., Li, Y., Chou, P.H., Peng, P.Y., Yu, C.P. 2012. Transformation of bisphenol A and alkylphenols by ammonia-oxidizing bacteria through nitration. *Environ Sci Technol.* 46(8):4442-4448.
74. Tayama, S., Nakagawa, Y., Tyama, K. 2008. Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutat Res.* 649(1-2):114-125.

75. Teppala, S., Madhavan, S., Shankar, A. 2012. Bisphenol A and metabolic syndrome: Results from NHANES. *Int J Endocrinol.* 2012(1):598180.
76. Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil, *Sci. Total Environ.* 225:81–90.
77. Vallejo, A., Usobiaga, A., Martinez-Arkarazo, I., Prieto, A., Etxebarria, N., Zuloaga, O., Fernandez, L.A. 2010. Ultrasonic-assisted derivatization of estrogenic compounds in a cup horn booster and determination by GC–MS, *J. Sep. Sci.* 33:104–111.
78. Van Aerle, R., Nolan, M., Jobling, S., Christiansen, L.B., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. 2001. Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environ Toxicol Chem.* 21(12):2841-2847
79. Welshons, W.V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., vom Saal, F.S. 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity, *Environ. Health Perspect.* 111:994–1006.
80. Wetherill, Y.B., Fisher, N.L., Staubach, A., Danielsen, M., de Vere White, R.W., Knudsen, K.E. 2005. Xenoestrogen action in prostate cancer: Pleiotropic effects dependent on androgen status. *Cancer Res.* 65(1):54-65.
81. Wierman, M.E. 2007. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Adv Physiol Educ.* 31(1):26-33.
82. Xing, L., Xu, Y., Xiao, Y., Shang, L., Liu, R., Wei, X., Jiang, J., Hao, W. 2010. Embryotoxic and teratogenic effects of the combination of bisphenol A and genistein on In Vitro cultured postimplantation rat embryos. *Toxicol Sci* 115(2):577-588.
83. Xu, N., Xu, Y.-F., Xu, S., Li, J., Tao, H.-C. 2012. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: a Chinese perspective, *Environ. Pollut.* 165:215–224.
84. Yang Y.; Gray J.; Furlong E.; Davis J.; ReVello R.; Borch T. 2012. Steroid hormone runoff from agricultural test plots applied with municipal biosolids. *Environmental Science & Technology* 46(5):2746-2754.
85. Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y., Nakazawa, H. 2001. Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Addit Contam.* 18(1):69-75.
86. Zhang W.; Yin K.; Chen L. 2013. Bacteria-mediated bisphenol A degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5681-5689.
87. Ziv-Gal, A., Craig, Z.R., Wang, W., Flaws, J.A. 2013. Bisphenol A inhibits cultured mouse ovarian follicle growth partially via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Reprod Toxicol.* 42:58-67.
88. Zoeller, R.T., Brown, T.R., Doan, L.L., Gore, A.C., Skakkebaek, N.E., Soto, A.M., Woodruff, T.J., Vom Saal, F.S. 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from the endocrine society. *Endocrinology.* 153(9):4097-4110.



## VI. ANEXOS

Tabla 7. Textura de los suelos.

Suelo	%Arena	%Arcilla	%Limo	Textura
Codigua	87,84	8,440	3,720	Arena
Ostolazas	65,84	14,44	19,72	Franco Arenoso
Pomaire	60,56	17,08	22,36	Franco Arenoso

Tabla 8. Determinación de CO<sub>2</sub> (mg de CO<sub>2</sub> en 100g de suelo)

Suelo	Día 1	Día 15	Día 30
Codigua	0,375	1,414	2,366
Pomaire	0,438	1,955	2,693
Ostolazas	0,735	2,629	3,827
Codigua+biosólido	0,489	1,832	3,454
Pomaire+biosólido	0,621	2,745	3,988
Ostolazas+biosólido	0,869	3,214	4,471
Codigua+biosólido enr BPA	0,808	5,832	8,192
Pomaire+biosólido enr BPA	0,673	6,281	8,934
Ostolazas+biosólido enr BPA	0,832	7,081	10,05
Codigua+biosólido enr EE2	0,920	2,858	5,886
Pomaire+biosólido enr EE2	0,649	3,099	5,291
Ostolazas+biosólido enr EE2	1,034	3,957	7,821

Tabla 9. Determinación de amonio (mgkg<sup>-1</sup>)

Suelo	Día 1	Día 15	Día 30
Codigua	n.d	n.d	n.d
Pomaire	1,570	0,930	0,720
Ostolazas	4,360	1,530	0,990
Codigua+biosólido	200,9	137,2	89,30
Pomaire+biosólido	161,0	159,4	107,6
Ostolazas+biosólido	160,5	153,9	88,30
Codigua+biosólido enr BPA	167,5	121,1	23,89
Pomaire+biosólido enr BPA	166,3	127,7	58,61
Ostolazas+biosólido enr BPA	143,1	99,69	76,90
Codigua+biosólido enr EE2	182,8	149,9	65,00
Pomaire+biosólido enr EE2	160,4	128,4	74,82
Ostolazas+biosólido enr EE2	149,9	123,5	73,85



Tabla 10. Determinación de nitrato ( $\text{mgkg}^{-1}$ )

Suelo	Día 1	Día 15	Día 30
Codigua	87,05	83,61	45,89
Pomaire	74,06	161,2	47,50
Ostolazas	68,66	137,9	68,43
Codigua+biosólido	71,80	97,26	72,21
Pomaire+biosólido	72,60	86,29	126,6
Ostolazas+biosólido	54,12	59,63	75,66
Codigua+biosólido <sub>enr BPA</sub>	58,67	168,4	623,1
Pomaire+biosólido <sub>enr BPA</sub>	67,64	287,8	497,5
Ostolazas+biosólido <sub>enr BPA</sub>	74,20	273,9	325,1
Codigua+biosólido <sub>enr EE2</sub>	83,31	169,4	330,5
Pomaire+biosólido <sub>enr EE2</sub>	73,66	274,8	396,9
Ostolazas+biosólido <sub>enr EE2</sub>	65,41	128,8	161,8

Tabla 11. Lixiviación BPA en suelo Codigua.

Tiempo (hrs)	Volumen Acumulado (ml)	Volumen de poro	Concentración (ppm)
3,3	60,0	2,1	n.d
4,2	72,5	2,6	n.d
6,0	100,0	3,5	0,0736
7,5	122,5	4,3	0,3747
9,3	150,0	5,3	0,8770
10,8	172,5	6,1	1,360
12,7	200,0	7,1	1,673
14,2	222,5	7,9	1,799
16,0	250,0	8,8	1,716
17,5	272,5	9,6	1,440
19,2	297,5	10,5	1,262
20,8	322,5	11,4	1,061
22,5	347,5	12,3	0,9150
25,0	385,0	13,6	0,6936
28,3	435,0	15,4	0,5002
31,7	485,0	17,2	0,2714
35,0	535,0	18,9	0,0798
38,3	585,0	20,7	n.d
41,7	635,0	22,5	n.d

Tabla 12. Lixiviación BPA en suelo Codigua-biosólido.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
8,1	132,5	4,8	n.d
11,4	185,4	6,7	n.d
14,7	249,6	9,0	0,0985
16,6	280,3	10,2	0,1485
18,1	305,5	11,0	0,2685
19,9	336,2	12,2	0,4085
24,7	417,3	15,1	0,4755
28,1	473,2	17,1	0,4525
34,7	584,9	21,2	0,3685
38,1	640,9	23,2	0,2985
40,6	682,8	24,7	0,2225
44,7	752,7	27,3	0,1425
47,2	794,6	28,8	0,0716
50,6	850,5	30,8	n.d
54,7	920,4	33,3	n.d

Tabla 13. Lixiviación BPA en suelo Pomaire.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
8,5	127,5	4,2	n.d.
13,5	202,5	6,7	n.d.
16,0	240,0	8,0	0,1156
17,0	255,0	8,4	0,3617
18,5	277,5	9,2	0,8330
19,5	292,5	9,7	0,4499
20,0	300,0	9,9	0,4829
21,0	315,0	10,4	0,3232
22,5	337,5	11,2	0,2478
27,5	412,5	13,7	0,1331
30,0	450,0	14,9	0,0799
37,5	562,5	18,6	n.d.
45,0	675,0	22,4	n.d.

Tabla 14. Lixiviación BPA en suelo Pomaire-biosólido.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
6,3	113,8	3,6	n.d.
13,3	218,7	7,0	n.d.
21,3	338,8	10,8	n.d.
25,3	398,8	12,8	n.d.
28,8	451,3	14,4	n.d.
33,8	526,2	16,8	n.d.
38,8	601,3	19,2	n.d.
43,8	676,3	21,6	n.d.

Tabla 15. Lixiviación BPA en suelo Ostolazas.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
0,25	13,8	0,4	n.d.
0,4	70,0	2,2	n.d.
8,8	141,3	4,5	n.d.
13,0	205,0	6,5	n.d.
16,3	253,8	8,1	n.d.
19,3	298,8	9,5	n.d.
23,8	366,3	11,7	n.d.
28,8	441,2	14,1	n.d.
36,3	553,7	17,7	n.d.
38,8	591,2	18,9	n.d.
41,3	628,7	20,1	n.d.

Tabla 16. Lixiviación BPA en suelo Ostolazas-biosólido.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
1,3	38,7	1,3	n.d.
10,0	170,0	5,5	n.d.
15,0	245,0	8,0	n.d.
20,0	320,0	10,4	n.d.
25,0	395,0	12,8	n.d.
30,0	470,0	15,3	n.d.
35,0	545,0	17,7	n.d.
40,0	620,0	20,1	n.d.
45,0	695,0	22,6	n.d.
47,5	732,5	23,8	n.d.

Tabla 17. Lixiviación EE2 en suelo Codigua.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
0,8	11,5	0,4	n.d.
2,1	28,8	1,0	n.d.
2,9	40,3	1,4	6,794
4,2	57,5	2,0	0,7033
5,0	69,0	2,4	0,7813
5,8	80,5	2,8	0,9062
8,3	115,0	4,1	0,9615
17,5	241,5	8,5	1,179
25,0	345,0	12,2	1,628
27,1	373,8	13,2	1,425
29,2	402,5	14,2	1,703
33,3	460,0	16,3	1,736
37,5	517,5	18,3	1,861
45,0	621,0	22,0	1,767

Tabla 18. Lixiviación EE2 en suelo Codigua-biosólido.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
2,1	28,7	1,0	n.d.
4,2	57,5	2,0	13,75
6,3	86,3	2,9	1,981
8,3	115,0	3,9	2,274
12,5	172,5	5,9	1,696
16,7	230,0	7,8	1,609
20,8	287,5	9,8	1,707
25,0	345,0	11,8	1,612
29,2	402,5	13,7	1,606
33,3	460,0	15,7	1,754
35,8	494,5	16,9	1,432
37,5	517,5	17,7	1,613
41,7	575,0	19,6	2,111
45,8	632,5	21,6	1,841
50,0	690,0	23,5	1,554

Tabla 19. Lixiviación EE2 en suelo Pomaire.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
0,8	11,5	0,4	n.d.
2,1	28,7	1,0	n.d.
4,2	57,5	1,9	1,751
6,3	86,3	2,9	4,299
8,3	115,0	3,9	1,358
12,5	172,5	5,8	1,318
16,7	230,0	7,8	0,9039
20,8	287,5	9,7	0,9056
25,0	345,0	11,7	0,7516
29,2	402,5	13,6	1,120
33,3	460,0	15,6	1,047
37,5	517,5	17,5	1,507
41,7	575,0	19,5	1,594
44,6	615,2	20,9	1,937

Tabla 20. Lixiviación EE2 en suelo Pomaire-biosólido.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
2,1	28,7	0,9	n.d.
6,3	86,3	2,9	n.d.
10,4	143,8	4,8	n.d.
16,7	230,0	7,6	n.d.
25,0	345,0	11,4	n.d.
33,3	460,0	15,2	n.d.
41,7	575,0	19,0	n.d.
43,3	598,0	19,8	n.d.

Tabla 21. Lixiviación EE2 en suelo Ostolazas.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
1,4	19,2	0,6	n.d.
4,7	60,7	1,9	n.d.
11,4	143,5	4,5	n.d.
16,6	207,6	6,5	n.d.
19,9	249,1	7,8	n.d.
24,7	309,1	9,7	n.d.
34,7	433,3	13,5	n.d.
40,6	508,6	15,9	n.d.

Tabla 22. Lixiviación EE2 en suelo Ostolazas-biosólido.

<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Volumen Acumulado (ml)</b>	<b>Volumen de poro</b>	<b>Concentración (ppm)</b>
0,4	5,7	0,2	n.d.
1,3	17,3	0,6	1.0375
2,1	28,8	0,9	n.d.
6,3	86,3	2,9	n.d.
8,3	115,0	3,8	n.d.
12,5	172,5	5,7	n.d.
16,7	230,0	7,6	n.d.
20,8	287,5	9,5	n.d.
25,0	345,0	11,4	n.d.
29,2	402,5	13,3	n.d.
37,5	517,5	17,1	n.d.
44,6	615,3	20,3	n.d.
46,3	638,3	21,1	n.d.
47,9	661,3	21,8	n.d.

Tabla 23. Resumen del análisis ANOVA para la actividad microbiana en suelos sin tratar y tratados con biosólido, respecto del tiempo y el tratamiento.

<b>Fuente</b>	<b>SC Ajust</b>	<b>GL</b>	<b>MC Ajust</b>	<b>Valor-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>A: Tiempo</b>	75,5002	2	37,7501	169,61	0,0000
<b>B: Tratamiento</b>	4,61477	1	4,61477	20,73	0,0000
<b>AB: Interacciones</b>	1,68459	2	0,842296	3,78	0,0298
<b>Residuos</b>	10,6835	48	0,222573		
<b>Total (corregido)</b>	92,4831	53			

Tabla 24. Resumen del análisis ANOVA para la actividad microbiana en suelos tratados con biosólido y con biosólido enriquecido, respecto del tiempo y el tratamiento.

<b>Fuente</b>	<b>SC Ajust</b>	<b>GL</b>	<b>MC Ajust</b>	<b>Valor-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>A: Tiempo</b>	441,157	2	220,579	625,64	0,0000
<b>B: Tratamiento</b>	124,525	2	62,2626	176,60	0,0000
<b>AB: Interacciones</b>	65,9548	4	16,4887	46,77	0,0000
<b>Residuos</b>	23,3848	72	0,352567		
<b>Total (corregido)</b>	657,022	80			

Tabla 25. Resumen del análisis ANOVA para la concentración de los analitos lixiviados respecto al Tratamiento aplicado a los suelos.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Tratamiento</b>	1	1,530	1,5301	4,38	0.063
<b>Error</b>	10	3,497	0,3497		
<b>Total</b>	11	5,027			

Tabla 26. Resumen del análisis ANOVA para la concentración de los analitos lixiviados respecto al Carbono Orgánico presente en los suelos.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>C. Orgánico</b>	3	1,631	0,5436	1,26	0.353
<b>Error</b>	8	3,464	0,4330		
<b>Total</b>	11	5,095			