RCHSCFA
revista chapingo serie ciencias forestales y del ambiente

SALES SOLUBLES Y METALES PESADOS EN SUELOS TRATADOS CON BIOSÓLIDOS

SOLUBLE SALTS AND HEAVY METALS IN BIOSOLIDS-TREATED SOILE.

Robledo- Santoyo[1]; V. Espinosa Hernández[2]; R. Maldonado Torres[1]; J. E. Rubiños Panta[2]; E. Hernández Acosta[1], E. Ojeda Trejo[2]y L. Corlay Chee[1]

[1]Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carr. México-Texcoco. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.
Correo-e: erobledo@correo.chapingo.mx;
[2]Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

RESUMEN

Las plantas de tratamientos de aguas residuales (PTAR) generan diariamente toneladas de lodos (biosólidos), los cuales pueden tener un uso agrícola como fuente de nutrientes y material mejorador del suelo, aunque también pueden ser fuente de contaminación por metales pesados y sales solubles. En este estudio se evaluó, en un suelo representativo de la zona de influencia de la PTAR de la ciudad de Aguascalientes, México, la aplicación de biosólidos y el efecto de su contenido de metales pesados y sales solubles en el suelo y plantas de pasto ballico, con la finalidad de establecer su aprovechamiento agrícola sin riesgo potencial de degradación y contaminación de suelos y plantas. Se hizo una caracterización química de los biosólidos y los suelos estudiados. Los biosólidos presentaron pH ligeramente ácido, alto contenido en sales solubles y concentración de metales pesados dentro de los límites máximos permisibles según la NOM-004-SEMARNAT-2002, por lo que se les puede dar uso agrícola. Dosis crecientes de biosólidos incorporados al suelo no presentaron efectos en éste, en cuanto a acumulación de metales pesados, pero sí se incrementó el contenido de sales solubles, y con dosis superiores a 80 $t \cdot ha^{-1}$ se llegó a niveles que pueden reducir el rendimiento de la mayoría de cultivos.

Recibido: 9 de abril, 2010
Aceptado: 25 de julio, 2010
doi: 10.5154/r.rchscfa.2010.04.021
http:// www.chapingo.mx./revistas

PALABRAS CLAVE:
Contaminación, degradación, plantas de tratamiento de aguas residuales

ABSTRACT

Wastewater treatment plants (WWTP) generate tons of sewage sludge or biosolids daily, which can have an agricultural use as a nutrient source and soil conditioner, although they can also be a source of pollution by heavy metals and soluble salts. This study evaluated, in soil representative of the WWTP area of influence in the city of Aguascalientes, Mexico, the application of biosolids and the effect of their heavy metals and soluble salts content on soil and ryegrass plants, in order to establish their agricultural use without potential degradation and soil-plant pollution risks. The biosolids and soils studied were chemically characterized. Biosolids had slightly acidic pH, high soluble salts content and heavy metals concentration within permissible maximum limits set by NOM-004-SEMARNAT-2002, meaning they can be used for agricultural purposes. Increasing biosolids doses in the soil had no effect on it, in terms of heavy metals concentrations, but soluble salts content did increase, and at doses higher than 80 $t \cdot ha^{-1}$ levels were reached that can reduce most crop yields.

KEY WORDS: pollution, degradation, wastewater treatment plants.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista de la sustentabilidad, la calidad del agua y el tratamiento del agua residual son importantes para el cuidado de la salud humana y el equilibrio de los ecosistemas. En el contexto de los problemas ambientales, la contaminación del agua ocupa un lugar prioritario a escala mundial. Las aguas residuales resultantes de usos domésticos e industriales, antes de su vertido a los cauces receptores, deben sanearse para minimizar su impacto contaminante (INEGI, 2009). La

INTRODUCTION

From the standpoint of sustainability, water quality and wastewater treatment are important elements for safeguarding human health and ecosystem balance. In the context of environmental problems, water pollution ranks as a high-priority concern on the world stage. Wastewater resulting from domestic and industrial uses, prior to its discharge into receiving channels, must be treated to minimize its pollution impact (INEGI). The installation of wastewater treatment plants (WWTP) in Mexico has been

instalación de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en México ha ido en aumento en los últimos años, como resultado de la aplicación de la normativa encaminada a la protección de las aguas superficiales (CONAGUA, 2005). Con ello se producen volúmenes importantes de lodos, que pueden definirse como residuos urbanos procedentes de la depuración de aguas residuales cuya materia orgánica puede aprovecharse en la agricultura (Porta, 2003; EPA, 2000).

La mayoría de los procesos para el saneamiento de aguas de desecho producen partículas sólidas sedimentables y decantables, constituidas por minerales inertes y materiales orgánicos fermentables, sobre los que se absorben y adsorben sales minerales y algunos patógenos (bacterias, parásitos, etc.) que se encuentran en las aguas de desecho (Gamrasni, 1985). Estos materiales se separan del agua y forman un lodo biológicamente inestable (lodos residuales), con alto contenido de humedad. Cuando este lodo residual recibe un tratamiento físico, químico o biológico para estabilizarlo y reducir su potencial contaminante, se le denomina biosólido (USEPA 1993; NOM-004-SEMARNAT-2002).

Para mejorar su imagen pública y utilizarlos como fertilizantes orgánicos, estos desechos también se clasifican en lodos crudos y lodos tratados o biosólidos (Nebel y Wright, 1999). El tratamiento de los lodos, o su estabilización, consiste en los procesos físicos, químicos o biológicos a los que se someten estos residuos para acondicionarlos para su aprovechamiento o disposición final y reducir o evitar sus efectos contaminantes al medio ambiente (NOM-004-SEMARNAT-2002).

El volumen de producción de estos residuos llega a convertirse en un grave problema en ciudades muy pobladas; su gestión se hace más urgente a medida que el crecimiento demográfico se acelera (Lovell, 1996).

Actualmente, el manejo integral de los biosólidos ha cobrado gran importancia debido a su potencial uso benéfico. La aplicación de éstos en suelos agrícolas (siempre que reúnan los estándares adecuados para aplicarse al terreno) reduce la demanda de fertilizantes inorgánicos, ya que constituyen una fuente de nutrientes para las plantas y mejoran algunas características físicas, químicas y biológicas del suelo. Su uso agrícola ofrece una alternativa económica y ambiental aceptable, y agronómicamente favorable para reciclar componentes importantes como materia orgánica (MO), macro y micronutrientes para los cultivos (Oberle y Keney, 1994; Oudeh, 2002).

Sin embargo, los biosólidos también pueden contener elementos potencialmente tóxicos (EPT), los cuales al aplicarse a suelos agrícolas pueden afectar a la cadena alimenticia, a través de los cultivos, contaminar el suelo y las aguas freáticas; estos elementos son, principalmente, metales pesados y son el factor principal que restringe su

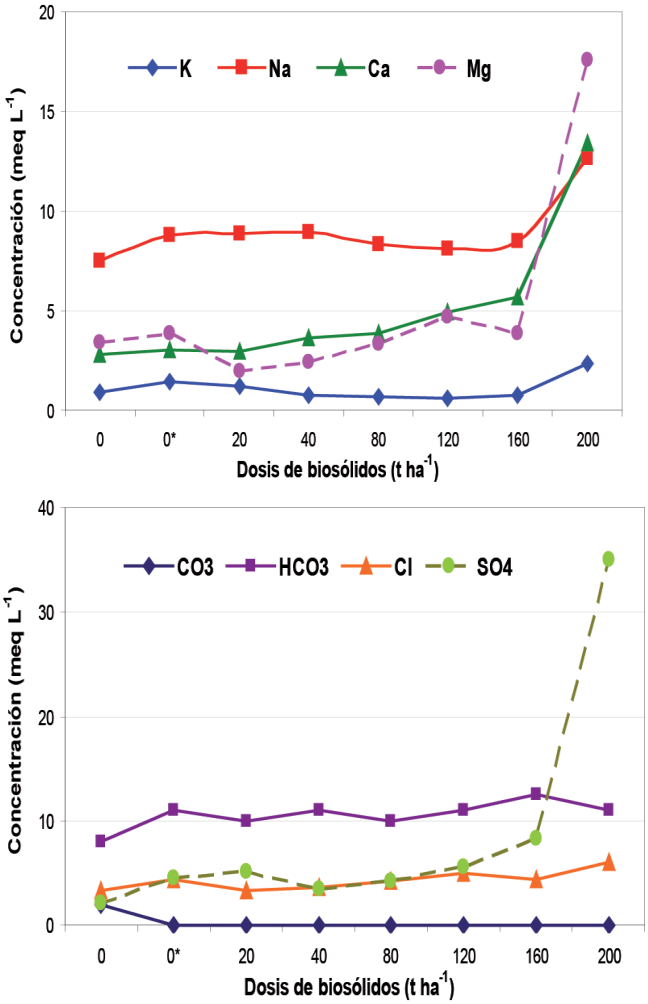

FIGURA 1. Cationes y aniones en el suelo de la parcela experimental según sus tratamientos.

FIGURE 1. Cations and anions in the experimental plot soil according to their treatments.

on the increase in recent years as a result of legislation aimed at protecting surface waters (CONAGUA, 2005). These plants produce large volumes of sludge, which can be defined as urban residuals resulting from sewage treatment processes whose organic matter can be used in agriculture (Porta, 2003; EPA, 2000).

Most wastewater remediation processes produce sedimentable and settleable solid particles, consisting of inert minerals and fermentable organic materials, on which mineral salts and some pathogens (bacteria, parasites, etc.) found in wastewater are absorbed and adsorbed (Gamrasni, 1985). These materials are separated from the water and form a biologically-unstable sludge (residual sludge), with high moisture content. When this residual sludge is subjected to a physical, chemical or biological process for stabilizing it and reducing its polluting potential, it is called a biosolid (USEPA 1993; NOM-004-SEMARNAT-2002).

To improve their public image and use them as organic fertilizers, these wastes are also classified as raw sludge and treated sludge or biosolids (Nebel and

uso en la agricultura (Chandra y Prasad 2005; De Brouwere y Smolders 2006), pero éste varía de acuerdo a la región en que se localice la planta de tratamiento de aguas residuales y al origen de éstas. Al respecto, Nyamangara y Mzezewua (1999) reportaron que la incorporación continua de biosólidos durante 19 años en Zimbawe incrementó el contenido de Zn, Cu, Ni y Pb en el horizonte superficial del suelo.

La planta de tratamiento de aguas residuales "El Niágara" de la Ciudad de Aguascalientes, Ags., con capacidad para procesar hasta 2,000 litros por segundo (CONAGUA, 2008), genera 130-150 m^3 de biosólidos diariamente, los cuales son acumulados en áreas aledañas a la planta y representan un riesgo de contaminación del suelo, aire y agua debido a que no tienen un uso inmediato. La infiltración de elementos tóxicos hasta alcanzar subsuelo y mantos freáticos, la proliferación de moscas y roedores, reactividad, síntesis de compuestos indeseables, diseminación de olores desagradables, etc., son algunos de los problemas derivados de la inutilización de estos biosólidos. En parcelas agrícolas cercanas a la PTAR, los biosólidos son aplicados en diferentes dosis, sin bases científicas, obteniendo buenos resultados en algunos casos (incrementos en el rendimiento de sus cultivos), pero en otros los suelos presentaron afectaciones como el endurecimiento en las capas superficiales y quemaduras en las plantas.

Por otra parte, existen evidencias visuales de la presencia de sales en los suelos de la zona de estudio. La incorporación de biosólidos, por su alto contenido de sales solubles, puede incrementar éstas en el suelo (Schroder, *et al*., 2008), provocando acumulación y posible contaminación, con efectos negativos en el desarrollo de algunos cultivos.

El alto contenido de sales solubles en el suelo, es uno de los factores limitativos para el buen desarrollo de los cultivos. Éstas reducen el potencial osmótico de la solución del suelo, lo cual disminuye la disponibilidad del agua para las plantas, aun cuando el suelo tenga suficiente humedad,

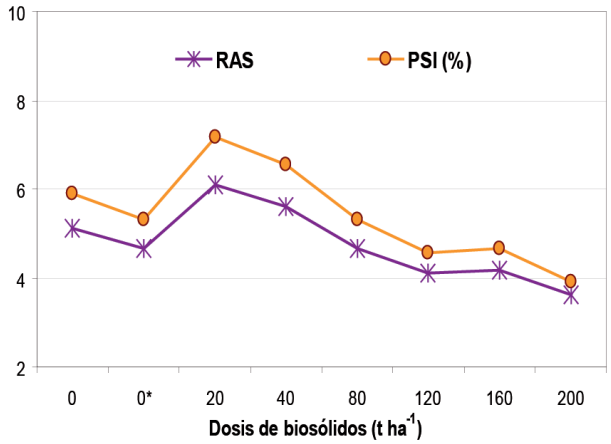

FIGURA 2. Valores promedio de RAS y PSI en el suelo de la parcela experimental

FIGURE 2. Average RAS and PSI values in the experimental plot soil

Wright, 1999). Sludge treatment, or stabilization, consists of physical, chemical or biological processes that these residues undergo in order to condition them for use or disposal, as well as to reduce or avoid their polluting effects on the environment (NOM-004-SEMARNAT-2002).

The sheer production volume of this waste has become a serious problem in crowded cities; its management, then, becomes ever more urgent as population growth accelerates (Lovell, 1996).

In recent times, integrated biosolids management has become extremely important due to the potential beneficial use of these materials. Their use in agricultural soils (provided they meet the relevant standards for field application) reduces demand for inorganic fertilizers, as they are a source of plant nutrients and improve some physical, chemical and biological soil characteristics. Their agricultural use provides an economical and environmentally-acceptable alternative, and one that is also agriculturally favorable for recycling important components as organic matter (OM), macro and micronutrients for crops (Oberle and Keney, 1994; Oudeh, 2002).

However, biosolids may also contain potentially toxic elements (PTE), which when applied to agricultural soils can affect the food chain through crops and contaminate soil and groundwater. These elements are, in the main, heavy metals and are the main factor that restricts their agricultural use (Chandra and Prasad 2005; De Brouwere and Smolders 2006), but this varies according to the region in which the wastewater treatment plant is located and the origin of these wastes. In this regard, Nyamangara and Mzezewua (1999) reported that continuous biosolids incorporation for 19 years in Zimbabwe increased the content of Zn, Cu, Ni and Pb in the soil surface horizon.

The "El Niágara" wastewater treatment plant in the City of Aguascalientes, Ags., with a processing capacity of up to 2,000 liters per second (CONAGUA, 2008), generates 130-150 m^3 of biosolids daily, which accumulate in areas adjacent to the plant and pose a pollution risk to the soil, air and water because they have no immediate use. Infiltration of toxic elements until the subsoil and groundwater, proliferation of flies and rodents, reactivity, synthesis of undesirable compounds, disagreeable odor release, etc, are but some of the problems arising from the non-utilization of these biosolids. In agricultural plots near the WWTP, biosolids are applied at different doses, without scientific basis, obtaining good results in some cases (increased crop yields), but in others, soils present damage such as hardening in the surface layers and burns on the plants.

Moreover, there is visual evidence of the presence of salts in the study area soils. The incorporation of biosolids, for their high soluble salts content, can increase these in the soil (Schroder *et al*., 2008), causing accumulation and possible contamination, with negative effects on the development of some crops.

CUADRO 1. Determinaciones analíticas y metodologías empleadas en la caracterización de suelos y biosólidos (NOM-021-SEMARNAT-2000).

TABLE 1. Analytical determinations and methodologies used in the characterization of soils and biosolids (NOM-021-SEMARNAT-2000).

		Análisis en:	
		Biosólidos	Suelos
Extracto de saturación	Succión de vacío	X	X
CE	Conductimetría (ext. sat.[1])	X	X
pH	Potenciometría (ext. sat.)	X	X
Ca^{2+}, Mg^{2+} solubles	Volumetría (ext. sat.)	X	X
Na^{+}, K^{+} solubles	Flamometría (EEA) (ext. sat.)	X	X
CO_3^{2-}, HCO_3^{-}, Cl^{-} solubles	Volumetría (ext. sat.)	X	X
SO_4^{2-} solubles	Turbidimetría (ext. sat.)	X	X
Boro soluble	Fotocolorimetría (ext. sat.)	X	X
RAS, PSI	Cálculo matemático	X	X
Zn, Fe, Mn, Cu, Pb, Ni, Cd extractables	Absorción atómica (EAA) (extracto en DTPA)	X	X
Zn, Fe, Mn, Cu, Pb, Ni, Cd totales	Absorción atómica (EAA) (extracto con mezcla diácida)	X	
Contenido de humedad	Gravimetría (secado en estufa)	X	
M.O. total	Combustión seca	X	
N inorgánico	Volumetría (extracción con KCl y destilación por arrastre de vapor)	X	
P disponible	Fotocolorimetría (Bray P1)	X	

[1]ext. sat.: extracto de saturación.

lo que ocasiona una disminución en el crecimiento de los cultivos (Jumberi *et al*., 2001**;** Csizinski, 1986; George *et al*., 1988). También se pueden ver afectados por el efecto del ion específico (Na, Cl o B) o una inadecuada absorción de nutrimentos (Munns y Termaat, 1986). En este estudio se evaluó, en un suelo representativo de la zona de influencia de la PTAR, el efecto de la aplicación de biosólidos en el contenido de metales pesados y sales solubles en el suelo y en la producción de biomasa de pasto ballico, con la finalidad de establecer la dosis óptima de estos materiales que promueva el mayor rendimiento de este cultivo sin potenciales riesgos de degradación y contaminación de los suelos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los métodos de análisis químicos utilizados para caracterizar el suelo estudiado y los biosólidos aplicados a éste, se presentan en el Cuadro 1.

Se estableció un experimento de campo, en una

High soluble salts content in soil is one of the limiting factors for good crop development. They reduce the osmotic potential of soil solution, which reduces water availability to plants, even when the soil has enough moisture, causing a decrease in crop growth (Jumberi *et al*., 2001; Csizinski, 1986; George *et al*., 1988). It also can be affected by the effect of specific ion (Na, Cl, or B) or inadequate nutrient absorption (Munns and Termaat, 1986). This study evaluated, in soil representative of the WWTP area of influence, the effect of biosolids application on heavy metals and soluble salts content in the soil, as well as on ryegrass biomass production, in order to establish the optimal dose of these materials to promote the highest yield of this crop without potential soil degradation and pollution risks.

MATERIALS AND METHODS

Chemical analysis methods used to characterize the soil studied and the biosolids applied to it are presented in Table 1.

CUADRO 2. Características químicas del suelo y de los biosólidos estudiados.
TABLE 2. Chemical characteristics of the soil and biosolids studied.

	pH	MO	N	P	K	Ca	Mg	CIC
		%		mg·kg^{-1}				Cmol$_{(+)}$·kg^{-1}
Suelo	8.0	3.0	18	16	905	1515	165	19
Biosólidos Extractables	6.8	-	4650	370	1530	11000	1300	21
Biosólidos Totales (%)	–	63.3	5.3	0.31	6.5	2.5	0.8	–

MO = materia orgánica, CIC= capacidad de intercambio catiónico

parcela con una superficie de media hectárea y con un suelo representativo del área de influencia de la PTAR, se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar, con base en la experiencia de los productores de la región, se determinaron y aplicaron ocho tratamientos: 0, 20, 40, 80, 120, 160 y 200 t·ha^{-1} de biosólidos en base seca, y un testigo al que se le aplicó la dosis de fertilizante químico que se recomienda para la región según los productores (90-60-00), con cuatro repeticiones. Se midió el terreno y se trazaron las unidades experimentales, las cuales se distribuyeron aleatoriamente. Los lodos residuales de la PTAR se llevaron al terreno con la ayuda de un remolque y posteriormente se incorporaron al suelo. Un mes después de la aplicación de los biosólidos al terreno, se realizó la siembra de pasto ballico con tractor y una sembradora mecánica.

Se colectaron muestras de biosólidos de la PTAR, y tres meses después de la incorporación de éstos se tomaron muestras de suelos en la parcela; en cada unidad experimental se tomaron cuatro submuestras de suelos a una profundidad de 0-20 cm, se mezclaron y homogeneizaron para formar muestras compuestas. Posteriormente éstas se secaron al aire, y con un mazo de madera se disgregaron los terrones, se pasaron por un tamiz de malla 10 y se almacenaron en bolsas de plástico, para su posterior caracterización.

Con los datos obtenidos en campo y en el laboratorio se realizó un análisis de varianza, SAS (1995), con base en

A field experiment was established in a half-hectare plot with soil representative of the WWTP area of influence. A completely randomized experimental block design, based on the experience of producers in the region, was determined and eight treatments were applied: 0, 20, 40, 80, 120, 160 and 200 t·ha^{-1} of biosolids on a dry basis, and a control which was given the chemical fertilizer dose recommended for the region according to farmers (90-60-00), with four replications. The field was measured and the experimental units plotted randomly. Sewage sludge from the WWTP was taken to the plot with the help of a trailer and then incorporated into the soil. A month after the biosolids application to the land, ryegrass was sown using a tractor and a mechanical planter.

Biosolids samples were collected from the WWTP, and three months after their incorporation, soil samples were taken in the plot. In each experimental unit, four soil sub-samples were taken at a depth of 0-20 cm, after which they were mixed and homogenized to form composite samples. Later they were air dried and a wooden mallet was used to break up the clods, then passed through a 10-mesh sieve and stored in plastic bags for further characterization.

With the field and laboratory data, an analysis of variance, SAS (1995), was performed, based on the experimental design used. When significant differences were detected, the Tukey range test was applied ($\alpha \leq 0.05$).

CUADRO 3. Características químicas del suelo, después de tres meses de incorporados los biosólidos.
TABLE 3. Chemical Characteristics of the soil, three months after biosolids incorporated.

Dosis t·ha^{-1}	pH	MO %	CIC Cmol·kg^{-1}	N	P	K	Ca	Mg
					mg·kg^{-1}			
0	7.87 ab	3.2 c	19.8 a	19 c	17 bc	888 a	1553 b	149 b
FQ	7.93 a	3.2 c	19.2 a	22 bc	15c	909 a	1466 b	140 b
20	7.80 ab	3.6 bc	20.6a	24 bc	28ab	800 a	1600 ab	157 b
40	7.73 ab	3.5 bc	20.5 a	25 bc	27 ab	834 a	1623 ab	151 b
80	7.43 ab	4.0 abc	21.5 a	32 abc	29 ab	815 a	1587 b	162 ab
120	7.37 ab	4.3 abc	20.9 a	39 ab	33 a	770 a	1789 ab	182 ab
160	7.22 bc	4.5 ab	19.0 a	39 ab	34 a	771 a	1678 ab	167 ab
200	6.63 c	5.1 a	22.0 a	47 a	35 a	810 a	1921 a	202 a

Valores en la misma columna con diferente letra son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey, a una $\alpha \leq$ 0,05). FQ = fertilizante químico (90-60-00), MO = materia orgánica, CIC= capacidad de intercambio catiónico

el diseño experimental empleado. Cuando se detectaron diferencias significativas, se aplicó la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los biosólidos presentaron las siguientes características: 75 % de humedad, porcentaje de saturación de agua de 575 -lo cual es congruente con su alto contenido de materia orgánica (MO) (68.55 %)-, pH ligeramente ácido y capacidad de intercambio catiónico (CIC) baja (Cuadro 2). En cuanto a los macronutrimentos totales (N, P, K, Ca y Mg), la concentración en estos materiales fue mayor que la de otros abonos orgánicos (Ortiz, 1995); además, también presentaron altos contenidos de la fracción extractable de esos elementos, la cual es la que pueden absorber inmediatamente las plantas. Esto es un factor positivo en cuanto a usarlos como abonos del suelo, aunque pueden representar un problema si no se aplican en cantidades adecuadas.

Características químicas del suelo

Las características químicas de los suelos que principalmente cambian por adición de abonos orgánicos son: pH, MO, N, P, Ca, Mg y CIC (Tamoutsidisis, 2002). En este estudio, con excepción de la CIC, estas fueron las características que tuvieron modificaciones estadísticamente significativas por efecto de la aplicación de biosólidos al suelo (Cuadro 3). Con la dosis más alta el pH disminuyó de moderadamente alcalino a ligeramente ácido, lo cual es benéfico, ya que es el más adecuado para la disponibilidad de la mayoría de los nutrimentos para las plantas.

La MO tuvo incrementos estadísticamente significativos sólo con las dosis de 160 y 200 $t \cdot ha^{-1}$ de biosólidos, por lo que de ser un suelo con contenido ligeramente bajo, cambió a uno muy rico. La capacidad de intercambio catiónico es una propiedad química a partir de la cual es posible inferir acerca del tipo de arcilla presente, la magnitud de la reserva nutrimental y del grado de intemperismo de los suelos. El resultado numérico

CUADRO 5. Efecto de los biosólidos, en sales solubles y conductividad eléctrica del suelo

TABLE 5. Effect of the biosolids on soluble salts and soil electrical

Dosis de biosólidos	Σ Cationes[1]	Σ Aniones[2]	CE
($t \cdot ha^{-1}$)	$meq \cdot L^{-1}$		$dS \cdot m^{-1}$
0	14.56	15.45	1.69
0*	17.13	19.93	2.41
20	18.82	18.43	2.18
40	15.68	18.20	2.42
80	16.23	18.45	2.90
120	18.35	21.58	3.45
160	18.82	25.15	3.60
200	46.01	51.98	5.25

[1] $\Sigma(K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+})$. [2] $\Sigma(CO_3^{2-}, HCO_3^-, Cl^-, SO_4^{2-})$. CE = conductividad eléctrica

CUADRO 4. Conductividad eléctrica y sales solubles en los biosólidos.

TABLE 4. Electrical conductivity and soluble salts in the biosolids.

Σ Cationes[1]	Σ Aniones[2]	CE
$me \cdot L^{-1}$	$me \cdot L^{-1}$	$dS\ m^{-1}$
119.4	103.1	9.85

[1] $\Sigma(K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}$ y $NH_4^+)$ [2] $\Sigma(CO_3^{2-}, HCO_3^-, Cl^-$ y $SO_4^{2-})$

RESULTS AND DISCUSSION

The biosolids had the following characteristics: 75% moisture, water saturation percentage, 575 - which is consistent with their high organic matter (OM) content (68.55%) - slightly acidic pH and low cation exchange capacity (CEC) (Table 2). In terms of total macronutrients (N, P, K, Ca and Mg), concentration in these materials was higher than that in other organic fertilizers (Ortiz, 1995). In addition, they showed high levels of extractable fraction of those elements, which is what plants can absorb immediately. This is a positive factor in terms of using them as soil fertilizer, but they can pose a problem if not applied in appropriate amounts.

Values in the same column with different letter are different according to Tukey's test, an $\alpha \leq 0.05$). FQ = chemical fertilizer (90-60-00), MO = organic matter, CIC = cation exchange capacity.

Soil chemical characteristics

Soil chemical characteristics that primarily change by the addition of organic fertilizers are: pH, OM, N, P, Ca, Mg and CEC (Tamoutsidisis, 2002). In this study, with the exception of CEC, these were the characteristics that had statistically significant changes due to biosolids application to the soil (Table 3). With the highest dose, pH decreased from moderately alkaline to slightly acid, which is beneficial, since it is the best for the availability of most nutrients for plants.

OM had statistically significant increases only at biosolids doses of 160 and 200 $t \cdot ha^{-1}$, so that a soil with slightly low content changed to one with a very rich content. Cation exchange capacity is a chemical property from which the type of clay present, the magnitude of nutrient reserves and the degree of soil weathering can be inferred. The numerical result of its determination also serves as the basis for calculating the percent base saturation, which is a widely-used datum in pedological and fertility studies (NOM-021-SEMARNAT-2000). In the studied soil, the biosolids applied, despite their high organic matter content, had no effect on this chemical property because they consisted mostly of non-humidified organic waste, and therefore with low CEC.

Nutrients N, P, Ca and Mg increased significantly, with respect to the control and chemical fertilization treatments, also with the highest doses (160 and 200 $t \cdot ha^{-1}$); for K, there were no significant differences (Table 3).

CUADRO 6. Micronutrimentos y metales pesados en los biosólidos estudiados.

TABLE 6. Micronutrients and heavy metals in the biosolids studied.

	Mn	Cu	Fe	Zn	Ni	Pb	Cd
				mg·kg^{-1}			
Total	688	258	3563	2905	45	70	47
Extractable	66	8	81	865	15	10	15
LMP_B[1] (mg kg^{-1}) E	nr	2800	Nr	1500	300	420	39
LMP_B[1] (mg kg^{-1}) B	nr	7500	Nr	4300	840	420	85
LMP_B[2] (mg kg^{-1})	nr	4000	1307	1750	1200	400	140

[1]LMPB (E:excelente, B:bueno) = Límite máximo permisible para biosólidos (NOM-004-SEMARNAT-2002). [2]LMPB = Límite máximo permitido en biosólidos (uso agrícola) (Porta et al., 2003). nr = no reportado.

[1]LMPB (E: excellent, B: good) = Maximum allowable limit for biosolids (NOM-004-SEMARNAT-2002). [2]LMPB = Maximum allowable limit in biosolids (agricultural use) (Porta *et al*., 2003). nr = not reported.

de su determinación sirve, además, como base en el cálculo del porcentaje de saturación de bases, el cual es un dato ampliamente usado en los estudios pedológicos y de fertilidad (NOM-021-SEMARNAT-2000). En el suelo estudiado, los biosólidos aplicados, a pesar de su alto contenido de MO, no influyeron en esta propiedad química, debido a que en su mayoría ésta consistía de residuos orgánicos sin humificar, y por lo tanto con baja CIC.

Los nutrimentos N, P, Ca y Mg se incrementaron significativamente, con respecto a los tratamientos testigo y fertilización química, también con las dosis más altas (160 y 200 t·ha^{-1}); para el K no hubo diferencias significativas (Cuadro 3).

Sales solubles en biosólidos y suelos

Los biosólidos presentaron altas concentraciones de sales solubles (Cuadro 4); esto puede representar un problema si se aplican los biosólidos en dosis excesivas. El incremento de sales en el suelo se traduce en un aumento del potencial osmótico, lo cual puede ser un perjuicio para las plantas, ya que éstas deben emplear más energía para reducir el potencial osmótico del agua de la raíz y se pueda mantener el flujo de agua del suelo hacia la raíz (Ayers y Westcot, 1987). Además, un alto contenido de bicarbonatos induce la precipitación de Ca^{2+} y Mg^{2+}, originando acumulación de sodio en la solución del suelo, el cual al adsorberse a las arcillas provocará la sodificación de éste. Los resultados anteriores coinciden con los obtenidos por Samaras *et al.* (2008) en un experimento de campo en Grecia, donde aplicaron dosis crecientes de biosólidos y encontraron incrementos de sales solubles a niveles que pueden afectar el crecimiento de cultivos sensibles a la salinidad.

El contenido de nitrógeno amoniacal en el extracto de saturación de los biosólidos fue muy alto (84.2 me·L^{-1}). Esto significa que los biosólidos suministraron una importante cantidad del N-NH_4^+ inmediatamente disponible para las plantas y con el tiempo (una a dos semanas) mediante el proceso de nitrificación promovido por las bacterias

Soluble salts in biosolids and soils

The biosolids contained high soluble salts concentrations (Table 4), which may pose a problem if biosolids are applied in excessive doses. Increased salts in soil results in an increase in osmotic potential, which can be a detriment to plants, since they must use more energy to reduce the osmotic potential of root water and to maintain the flow of soil water to the root (Ayers and Westcot, 1987). Furthermore, high bicarbonates content induces the precipitation of Ca^{2+} and Mg^{2+}, resulting in the accumulation of sodium in the soil solution, which when adsorbed to clays result in their sodification. These results coincide with those obtained by Samaras *et al*. (2008) in a field experiment in Greece, where they applied increasing biosolids doses and found increases in soluble salts to levels that may affect the growth of salinity-sensitive crops.

Ammoniacal nitrogen content in the biosolids saturation extract was very high (84.2 me·L^{-1}). This means that the biosolids provided a significant amount of N-NH_4^+ immediately available to plants and over time (one to two weeks) through the nitrification process promoted by the bacteria *Nitrosomonas* and *Azotobacter*, one of the sources of soil acidification (California Plant Health Association, 2004).

There is a relationship between EC in soil solution and crop yield, depending on their tolerance to salts. According to Mass and Hoffman (1977) and Mass (1984), with EC of up to 5.6 dS·m^{-1} the potential yield of ryegrass (*Lolium perenne*, a moderately tolerant forage crop) is 100%, but with conductivities of 7.4 and 9.5 dS·m^{-1} the yield drops to 90 and 75%, in that order. For another forage crop in the area, alfalfa (*Medicago sativa*), which is moderately sensitive to salinity with EC of up to 2.0 dS·m^{-1}, yields of 100% are obtained, but these are reduced to 90 and 75% with 3.4 and 5.4 dS·m^{-1}, respectively. The electrical conductivity and soluble salts content of the soil increased as a result of the biosolids and fertilizer doses applied, peaking at a value of 5.3 dS·m^{-1} with the highest treatment (Table 5). Therefore, the grass grown in this soil had no development problems resulting from soluble salts. Similar results (increase in

CUADRO 7. Metales pesados en el suelo despues de tres meses de incorporados los biosólidos y biomasa de pasto Ballico.
TABLE 7. Heavy metals in the soil three months after incorporating biosolids and ryegrass biomass.

Trata-mientos	Fe	Zn	Mn	Cu	Pb	Ni	Cd	Biomasa
t·ha^{-1}			mg·kg^{-1}					t·ha^{-1}
0	6.68d	1.34d	2.37a	1.93a	2.66	1.28a	0.15b	**5.77 c**
0°	8.85d	1.33d	2.68a	2.94a	2.93a	0.62a	0.15b	**6.77 bc**
20	10.15dc	3.9cd	2.41a	2.99a	2.58a	1.88a	0.18b	7.10 bc
40	10.12bc	6.0bc	3.61a	3.92a	2.92a	1.58a	0.16b	6.83 bc
80	12.45b	6.26bc	2.57a	2.48a	2.77a	1.24a	0.20ab	7.32 abc
120	11.75b	7.52b	2.71a	2.48a	2.62a	1.08a	0.19ab	7.28 abc
160	13.73ab	8.91ab	3.10a	4.16a	2.84a	1.18a	0.21ab	**8.96 a**
200	15.28a	11.73a	3.82a	4.17a	2.89a	1.18a	0.24a	7.70 ab
Interpretación [1]	**Adecuado**	**Adecuado**	**Adecuado**	**Adecuado**	**Normal**	**Normal**	**Normal**	–
LMP$_s$ [2] (mg kg^{-1})	nr	300	4000	100	200	100	7.0	–

Valores en la misma columna con diferente letras son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey, a una $\alpha \leq 0.05$); °Fertilización química (90-60-00). [1] NOM-021-SEMARNAT-2000. [2]LMPS = límite máximo permisible para suelos agrícolas (Kabatas-Pendias y Pendias, 2000).[3] nr = no reportado

Nitrosomonas y *Azotobacter*, una de las fuentes de la acidificación del suelo (California Plant Health Association, 2004).

Existe una relación entre la CE en la solución del suelo y el rendimiento de los cultivos, dependiendo de la tolerancia de éstos hacia las sales. Según Mass y Hoffman (1977) y Mass (1984), con una CE de hasta 5.6 dS·m^{-1} el rendimiento potencial del pasto ballico (*Lolium perenne,* cultivo forrajero moderadamente tolerante) es de 100 %; pero con conductividades de 7.4 y 9.5 dS·m^{-1} el rendimiento desciende a 90 y 75 %, en ese orden. Para otro cultivo forrajero de la zona, como la alfalfa (*Medicago sativa*), moderadamente sensible a la salinidad, con CE de hasta 2.0 dS·m^{-1} se obtienen rendimientos de 100 %, pero éstos se reducen a 90 y 75 % con 3.4 y 5.4 dS·m^{-1}, respectivamente. La conductividad eléctrica y el contenido de sales solubles del suelo se incrementaron por efecto de las dosis de biosólidos y fertilizante aplicados, hasta un valor de 5.3 dS·m^{-1} con el tratamiento más alto (Cuadro 5). Por ello el pasto cultivado en este suelo no tuvo problemas para su desarrollo por efecto de sales solubles. Resultados similares (incremento en la CE y disminución en el pH del suelo) encontraron Jurado *et al*. (2006) con la aplicación de biosólidos (90 kg·ha^{-1}) de la PTAR "El Niágara", a un pastizal de Ojuelos, Jalisco, Shing y Agrawal (2007) en suelos agrícolas (pH de 8.05) de la India.

La California Plant Health Association (2004) menciona que en la solución del suelo la concentración relativa de los cationes es comúnmente Ca > Mg > K > Na, y el Ca^{2+} es el que predomina en el complejo de intercambio. Según la Figura 1, aunque las concentraciones de Na^+ son superiores a los otros iones y tienden a incrementarse con la aplicación creciente de biosólidos, la relación de adsorción de sodio (RAS) y el porcentaje de sodio intercambiables (PSI) disminuyen (Figura 2), EC and decrease in soil pH) were found by Jurado *et al*. (2006) with the application of biosolids (90 kg·ha^{-1}) from the "EL Niágara" WWTP to a pasture in Ojelos, Jalisco, and by Shing and Agrawal (2007) in agricultural soils (pH 8.05) of India.

The California Plant Health Association (2004) mentions that in soil solution the relative concentration of cations is commonly Ca > Mg > K > Na, and Ca^{2+} is dominant in the exchange complex. According to Figure 1, although the concentrations of Na^+ are higher than the other ions and tend to increase with the increasing application of biosolids, the sodium adsorption ratio (SAR) and exchangeable sodium percentage (ESP) decrease (Figure 2), because they, in turn, increase concentrations of Ca^{2+} and Mg^{2+}. In addition, the Ca^{2+}/Na^+ ratio increases, thereby preventing soil sodification (Castellanos *et al*., 2000). With regard to anions, chlorides and sulphates increased beginning with the 160 t ·ha^{-1} dose.

Heavy metals in the biosolids and soil

Total and extractable concentrations of micronutrients and heavy metals in the biosolids (Table 6) showed values considered appropriate, which is why they are classified in Mexico as excellent for use in agriculture (NOM-004-SEMARNAT-2002).

Concentration levels of heavy metals in the soil studied were considered appropriate or normal and were well below the maximum permissible limits with all treatments (Table 7). There were significant differences between treatments as a result of the biosolids addition for Fe, Zn and Cd. The increased concentration of the first two in the soil is beneficial to crops, as they are essential nutrients for them. In terms of Cd, although there were significant increases with the highest dose, its concentration

porque, a su vez, aumentan las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+}. Además, se incrementa la relación Ca^{2+}/Na^{+}, lo que evita la sodificación de los suelos (Castellanos *et al.,* 2000). Respecto a los aniones, los cloruros y los sulfatos se incrementaron a partir de la dosis de 160 $t \cdot ha^{-1}$.

Metales pesados en los biosólidos y el suelo

Las concentraciones de micronutrimentos y metales pesados totales y extractables en los biosólidos (Cuadro 6) presentaron valores considerados como adecuados, por lo que en México se clasifican como excelentes para su uso en la agricultura (NOM-004-SEMARNAT-2002).

Los niveles de concentración de metales pesados en el suelo estudiado se consideraron adecuados o normales y quedaron muy por debajo de los límites máximos permisibles con todos los tratamientos aplicados (Cuadro 7); hubo diferencias significativas entre tratamientos por efecto de adición de biosólidos para el Fe, Zn y Cd; el incremento en la concentración del suelo de los dos primeros es benéfico para los cultivos, ya que éstos son nutrimentos esenciales para ellos; en cuanto al Cd, aunque hubo incrementos significativos con la dosis más alta, su concentración quedó muy lejos del límite máximo permisible para considerarse como tóxicos (Kabatas-Pendias y Pendias, 2000). En un experimento para comparar la disponibilidad del Cd, Ni y Zn al pasto ryegrass, Antoniadis y Alloway (2001) aplicaron tres dosis de biosólidos al suelo (0, 10 y 50 $t \cdot ha^{-1}$) y después de un año encontraron incrementos significativos de estos metales en el suelo, pero sin que sus concentraciones superaran los límites establecidos por Kabatas-Pendias y Pendias(2000), y sin que afectaran el crecimiento del cultivo.

La baja aportación de los biosólidos de metales pesados al suelo se debe a varios factores: el pH alcalino del suelo disminuye la solubilidad de los metales pesados y éstos se precipitan como fosfatos, carbonatos, óxidos e hidróxidos insolubles (FeOOH), $Fe(OH)_3$, $Zn(OH)_2$, MnO_4 (Shtangeeva, 2006), el alto contenido de materia orgánica en los biosólidos (63 %) disminuye la biodisponibilidad de los metales pesados por la adsorción y formación de complejos organometálicos estables (Shuman, 1999).

En cuanto al rendimiento de pasto ballico, no hubo efectos negativos por metales pesados; por el contrario, se encontraron incrementos significativos (55.3 y 33.5 %) con respecto al testigo con las dosis mayores de biosólidos (Cuadro 7).

CONCLUSIONES

La aplicación de dosis crecientes de biosólidos al suelo de la parcela experimental no presentó efectos negativos en cuanto a las concentraciones de metales pesados en suelos y plantas, pero incrementó el contenido de sales solubles, sin llegar a afectar el rendimiento del cultivo.

stayed well within the maximum permissible limit to be considered toxic (Kabatas-Pendias and Pendias, 2000). In an experiment to compare the availability of Cd, Ni and Zn to ryegrass pasture, Antoniadis and Alloway (2001) applied three biosolids doses to the soil (0, 10 and 50 $t \cdot ha^{-1}$) and after a year they found significant increases in these metals in the soil, but without their concentrations exceeding the limits set by Kabatas-Pendias and Pendias (2000), and without affecting crop growth.

The low contribution of the biosolids heavy metals to soil is due to several factors: the alkaline pH of soil decreases the solubility of heavy metals and they are precipitated as phosphates, carbonates, insoluble oxides and hydroxides (FeOOH), $Fe(OH)_3$, $Zn(OH)_2$, MnO_4 (Shtangeeva, 2006). The high organic matter content in the biosolids (63 %) decreases the bioavailability of heavy metals by adsorption and formation of stable organometallic complexes (Shuman, 1999).

In terms of ryegrass yield, there were no negative effects by heavy metals. On the contrary, there were significant increases (55.3 and 33.5%) compared to the control with the higher biosolids doses (Table 7).

CONCLUSIONS

The application of increasing biosolids doses to the experimental plot soil showed no negative effects on heavy metals concentrations in soils and plants, but it increased the content of soluble salts, without affecting crop yield.

The optimal dose to obtain better yields in the crop, without damaging the soil by increasing salts and heavy metals, was 80 $t \cdot ha^{-1}$.

With biosolids doses of 120 $t \cdot ha^{-1}$ in these soils, salts concentrations were reached that could reduce the yield of most crops.

The biosolids analyzed in the study area can be used for agricultural purposes, without risk of pollution by heavy metals, but conditioned to control the contribution of their soluble salts to prevent soil salinization and degradation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Fundación Produce Aguascalientes, A. C., for the economic and infrastructure support given to conduct this research project.

End of English Version

La dosis óptima para obtener mejores rendimientos en el cultivo, sin deteriorar el suelo por incremento de sales y metales pesados, fue 80 $t \cdot ha^{-1}$.

Con dosis de biosólidos de 120 $t \cdot ha^{-1}$ en este tipo de suelos, se llegó a concentraciones de sales que podrían reducir el rendimiento de la mayoría de cultivos.

Se puede dar un uso agrícola a los biosólidos analizados en el área de estudio, sin riesgo de contaminación por metales pesados, pero condicionado al control del aporte de sales solubles por los mismos, para evitar salinización y degradación del suelo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Fundación Produce Aguascalientes, A. C., el apoyo económico y de infraestructura otorgado para la realización del presente proyecto de investigación.

LITERATURA CITADA

ANTONIADIS V.; ALLOWAY B. J. 2001. Availability of Cd, Ni and Zn to Ryegrass in Sewage Sludge-Treated Soils at Different Temperatures. Water, Air and Soil Pollution 132: 201-214.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. 1987. La calidad del agua en la agricultura. Estudio FAO Riego y Drenaje Núm. 29. FAO. Roma, Italia.

CALIFORNIA PLANT HEALTH ASSOCIATION. 2004. Manual de fertilizantes para cultivos de alto rendimiento. Limusa. México.

CASTELLANOS, J. Z.; UVALLE, B. J. X.; AGUILAR, S. A. 2000. Manual de Interpretación de Análisis de Suelos y Aguas. 2ª Edición. Colección INCAPA. Guanajuato, México.

CHANDRA, K. S.; PRASAD. M .N. V. 2005. Risk Assesssment, Pathways, and Trace Element Toxicity of Sewage Sludge-Amended Agroforestry and Soils. *In*: Prasad, M.N.V.; K.S. SAJWAN and R. NAIDU. (Eds.). Trace Element in the Environment. Boca Raton, FL. USA.

CONAGUA. 2005. Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de aguas residuales en Operación Diciembre de2004. Comisión Nacional del Agua.

CONAGUA. 2008. Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de aguas residuales en Operación Diciembre de2007. Comisión Nacional del Agua.

CSIZINSKI, A. A. 1986. Influence of total soluble salt concentration on growth and elemental concentration of winged bean seedlings (*Psophocarpus tetragonolobus* L.). Commun. Soil Sci. Plant anal. 17: 1009-1018.

DE BROWERE, K.; SMOLDERS, E. 2006. Yield Response of crops amended whit sewage sludge in the fieldis more affected by sludge properties than by final soil metal concentration. European Journal of Soil Science. 57: 858-867

EPA, 2000. Aplicacion de Biosólidos al terreno. Parte1. En: Folletos Informativos de la EPA. United Estates Enviromental Protection Agency. Office of Water, Washington, D.C.

GAMRASNI, M. A. 1985. Aprovechamiento agrícola de aguas negras urbanas. Editorial Limusa. México.

GEORGE, T.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. 1988. Yield, soil nitrogen uptake, and nitrogen fixation by soybean from maturity groups grown at three elevation. Agronomy J. 80: 563-567.

INEGI, 2009. "Estadísticas a propósito del día mundial del agua" Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 22 de marzo de 2009. México, D.F.

JUMBERI, A.; YAMADA M.; YAMADA S.; FUGIYAMA, H. 2001. Salt tolerance of Grain Crops in relation to Ionic Balance and Ability to Absorb Microelements. Soil Sci. Plant Nutr., 47 (4), 657-664.

JURADO, P.; T. ARREDONDO, E. F.; OLALDE, V.; FRÍAS, J. 2006. Efecto de los Biosólidos Sobre la Humedad y los Nutrimentos del Suelo y La Prducción de Forraje en pastizales Semiáridos. Terra Latinoamericana 25: 211-218.

KABATAS-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. 2000. Trace elements in soils and plants. CRC Press. USA. P.432

LOVELL, B. 1996. Aplicación en suelos de biosólidos de drenaje para la producción de cosechas. Factsheet. Orden Núm. 95-069. Notario 8 p.

MASS, E. V.; HOFMAN, G. J. 1977. Crops salt tolerance Current assessment. J. Irrig. Drain. Div. 103: 115 – 134.

MASS, E. V. 1984. Salt tolerance of plants. In: The handbook of plant science in agriculture. B. R. Christie (ed). CRC Press, Boca Raton, Fla. USA.

MUNNS, R.; TERMAAT, A. 1986. Whole-plant Responses to salinity. Aust. J. Plant Physiol. 13, 143-160

NEBEL, B.; WRIGHT, R. T. 1999. Ciencias Ambientales "Ecología y Desarrollo Sustentable" Pearson. México. 212-243.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación. México. Publicada el 31 de diciembre de 2002.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SEMARNAT-2002. Protección ambiental. Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. Diario Oficial de la Federación. México. Publicada el 13 de agosto de 2003.

NYAMANGARA, J.; MZEZEWA. J. 1999. The effect on long- term sewage sludge application on Zn, Cu, Ni and Pb levels in a clay loam soil under pasture grass in Zimbawe. Agriculture Ecosystems and Enviroment 73: 199-204.

OBERLE, S. L.; KEENEY, D. R. 1994. Interaction of Sewage Sludge with Soil-Crop-Water Sytems. In C. E. CLAPP, W. E. LARSON, and R.H. DOWDY (Ed.) Sewage Sludge: Land Utilization and the Enviroment. ASA.CSSA. SSSA. Madison. WI.

ORTIZ. H. L.; GUTIÉRREZ, R. M.; SÁNCHEZ, S. E. 1995. Ppropuesta de Manejo de los Lodos Residuales de la Planta de Tratamiento de la Ciudad Industrial del Valle de Cuernavaca, Estado de Morelos, México. Rev. Int. Contam. Ambient. 11 (2): 105-115.

OUDEH, M.; KHAN, M.; SCULLION, J. 2002. Plant accumulation of potentially toxic elements in sewage sludge as affected by soil organic matter level and mycorrhizal fungi. Enviromental Pollution. 116: 293-300.

PORTA, C. J.; ACEVEDO M.; ROQUERO, C. 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 3ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid, España.

SAMARAS, V.; TSADILAS, Ch. D.; STAMADIATIS, S. 2008. Effects of Repeatead Application of Municipal Sewage Sludge on Soil Fertility, Cotton Yield, and Nitrate Leaching. Agronomy Journal. 100: 477-483.

SHING, R. P.; AGRAWAL. M. 2007. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal acumulation and cosequent respond of Beta vulgaris plants. Chemosfere. 67: 2229-2240.

SCHRODER, J. L.; ZHANG, H.; ZHOU, D; BASTA, N.; RAUN, W. R.; PAYTON, M. E.; ZAZULAK, A. 2008. The Effect of Long-Term Annual Application of Biosolids on Soils Properties, Phosphorous, and Metals. Soil Sci. Soc. Am. J. 72: 73-82

SHTANGEEVA, I. 2006. Phytoremediaton of trace element contamined soil whit cereal crops: Role of fertilizersand bacteria on bioavailability. . In: PRASAD, M.N.V., K.S. SAJWAN and R. NAIDU. (Eds.). Trace Element in the Environment. CRC. Boca Raton, FL. USA.

SHUMAN, L. M. 1999. Effect of organic waste amendments on Zn adsorpion by two soils. Soil Science. 164: 97-205.

TAMOUTSIDIS, E.; PAPADOPOULS, I.; TOKATLIDIS, I.; ZOTIS S.; MABROPOULOS, T. 2002. Wet sewage sludge application effects on soil properties and element content of leaf and root vegetables. J. Plant Nutrition. 25 (9): 1941-1955

USEPA, 1993. Standards for the Use or Disposal of Sewage Sludge (40 Code of Federal Regulations Part 503). Washington D. C., U. S. Enviromental Protection Agency.

SAS. 1995. ANOVA. In: SAS User Guide: Statistics. Cary, N.C. pp: 113-138.